

# ВЛИЯНИЕ ЛЕГКОЙ ВОДЫ

## на динамику выведения красителя из обонятельной системы ЛИЧИНОК *Xenopus laevis*

**Цель настоящего исследования - изучение влияния тяжелых изотопологов воды в составе природной воды на динамику выведения красителя метиленового синего из обонятельной системы шпорцевых лягушек двух стадий развития. Применены методы прижизненной регистрации изображений плотности окрашивания и последующей их обработки с помощью специально разработанного компьютерного сценария.**

При использовании животных разного возраста (стадии 50-51 и 53-54) выяснено, что вне зависимости от стадии развития обонятельного органа легкая вода быстрее выводит растворенный в ней краситель по сравнению с контрольной водой. При этом более значительные отличия отмечались в группе второго возраста (стадии 53-54), что, вероятно, связано с развитием динамики процесса выведения по мере формирования дополнительной средней камеры обонятельной ямки. Обнаружено также, что легкая вода способна синхронизировать процесс выведения красителя, устраняя большую вариабельность в группе животных, инкубированных в контрольной воде. Впервые разработанный нами метод может быть применен для проверки свойств воды, используемой для клинических нужд.

### Введение

**П**риродная вода является смесью изотопологов – молекул, различающихся по изотопному составу входящих элементов [1]. Изотополог воды  $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$ , представляет классическую или легкую воду. В естественных условиях легкой воды в виде моноизотопной композиции не существует. Ее содержание в природных водах находится в пределах 99,73–99,76 мол. %. Весовая концентрация тяжелых изотопологов может достигать 2,97 г/кг, что является величиной,

**Т.Н. Бурдейная,**  
доктор химических наук, профессор,  
заместитель  
директора по науке,  
ЗАО «Легкая вода»

**В.А. Поплинская,**  
кандидат биологических наук,  
научный сотрудник,  
Учреждение Российской академии наук Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (ИБР РАН)

**А.С. Чернопятко,**  
заместитель  
директора по науке,  
компания «Тимантти АБ»



сопоставимой с содержанием минеральных солей.

Появление свидетельств действия легкой воды на биологические системы обусловило проведение в последние годы биологических и медицинских исследований [2-5]. Было показано, что тяжелые изотопологи в составе природной воды в природных концентрациях ингибируют реакции дыхательной цепи митохондрий [6]. Легкая вода более однородна, имеет меньшую структурированность, вязкость, плотность, что должно сказываться на ее транспортных свойствах. Для подтверждения этой гипотезы, которая может иметь большое практическое значение, необходимо иметь доказательства, полученные на живых системах и базирующиеся на твердых количественных характеристиках.

В работе впервые изучена динамика выведения красителя из обонятельных ямок личинок альбиносов *Xenopus laevis* двух стадий развития, инкубированных в легкой и контрольной воде. Эти животные являются прозрачными и по этой причине широко исполь-

зуются в прижизненных экспериментах для изучения процессов развития [7, 8], а также в токсикологических исследованиях [9]. Для большей доказательности эффекта легкой воды на выведение красителя исследование проведено на двух стадиях развития обонятельной системы у *Xenopus laevis*. На ранних стадиях (50-51) обонятельные ямки не содержат средней камеры, а на поздних (53-54) ее появление обеспечивает поглощение и выведение жидкости в больших объемах.

## Материалы и методы исследования

**Образцы воды.** Для изучения влияния изотопного состава воды на ее транспортные свойства в экспериментах использовали легкую воду АкваСЛЭП, полученную ЗАО «Легкая вода» методом вакуумной ректификации, в которой содержание изотополога  $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$  составляло 99.76 мол. % (D/H=90 ppm,  $\text{O}^{18}/\text{O}^{16}=1844$  ppm). Исследованный образец легкой воды соответствовал по изотопному составу природной воде из Антарктики. Контролем служила деионизованная вода, приготовленная путем очистки пирогенной дистиллированной воды на системе Milli-Q (Millipore, Великобритания) с концентрацией  $^1\text{H}_2^{16}\text{O}$  99.74 мол. % (D/H=140 ppm,  $\text{O}^{18}/\text{O}^{16}=1965$  ppm). Изотопный состав образцов определялся методом лазерной абсорбционной спектроскопии [10].

**Животные, насыщение красителем.** Личинки шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* (Daudin) были получены в аквариальной ИБР РАН. Стадии развития определяли в соответствии с установленными критериями [11], использовали животных на стадиях 50-51 и 53-54. Содержание животных и их обработка проводились в соответствии с правилами РАН для работы на низших позвоночных животных.

Конечная концентрация красителя метиленового синего (Feinchemie, Германия) составляла 1:50000. Выбор обонятельной ямки как системы для изучения динамики выведения красителя определялся тем, что в ней отсутствует активная циркуляция и не происходит спонтанного выталкивания жидкости. Наконец, обонятельная ямка имеет резкие, не размытые очертания и границы – условия, необходимые для получения четких изображений с помощью цифровой фототехники.

**Изучение выведения красителя.** Эксперимент проводили при температуре 19-20 °С. Раствор метиленового синего готовили на конт-

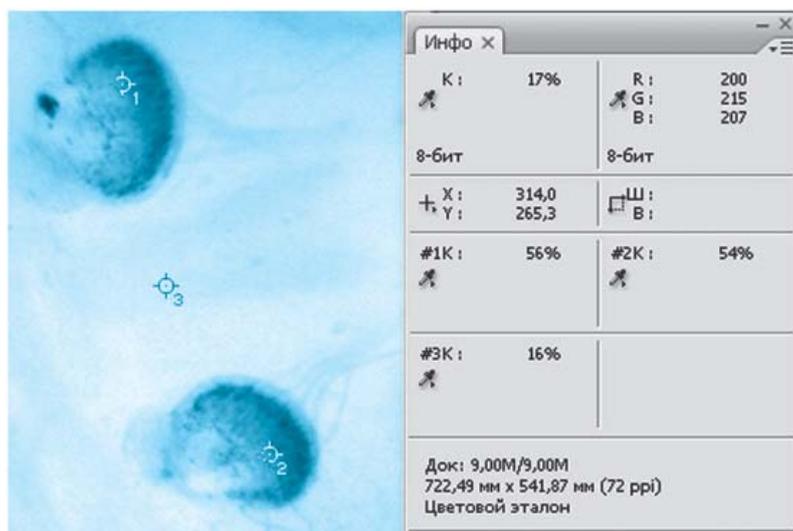
**Э.Н. Григорян\***,  
доктор биологических  
наук, ведущий  
научный сотрудник,  
заведующая  
лабораторией,  
Учреждение  
Российской академии  
наук Институт  
биологии развития  
им. Н.К. Кольцова  
РАН (ИБР РАН)



рольной воде непосредственно перед каждым тестом. Фотографирование исходного состояния обонятельных ямок до инкубации животных в красителе проводили под бинокулярной лупой с увеличением 20х с помощью камеры Webbers (MYscope 300M). Затем головастиков помещали на 30 мин в раствор метиленового синего и после отмытия (2-3 мин) вновь фотографировали. После этого животных размещали в чашках Петри (диаметр 105 мм), куда наливали либо контрольную воду, либо опытный образец легкой воды АкваСЛЭП. Дальнейшее фотографирование проводили каждые 30 мин в течение 210 мин для ранней возрастной группы и 480 мин для личинок более позднего возраста. Фотографии были сделаны по результатам 4-х тестов – по 2 на 50–51 и 53-54 стадии развития. В каждом из тестов, как в контроле, так и в опыте, использовали по 4 головастика.

Весь снятый материал далее подвергался компьютерной и математической обработке. Для этого использовали графический редактор Adobe Photoshop CS3 Extended (version 10.0) и выработанную последовательность команд (*Actions*) с применением инструментов редактора. Основными зонами анализа были выбраны обонятельные ямки, третьей зоной – область между ямками. Ее включение в подсчеты было необходимо для коррекции снимков с различной интенсивностью. Не изменяя цветового режима RGB color, работали инструментами в Grayscale, что приводило все цветовые шумы и отклонения к единому знаменателю (рис. 1).

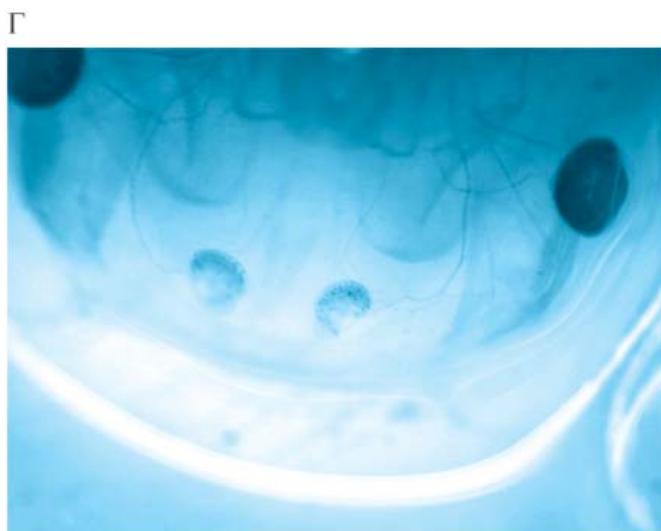
\* Адрес для корреспонденции: leonore@mail.ru



↑ **Рис. 1.** Окно графического редактора с выбранными зонами количественной оценки и палитрой Info.

↓ **Рис. 2.** Изображения неокрашенных (а) и окрашенных метиленовым синим (б, в, г) обонятельных ямок личинок *X. laevis* 50-51 стадии развития. «б» – 5 мин после окрашивания, «в» – в середине наблюдений и «г» – в конце исследования.

Цветовой эталон (*Color Sampler*), являющийся вариантом инструмента *Eyedropper*, служил для размещения в изображении от одной до четырех реперных точек, чьи цветовые параметры постоянно отображались в палитре *Info*. Это давало возможность непрерывно следить за изменением оттенков серого в основной и средней камерах обонятельных ямок животных. С помощью инструментов находящегося в контекстной панели списка *Sample Size* получали усредненную интенсивность насыщенности цвета по 50 пикселям вокруг точки. Выбирался размер инструмента, соответствующий площадям исследуемых областей объектов. Единая палитра и фиксированный размер инструмента обеспечивали точность оценки плотности цвета в каждом из случаев и соответствие данных в группе животных. Насыщение измерялось в процентах градации серого (*Grayscale %*). Из среднего значения плотности окрашивания левой и правой ямки вычиталось значение области между ямками. Статистическая обработка данных и построение графиков проводили с помощью Microsoft Office Excel 2007.



## Результаты и их обсуждение

**У**лягушек *X. laevis* обонятельная система адаптирована для восприятия запахов из водной среды, а у личинок обонятельный эпителий основной камеры полностью открыт для воды [12, 13]. Развитие обонятельной системы шпорцевой лягушки берет начало от обонятельных плакод, которые до начала формирования обонятельных ямок остаются незамкнутыми [11]. На стадиях 37-38 обонятельные ямки дифференцируются в основную камеру и вомероназальный орган [11, 14] и только на стадии 52 происходит формирование дополнительной средней камеры [14, 15]. На стадии 50-51 средняя камера еще не сформирована (рис. 2 а).

Метиленовый синий после присутствия животных в растворе красителя был распределен по пространству основной камеры, и окрашивание в малой степени затрагивало вомероназальный орган. Через 5 мин после окрашивания у всех животных наблюдали максимально интенсивное включение метиленового синего (рис. 2 б). Спустя 5 мин после инкубации в разных водах среднее значение интенсивности окрашивания обонятельных ямок имело незначительные отличия, а уровень поглощения красителя составлял 26-27 %. В последующем на протяжении 210 мин инкубации животных, как в контрольной, так и легкой воде интенсивность окрашивания постепенно снижалась (рис. 2 в, г). Динамика снижения по усредненным значениям для животных каждой из групп представлена на рис. 3.

При этом в течение 210 мин понижение плотности окрашивания составляло примерно 10 % в обеих сериях (контрольная вода, вода АкваСЛЭП). Это свидетельствует о низкой скорости как насыщения красителем, так и его вымывания, что с наибольшей вероятностью обусловлено отсутствием в этот период дополнительной средней камеры. При сравнении кривой контрольной воды с таковой для легкой воды отмечается большая скорость выведения красителя в легкой воде, как минимум в основном интервале времени (от 30 до 150 мин).

Вымывание красителя, растворенного в контрольной и легкой воде из обонятельных ямок головастиков позднего возраста. На стадиях 53-54 в обонятельных ямках головастика *X. laevis* средняя камера сформирована de novo. Ее эпителий является сенсорным, покрыт ресничками и микровиллями, напоминает обонятельный эпителий рыб и отвечает, наряду с основной камерой, за обоняние в водной среде [15]. Было выдвинуто предположение, что формирование средней

### Ключевые слова:

*Xenopus laevis*,  
орган обоняния,  
развитие,  
легкая вода,  
выведение,  
компьютерный анализ

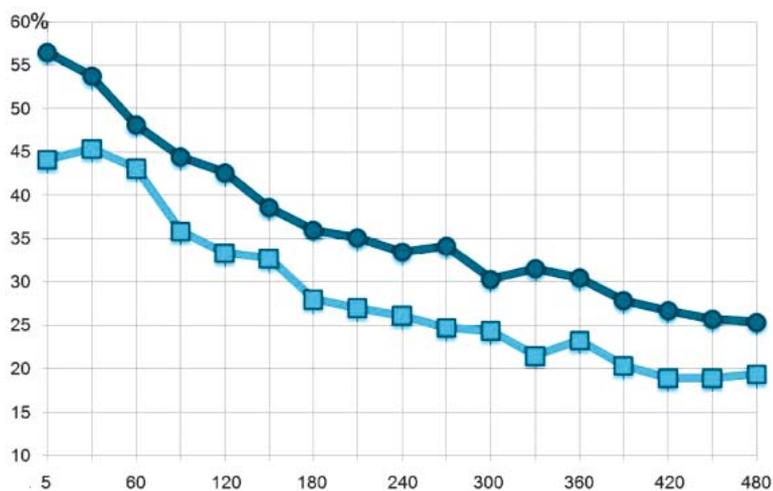
камеры должно привести к усилению как поглощения, так и вымывания красителя по сравнению с тем, что наблюдалось на стадиях 50-51. Кроме этого на данном этапе работы было увеличено общее время наблюдения, чтобы попытаться зарегистрировать полное вымывание красителя из обонятельных ямок животных.

Как и ожидалось, в этой группе процесс поглощения и выведения красителя оказался более активным. Плотность окрашивания обонятельных ямок после инкубации в растворе метиленового синего была намного выше, чем в группе раннего возраста и спустя 5 мин при отмывании после окрашивания составляла от 45 до 60 %, что примерно в два раза выше, чем у животных на стадиях 50-51. Уже в это время была отмечена разница между легкой и контрольной водой, свидетельствующая о преимуществах последней в отношении скорости вымывания красителя. В период исследования вымывание красителя в обеих группах было постепенным, как и у животных раннего возраста, но плотность окрашивания за 480 мин по усредненным значениям снижалась примерно в два раза.

При инкубации животных позднего возраста в легкой воде наблюдалась также синхронизация процесса выведения красителя – индивидуальные отличия животных хотя и проявлялись, но были менее значительны, чем в контроле. В период времени до 240 мин кривые понижения плотности красителя в обонятельных ямках были близки, позже несколько расходились, но в существенно меньшей степени, чем в контроле.

Для ксенопусов раннего возраста (стадии 50-51) отмечена та же закономерность синхронизации процесса выведения метиленового синего.





**Рис. 3.** Динамика выведения красителя метиленового синего из обонятельных ямок личинок *X. laevis* на 53-54 стадиях развития. Данные приведены по средним значениям для двух тестов с использованием в каждом 4-х животных. Красный цвет – контроль, голубой цвет – вода АкваСЛЭП. По оси ординат – насыщение цвета, соответствующее плотности окрашивания обонятельных ямок метиленовым синим, (%); по оси абсцисс – минуты.

Несмотря на колебания значений на протяжении всего срока наблюдения, при анализе объединенных результатов можно сделать еще одно заключение. При сравнении кривой контрольной воды с кривой воды АкваСЛЭП отмечается большая скорость выведения красителя в легкой воде по сравнению с контролем на протяжении основного времени (330 мин). Такая же тенденция наблюдалась и на стадиях 50-51, когда еще не была сформирована средняя камера обонятельной ямки. Это свидетельствует о независимости феномена быстрого выведения красителя в присутствии легкой воды от степени развития и функционирования органа. Другими словами, можно уверенно говорить о свойствах воды, облегчающих выведение, и независимости этих свойств от индивидуальных физиологических отличий у животных, а также от влияний со стороны других систем развивающегося организма лягушек *X. laevis*. Таким образом, снижение содержания тяжелых изотопологов в воде до уровня, соответствующего нижней границе природных концентраций, сказывается на транспортных свойствах воды – достоверно ускоряется процесс выведения растворенных в ней веществ. Предварительным объяснением обнаруженных в данном эксперименте свойств легкой воды может быть ее большая физиологичность: с одной стороны, она является приближенной к воде обитания животных, с другой – более легкой и чистой, обеспечивающей оптимально быстрое выведение растворенных в ней веществ.

минуты	контроль	вода Вивиди
1	2	3
5	56,53	44,13
30	53,78	45,38
60	48,16	43,13
90	44,44	35,88
120	42,66	33,38
150	38,66	32,75
130	36,03	28,00
210	35,16	27,00
240	33,50	26,13
270	34,19	24,75
300	30,34	24,38
330	31,53	21,50
360	30,47	23,25
390	27,88	20,38
420	26,69	18,88
450	25,75	18,88
480	25,41	19,38

## Заключение

На оригинальной животной модели, позволяющей прижизненные наблюдения, и с помощью разработанного компьютерного сценария обработки результатов показано, что легкая вода способна быстрее выводить растворенный в ней краситель. При сравнении с контрольной водой выяснено также, что легкая вода существенно синхронизирует процесс выведения красителя из организма. Предложенный нами метод может применяться для проверки свойств воды, используемой для клинических нужд.

*Авторы выражают благодарность Вишескому А.Н. за помощь в разработке компьютерного сценария для обработки результатов.*

## Литература.

1. Doina P.M. Variation of the deuterium concentration in rats» blood after deuterium depleted water administration and intoxication with cadmium / P.M. Doina, L. Olariu, S. Cun et al. // Bulletin UASVM. Veterinary Medicine // 2008. V.65. N 1. P. 418-423.
2. Помыткин И.А. Влияние естественной генерации тяжелых изотопологов воды на скорость генерации  $H_2O_2$  митохондриями / И.А. Помыткин, О.Е. Колесова // Бюлл. экпер. биол. медицины. 2006. Т. 142. № 11. С. 514-516.

3. Ферронский В.И. Изотопия гидросферы / В.И. Ферронский., В.А. Поляков. М.: Наука, 1983. 277 с.
4. Taniguchi K. Phylogenic aspects of the amphibian dual olfactory system / K.Taniguchi, S. Saito, T. Oikawa, K.Taniguchi // J. Vet. Med. Sci. 2008. V.70. P. 1-9.
5. Cong F.-S. Deuterium-depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis / F.-S. Cong, Y.-R. Zhang, H.-C. Sheng et al. // Exp. Ther. Med. 2010. V.1. N 2. P. 277-283.
6. Burd G.D. Development of the olfactory system in the african clawed frog, *Xenopus laevis* // "The Biology of Early Influences" / Ed. R.L. Hyson, J.F. Kluwer. New-York. Academic Plenum Publishers. 1999. P.153-170.
7. Nieuwkoop P. D. Normal table of *Xenopus laevis* / P.D. Nieuwkoop, J.F. Faber. New York-London. Garland Publishing. 1994. 58 p.
8. Kataoka K. Visualization of the *Xenopus* primordial germ cells using a green fluorescent protein controlled by cis elements of the 3' untranslated region of the DEADSouth gene / K. Kataoka, T. Yamaguchi, H. Orii, A. Tazaki, K. Watanabe, M. Mochii // Mech. Dev. 2006. V. 123. N10. P. 746-760.
9. Elepfandt A. Sensory perception and the lateral line system in the clawed frog, *Xenopus* // The Biology of *Xenopus* // Eds. R.C. Tinsley, H.R. Kobel. Oxford. Clarendon Press. 1996. P. 97-120.
10. Bild W. In vivo and in vitro research on the biological effects of deuterium-depleted water: 1. Influence of deuterium-depleted water on cultured cell growth / W. Bild, V. Năstasă, I. Haulică // Rom. J. Physiol. 2004. Vol. 41. N 1-2. P. 53-67.
11. Krempels K. A retrospective evaluation of the effects of deuterium depleted water consumption on 4 patients with brain metastases from lung cancer / K. Krempels, I. Somlyai, G. Somlyai // Integr. Cancer Ther. 2008. V.7. N.3. P. 172-181.
12. Lis G. High-Precision Laser Spectroscopy D/H and  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  Measurements of Microliter Natural Water Samples / G. Lis, L.I. Wassenaar, M.J. Hendry // Anal. Chem. 2008. V.80. N 1. P. 287-293.
13. Fort D.J. Effect of methoxychlor on various life stages of *Xenopus laevis* / D.J. Fort, P.D. Guiney, J.A. Weeks, J.H. Thomas, R.L. Rogers, A.M. Noll, C.D. Spaulding // Toxicol. Sci. 2004. V.81. N.2. P. 454-466.
14. Venus B.V. Functional anatomy of the olfactory system of *Xenopus laevis* / B.V. Venus, J.R. Wolff, G.D. Burd // Soc. Neurosci. Abstr. 1998. V.24. P. 909.
15. Park E.C. Identification and expression of XRTN1-A and XRTN1-C in *Xenopus laevis* / E.C. Park, S. Shim, J.K. Han // Dev. Dyn. 2007. V. 236. N12. P. 3545-3553.



T.N. Burdeynaya, V.A. Poplinskaya, A.C. Chernopyatko, E.N. Grigoryan

## DYNAMIC OF DYE REMOVAL FROM OLFACTORY SYSTEM OF *XENOPUS LAEVIS* TADPOLES BY LIGHT WATER

The heavy water isotopologs effect on dynamic of dye "methylene blue" removal from olfactory system of *Xenopus laevis* tadpoles of two developmental stages has been analyzed. Method of supravital registration of staining density on made photo-images and following treatment of them by means of specially developed computer scripts has been used. Using of animals of different age

(stages 50-51 and 53-54) it was found that independently of olfactory organ developmental stage the light water could much faster remove the dye solved in it as compared with the control water. It was observed in the animal group at the stage 53-54, what is possibly linked with a dynamic of dye removal processes facilitating by a formation of the additional middle cavity of tadpole olfactory system. It was found that the light

water is capable to synchronize the process of dye removal, getting out of high variability in the animal group incubated in the control water. The method we developed for the first time could be used for approval of water properties for clinical needs.

**Key words:** *Xenopus laevis*, olfactory organ, development, light water, removal, computer analysis