



**Одиннадцатая Международная научно-техническая конференция
«Оптические методы исследования потоков»
Москва, 27 — 30 июня 2011 г.**

УДК 579, 262:57.083.13, 537.868

К.Т. Семенов¹, Р.Р. Асланян²

¹Физический факультет МГУ им М.В. Ломоносова

119991, Россия, Москва Ленинские горы, д. 1, стр 2 E-mail: ct.semenov@gmail.com

²Биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

119991, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12 E-mail: rraslan@mail.ru

**ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ
ДЕЙТЕРИРОВАННОЙ ВОДЫ НА ОДНОКЛЕТОЧНЫЕ ЗЕЛЕННЫЕ ВОДОРОСЛИ**

Изучалось воздействие тяжелой воды на культуру одноклеточных водорослей. Прирост клеток оценивался по оптической плотности. Концентрация 0,5% D₂O активировала рост культуры. Концентрации выше 20% ингибировали рост численности клеток.

ТЯЖЕЛАЯ ВОДА, ОПТИЧЕСКАЯ ПЛОТНОСТЬ, ОДНОКЛЕТОЧНЫЕ ВОДОРОСЛИ

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время биологические системы испытывают все большее воздействие негативных факторов окружающей среды одним из которых является вода с повышенным содержанием дейтерия или тяжелая вода. В зависимости от содержания дейтерия различают так называемую тяжелую и легкую воду. В поверхностных слоях воды содержание дейтерия составляет более 16 ммоль/л и более 10 ммоль/л в клетках живых организмах[1].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обнаружено неоднозначное воздействие тяжелой воды на растения и живые организмы. В зависимости от концентрации тяжелая вода может являться как ингибитором, так и активатором различных биологических процессов. В исследовании [2] проведенного для оценки возможности использования D₂O в качестве средства для лечения заболевания рака поджелудочной железы у мышей было показано, что *in vitro* рост опухолевых клеток значительно ингибировался в зависимости от дозы тяжелой воды, в особенности при концентрации 30%.

Дейтерированная вода высокой концентрации может быть весьма токсична. Многие млекопитающие не выживают при замещении нормальной воды более чем на 35 % D₂O. В то же время мыши, принимавшие воду с содержанием 30% D₂O, развивались нормально [3]. В исследованиях с облегченной водой было показано, что присутствие такой воды в опухолевых клетках предстательной и молочной желез, толстой кишки и меланома человека замедляет их рост по сравнению с контролем [1]. Однако из других исследований следует, что при малых концентрация D₂O (менее 10%) происходит активация Na, K-АТФазы и улучшение роста некоторых микроорганизмов [4,5].

Ингибирующее влияние D₂O высокой концентрации сильнее сказывается на ферментативной активности белка при относительно больших содержаниях Na и малых – K. в то время как активирующее влияние D₂O малой концентрации сильнее выражено при малом содержании Na и большом - K. Заметное уменьшение констант активации фермента ионами натрия и калия наблюдается при высокой концентрации тяжелой воды

в растворе, тогда как добавление уже небольшого количества тяжелой воды приводит к уменьшению констант K и Na [6].

По результатам этих эффектов можно говорить о разном характере влияния тяжелой воды на активность фермента в разных ионных условиях при фиксированной ионной силе. Что свидетельствует о том, что наблюдаемый кинетический изотопный эффект не связан с химической стадией ферментно-транспортного процесса, то есть не обусловлен кинетическим изотопным эффектом дейтерия в реакции переноса протона при гидролизе АТФ. Предполагается, что лимитирующей стадией является стадия релаксационных конформационных изменений фермента, либо одна из ионообменных стадий, но не химическая стадия гидролиза.

Эти эффекты объясняются влиянием тяжелой воды как растворителя, при работе Na , K -АТФ-азы происходит дегидратация транспортируемых ионов, натриевые и калиевые центры связывания локализованы в разных областях фермента, различающихся характером взаимодействия с ионами. Поскольку Na , K -АТФ-аза может существовать в двух различных конформационных состояниях, определяемых соотношением концентраций ионов-активаторов в среде [6], тогда различное влияние тяжелой воды на два типа конформеров может быть обусловлено их различной структурой и различным взаимодействием с водой.

При исследовании гидратации катионов был сделан вывод о том, что фазовый переход липидов, приводящий к изменению кажущейся энергии активации реакции гидролиза АТФ липид-белковой ферментативной системой, значительно изменяет физико-химические свойства фермента в целом и подтверждает точку зрения о том, что D_2O влияет на фермент как растворитель, поскольку термодинамические изотопные эффекты тяжелой воды в растворах простых химических веществ обычно увеличиваются с уменьшением температуры [4]. Принципиальное отличие характера изменений констант K и Na при повышенном содержании D_2O подтверждает представление о том, что натриевые и калиевые центры имеют разную физико-химическую природу и локализованы в разных областях фермента.

По-видимому, натриевый центр находится в области, контролируемой водородными связями [4], что согласуется с полученными ранее результатами при изучении действия органических веществ различной полярности на Na , K -АТФ-азу [5].

Целью данной работы было исследование воздействия разной концентрации тяжелой воды на развитие культуры одноклеточных зеленых водорослей *Dunaliella tertiolecta*. Многие виды одноклеточных зеленых водорослей являются важным объектом современной биотехнологии и используются в медицине в качестве ценных лекарственных препаратов. Водоросли применяют также для биологической очистки сточных вод, бытовых и производственных отходов.

Суспензию одноклеточных зеленых водорослей *D. tertiolecta* в стационарной фазе роста помещали в количестве 50 мл в колбы на 100 мл, после чего в культуру добавляли концентрированную тяжелую воду (98%) из расчета окончательной концентрации 0,5%, 2% и 10%. Все колбы инкубировали при 20°C и освещенности 3000 люкс. Пробы отбирали каждые 5 суток. В работе использовали микроскоп Reichert Jung Neovar-2 с набором парафокальных объективов с видеокамерой Интерген, и спектрофотометр НИТАСНІ 150-20. Прирост клеток оценивали по оптической плотности, а затем пересчитывали на число клеток в 1 мл суспензии.

Было установлено, что концентрация D_2O 0,5% в суспензии клеток активировала рост культуры. Число клеток по сравнению с контролем составляло 207%. При концентрации D_2O 2% в суспензии клеток, прирост по сравнению с контролем составлял 158%. Только при концентрации D_2O 10% число клеток снижалось, и было сопоставимо с контролем. Дальнейшее увеличение концентрации D_2O приводило к снижению активационного эффекта и возрастанию степени ингибирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, подтверждаются данные о том, что тяжелая вода может быть не только ингибитором, но в малых концентрациях и активировать биологические процессы. Дальнейшее изучение свойств тяжелой воды и механизма ее воздействия даст возможность использовать эти знания в медицине.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Somlyai G, Molnár M, Laskay G, Szabó M, Berkényi T, Guller I, Kovács A.** Biological significance of naturally occurring deuterium: the antitumor effect of deuterium depletion // *Orv Hetil.* №151(36):1455-1460, 2010.
2. **Omori H, Nio Y, Takeda H, Tamura K.** Application for therapeutic use of deuterium oxide (D₂O) against human pancreatic cancer // *Gan To Kagaku Ryoho.* №23(12): p1665, 1996.
3. **Altermatt HJ, Gebbers JO, Arnold W, Laissue JA** Heavy water (D₂O) inhibits growth of human xenotransplanted oropharyngeal cancers. An animal experiment study in nude mice // *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg).* №66(4):p191-194, 1987.
4. **Лобышев В. И., Калиниченко Л. П.** Изотопные эффекты D₂O в биологических системах // М.: Наука, -215 с. 1978
5. **Денько Е. И.** Действие тяжелой воды (D₂O) на клетки животных, растений и микроорганизмов // *Успехи соврем. биол.,* , № 70, вып. 1, (4), С. 41-64. 1970
6. **Лобышев В. И.** Механизмы термодинамических и кинетических изотопных эффектов D₂O в биологических системах // докт. диссертация, Москва, 1987.

К.Т. Semenov¹, R.R. Aslanyan²

¹*Faculty of Physics M.V.Lomonosov Moscow State University Leninskie Gory, Moscow 119991Russia E-mail: ct.semenov@gmail.com*

²*Faculty of Biology M.V.Lomonosov Moscow State University Leninskie Gory, Moscow 119991Russia E-mail: rraslan@mail.ru*

OPTICAL METHODS FOR STUDY ON EFFECTS OF DEUTERIUM WATER ON UNICELLULAR GREEN ALGA

Effects of heavy water on the culture of unicellular algae were studied. Growth of cells was assessed by optical density. The concentration of 0,5% D₂O activated growth of the culture. Concentrations higher than 20% inhibited the growth of cells

HEAVY WATER, OPTICAL DENSITY, SINGLE-CELLED ALGAE