

# ВПЛИВ ЛІКУВАЛЬНИХ ПРИРОДНИХ МІНЕРАЛЬНИХ ВОД СИНЯЦЬКОГО ТА ГОЛУБИНЬСЬКОГО РОДОВИЩ НА ГЕНО- ТА ЦИТОТОКСИЧНІ ЕФЕКТИ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

**ШЕСТОПАЛОВ В.** Академік, заступник директора Інституту геологічних наук НАН України

**РЯБЧЕНКО Н.** Кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України

**МОІСЕЄВ А.** Кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник Інституту геологічних наук НАН України

*Исследовано влияние лечебных минеральных вод из скв. 4-Е Голубинского и скв. 15-РЕ Синяцкого месторождений на формирование цито- и генотоксических эффектов в клетках костного мозга экспериментальных животных при курсовом употреблении воды и действии ионизирующего излучения. Показано, что употребление животными минеральной воды не оказывало влияния на частоту образования микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга, существенно снижая их уровень при действии ионизирующей радиации*

*Effects of medicinal mineral water from the borehole 4-E of Golubinsk's and borehole 15-PE of Sinyak's on the formation of cyto- and genotoxicity in bone marrow cells of experimental animals after course treatment and action of ionizing radiation is investigated. It is found that the treatment of mineral water did not effect the frequency of micronucleus in polychromatic erythrocytes of bone marrow and essentially decreased their level after irradiation*

**Ключові слова:** мінеральні води, радіомодифікатори, микроядерний тест, цитотоксичність, генотоксичність.

**Ключевые слова:** минеральные воды, радиомодификаторы, микроядерный тест, цитотоксичность, генотоксичность.

**Keywords:** mineral water, radiomodifiers, micronucleus test, cytotoxicity, genotoxicity.

## Вступ

Природні мінеральні води (МВ) завдяки багатоконпонентності складу мають поліфункціональні властивості і можуть застосовуватись для корекції різнопланових порушень в організмі. До переваг використання мінеральних вод слід віднести м'яку пролонговану дію, що дає змогу застосовувати їх за курсовими схемами з великими інтервалами між курсами. Впродовж багатьох років в Україні здійснюються тривалі клінічні та експериментальні дослідження унікальних профілактично-лікувальних властивостей природних мінеральних вод з метою корекції фізіологічних функцій організму. Зокрема, доведено інтенсивну детоксикаційну дію мінеральних вод типу «Нафтуса», що дозволило рекомендувати їх курсове застосування як ефективний патогенетичний засіб для профілактики і лікування радіаційно індукованих порушень здоров'я людей, які проживають на територіях, забруднених радіонуклідами [1].

Разом з тим застосування лікувальних мінеральних вод, як і інших медичних засобів, потребує оцінки їхньої токсичної дії з метою визначення ризику формування клінічних ефектів у людини. На сьогоднішній

день проводяться дослідження генотоксичних властивостей мінеральних і питних вод з різним елементним складом та різними умовами зберігання. Результати окремих експериментів демонструють, що генотоксична дія води може бути зумовлена її зберіганням у ПЕТ-пляшках протягом 2 місяців [15]. У інших дослідженнях зафіксовано відсутність міграції токсичних сполук з матеріалу ПЕТ-пляшки у мінеральну воду, однак виявлено генотоксичні ефекти бутильованої води [10]. У роботі висловлюється припущення, що ці ефекти можуть бути пов'язані з компонентним складом та властивостями самої води. У зв'язку з цим актуальним є дослідження генотоксичної дії нативних природних мінеральних вод, особливо тих, які використовуються в санаторно-курортній практиці для оздоровлення широких верств населення.

Відповідно до рекомендацій Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог щодо визначення генотоксичних речовин та реєстрації лікарських засобів, які застосовуються для лікування людини, микроядерний тест – один з найінформативніших експресних методів оцінки та індикації цитогенетичних пошкоджень, індукованих агентами з клас-

тогенними та анеугенними властивостями, що входить до набору стандартних тестів на генотоксичність [12, 14]. Він полягає у визначенні кількості інтерфазних клітин з мікроядрами (МЯ), які формуються з ацентричних фрагментів або цілих хромосом протягом мітозу внаслідок порушень процесів репарації ДНК або сегрегації хромосом [13]. Найчастіше використовуються популяції клітин, що інтенсивно діляться, а визначення МЯ в поліхроматофілних еритроцитах (ПХЕ) кісткового мозку гризунів визнано найчутливішим серед різних модифікацій тесту для визначення генотоксичних ефектів, індукованих *in vivo*. При цьому зміни у співвідношенні ПХЕ до нормохромних еритроцитів (НХЕ) в популяції клітин кісткового мозку свідчать про ступінь цитотоксичності досліджуваних агентів. На сьогодні мікроядерний тест впроваджено у біологічну дозиметрію променевого ураження організму людини, індикацію генотоксичної дії при розробці нових фармакологічних препаратів, моніторинг негативного впливу мутагенів на екосистеми [2, 11]. В останні роки для оцінки рівня МЯ використовується сучасний автоматизований метод проточної цитометрії, що є альтернативою мікроскопічному аналізу [11]. Метою роботи було дослідження генотоксичної дії природних лікувальних мінеральних вод Синяцького та Голубинського родовищ, а також їх вплив на радіаційно-індуковані пошкодження клітин кісткового мозку експериментальних тварин.

### Матеріали і методи досліджень

Мінеральну воду, досліджену в експерименті, відбирали із св. 4-Е Голубинського і св. 15-РЕ Синяцького родовищ. Голубинське родовище вуглекислих мінеральних вод належить до Свалявської групи родовищ мінеральних вод, розташованої в межах Свалявської і Дехманівської тектоно-магматичних автономних структур у зоні впливу молодого вулканізму. Затверджені експлуатаційні запаси мінеральних вод за сумою категорій становлять 412 м<sup>3</sup>/добу. Мінеральні води Голубинського родовища використовуються у санаторіях «Квітка полонини» та «Кришталеве джерело», а також заводами розливу «Луги» і ООО «Маргіт». Основні показання для застосування: хвороби органів травлення (шлунка, кишечника, печінки, жовчовивідних шляхів, підшлункової залози), сечостатевої та ендокринної систем, порушення обміну речовин та ін.

Синяцька група родовищ сульфідних мінеральних вод приурочена до Свалявської тектоно-магматичної автономної структури. Експлуатаційні запаси мінеральних вод затверджені в кількості 90 м<sup>3</sup>/добу. На базі мінеральних вод родовища функціонує санаторій «Синяк», вода використовується для лікування захворювань органів травлення, професійних захворювань (інтоксикація важкими металами і солями), алергічних захворювань з наявністю імунотоксичного синдрому, хвороб сечостатевої та ендокринної систем.

Аналіз вмісту макрокомпонентів і оцінку якості води проводили згідно з ДСТУ 878–93 [3] за стандартизованими методиками. Вміст сірководню у воді визначали за йодометричним методом [4]. Отримані результати відповідають III категорії точності згідно ОСТ 41-08-212-82 [9]. Вміст мікроелементів у воді визначали за допомогою мас-спектрометра Thermo Finnigan Element–2 з приставкою лазерної абляції New Wave UP-193 SS, похибка вимірювань –  $\delta \leq 3\%$ .

У дослідженні використані самки білих нелінійних щурів віком 3 міс., вагою 180–210 г розводки віварію ІЕПОР ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Було сформовано 6 експериментальних груп по 10 тварин у кожній:

- 1) контроль, інтактні тварини на звичайному водному раціоні (К);
- 2) неопромінені тварини, що вживали мінеральну воду зі св. 15-РЕ Синяцького родовища (СМВ);
- 3) неопромінені тварини, що вживали мінеральну воду Голубинського родовища зі св. 4-Е (ГМВ);
- 4) опромінені тварини (поглинена доза 1 Гр) на звичайному водному раціоні (R);
- 5) опромінені тварини (поглинена доза 1,0 Гр), що вживали мінеральну воду зі св. 15-РЕ Синяцького родовища (R+СМВ);
- 6) опромінені тварини (поглинена доза 1,0 Гр), що вживали мінеральну воду Голубинського родовища зі св. 4-Е (R+ГМВ).

Кожна група знаходилась в окремій клітці з вільним доступом до їжі та води і 12-годинним світловим режимом. Тварин випоювали мінеральною водою протягом 14 днів з моменту опромінення. Опромінення тварин здійснювали на апараті РУМ-17 за наступних умов: напруга 200 кВ, струм 10 мА, шкіряно-фокусна відстань 50 см, поглинена доза – 1,0 Гр.

Через 48 год. та 15 днів після опромінення здійснювали евтаназію піддослідних щурів методом цервікальної дислокації за дії легкого ефірного наркозу. Клітини кісткового мозку вимивали зі стегової кістки за допомогою ЕТС, нагрітої до 37 °С, після чого здійснювали фіксацію клітин. Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до вимог, затверджених комісією з біоетики ІЕПОР НАН України.

Фіксацію і фарбування клітин виконували згідно методик [16, 17]. Аналіз зразків клітин кісткового мозку проводили на проточному цитофлуориметрі Beckman Coulter EPICS XL, обладнаному аргонним лазером потужністю 15 мВт. Визначали наступні показники: пряме світлорозсіювання (FS) з лінійним підсиленням, бічне світлорозсіювання (SSC), флуоресценція ДНК (FL1) з логарифмічним підсиленням при 525 нм, флуоресценція РНК (FL4 log, 675 нм). Одержані гістограми аналізували за допомогою програми WinMDI 2,8. Загальна кількість проаналізованих клітин – близько 150 000. За отриманими контурними гістограмами визначали загальну кількість ПХЕ, рівень ПХЕ, що містять МЯ (на 1000 ПХЕ). Співвідношення ПХЕ до НХЕ визначали за допомогою параметрів FL1 та FL4, аналізуючи близько 70 000 тис. клітин.

Статистичну обробку даних виконували з використанням критерію Ст'юдента для незалежних вибірок за допомогою пакетів програм Microsoft Office Excel 2003 та StatSoft Statistica 6.0. Критичний рівень значущості при перевірці статистичних гіпотез дослідження становив 0,05.

### Результати досліджень та їх обговорення

Отримані дані про макро- та мікрокомпонентний склад використаних у дослідженні мінеральних вод Синяцького та Голубинського родовищ наведено у табл. 1, 2. Вода св. 4-Е Голубинського родовища належить до типу вуглекислих гідрокарбонатних натрієвих вод. За результатами дослідження у воді виявлено підвищений вміст літію (більше 16 мг/дм<sup>3</sup>). У більшості країн поріг бальнеологічно активної нижньої концентрації літію встановлений 5 мг/дм<sup>3</sup>. Це ж значення рекомендується як критерій мінімального вмісту літію у мінеральних водах і в новій класифікації мінеральних вод України [7], тому воду зі св. 4-Е можна віднести до класу літєвих. Раніше літєві мінеральні води через їхню властивість сприяти виведенню з організму сечової кислоти були рекомендовані при подагрі [8]. Згодом, протягом тривалого часу, вони не користувались популярністю, попри те, що літєві препарати застосовувалися у медицині. На сьогодні літєві МВ знову все частіше привертають увагу дослідників та лікарів.

Літій належить до життєво необхідних мікроелементів. Іони літію впливають на транспорт іонів натрію в нервових і м'язових клітинах, внаслідок чого літій виступає як антагоніст іонів натрію. Під впливом літію збільшується внутріклітинне дезамінування но-

радреналіну і зменшується кількість вільного норадреналіну, що діє на адренорецептори в тканинах мозку, посилюється серотонінергічна активність. Таким чином, властивість літію впливати на нейрохімічні процеси у мозку обумовлює його терапевтичну активність при психічних захворюваннях.

Роботами Гарвардської медичної школи доведено, що нестача літію в організмі є однією з причин маніакальної депресії, шизофренії [6]. На сьогодні у відповідних клініках (як вітчизняних, так і закордонних) для лікування цих захворювань успішно використовують літєві препарати – переважно карбонат літію. Імовірно, не менш ефективним може виявитися застосування літєвих МВ, особливо гідрокарбонатних.

Вода св. 15-РЕ Синяцького родовища відноситься до типу сульфатно-гідрокарбонатних кальцієвих вод, сірководневих. Підвищений вміст мангану в обох водах дозволяє віднести їх також до поліметалічних манганових [7]. Манган бере участь у метаболізмі вуглеводів, синтезі та секреції інсуліну, розщепленні амінокислот і утворенні сечовини, синтезі протеогліканів у хрящовій і кістковій тканинах, активації ферментів, включаючи розщеплення гістаміну. На даний час не розроблені рекомендації для застосування мінеральних вод з підвищеним вмістом мангану. Однак за аналогією з медичними препаратами правомірно висловити припущення, що досліджувані води будуть корисні при інтоксикації та для відновлення пулу мангану в організмі.

Значення показників цито- та генотоксичності для кожної експериментальної тварини одержували за допомогою проточної цитометрії нефракціонованих клітин кісткового мозку, манганфарбованих акридинним оранжевим. Генотоксичні ефекти оцінювали за середньогруповими частотами ПХЕ з мікроядрами (на 1000 ПХЕ), а цитотоксичні – за змінами співвідношення між ПХЕ та НХЕ відносно контрольного значення. На рис. 1 представлено типову двопараметричну цитограму зафарбованих клітин кісткового мозку з відміченими кластерами ПХЕ (R2), ПХЕ з МЯ (R3) та НХЕ (R4) за дії іонізуючої радіації.

Результати кількісного аналізу гістограм, одержаних за допомогою комп'ютерної програми WinMDI 2.8, представлені на рис. 2 і 3. При курсовому застосуванні досліджуваних мінеральних вод (випоювання тварин протягом 14 діб) не виявлено статистично достовірних відмінностей між середньогруповими значеннями ПХЕ з МЯ і співвідношеннями ПХЕ та НХЕ відносно групи контролю як у ранні, так і у віддалені терміни спостереження (рис. 2). Це свідчить про відсутність генотоксичного впливу компонентів цих вод на клітини кісткового мозку шурів за даної схеми застосування. Проте під час нашого експерименту в групі тварин, яких поїли мінеральною водою св. 4-Е Голубинського родовища, спостерігалась тенденція до незначного підвищення рівня ПХЕ з МЯ, що може бути зумовлено підвищеним вмістом літію у воді і по-

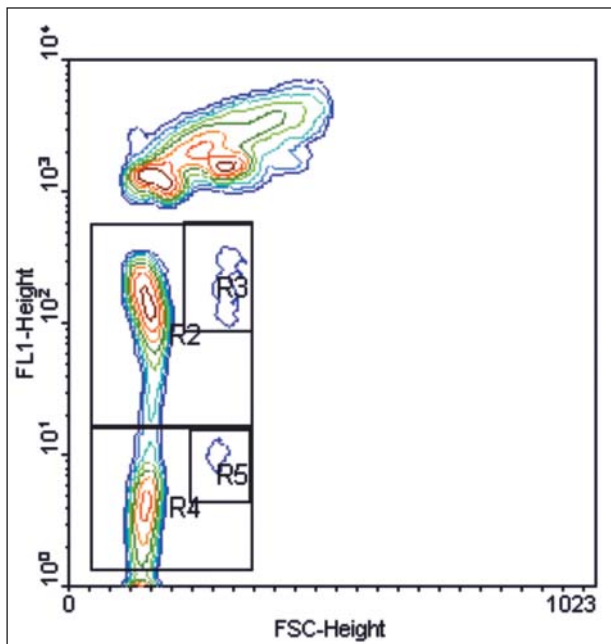


Рис. 1. Цитограма клітин кісткового мозку (зафарбовані акридинним оранжевим), виділені у шурів, опромінені в дозі 1,0 Гр

**Таблиця 1. Макрокомпонентний склад використаних у дослідженні природних мінеральних вод**

Місце відбору проби	pH	Мінералізація, г/дм <sup>3</sup>	Вміст, мг/дм <sup>3</sup> мг-екв, %-екв										Жорсткість, мг-екв		Інші макрокомпоненти, мг/дм <sup>3</sup>	Окиснювальність O <sub>2</sub> , мг/дм <sup>3</sup>
			Na	K	Ca	Mg	NH <sub>4</sub>	Cl	SO <sub>4</sub>	HCO <sub>3</sub>	NO <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	Загальна	Карбонатна		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Голубинське родовище, св. 4-Е	6,60	3,592	800,0 34,8 80,26	23,0 0,59 1,36	132,7 6,62 15,27	38,3 1,08 2,49	5,0 0,27 0,62	39,7 1,12 2,60	8,6 0,18 0,42	2544,5 41,70 96,98	н/в	н/в	7,70	7,70	CO <sub>2</sub> 1320 SiO <sub>2</sub> 21,6	0,88
Сняцьке родовище, св. 15-РЕ	7,55	0,830	22,0 0,95 8,07	2,0 0,05 0,43	190,4 9,50 80,71	12,2 1,00 8,50	5,0 0,27 2,29	4,3 0,12 1,01	460,4 9,58 80,50	134,2 2,20 18,49	н/в	н/в	10,50	2,20	H <sub>2</sub> S 13,6	2,26

\* н/в – не виявлено

**Таблиця 2. Мікрокомпонентний склад використаних у дослідженні природних мінеральних вод**

Місце відбору проби	Вміст, мкг/дм <sup>3</sup>									
	Mn	Cr	Fe	Sr	As	Al	Li	Se		
1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Голубинське родовище, св. 4-Е	136,71	0,03	3,29	645,14	0,02	1,47	16251,2	0,16		
Сняцьке родовище, св. 15-РЕ	398,28	0,03	12,86	756,92	44,26	2,98	507,97	0,08		

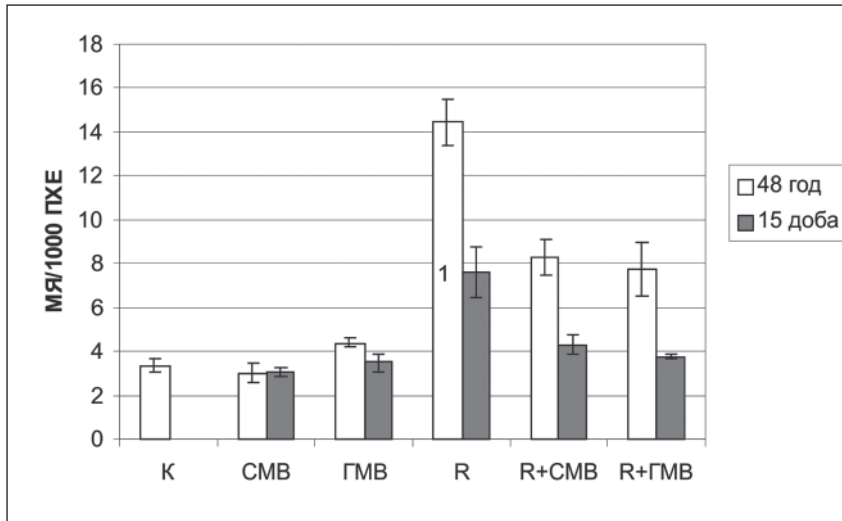


Рис. 2. Середньогрупова частота мікроядер у поліхроматофільних еритроцитах кісткового мозку щурів після курсового випоювання мінеральною водою Синяцького родовища (СМВ), Голубинського родовища (ГМВ), опромінення в дозі 1,0 Гр (R) та курсового випоювання опромінених тварин (R+CMB; R+ГМВ)

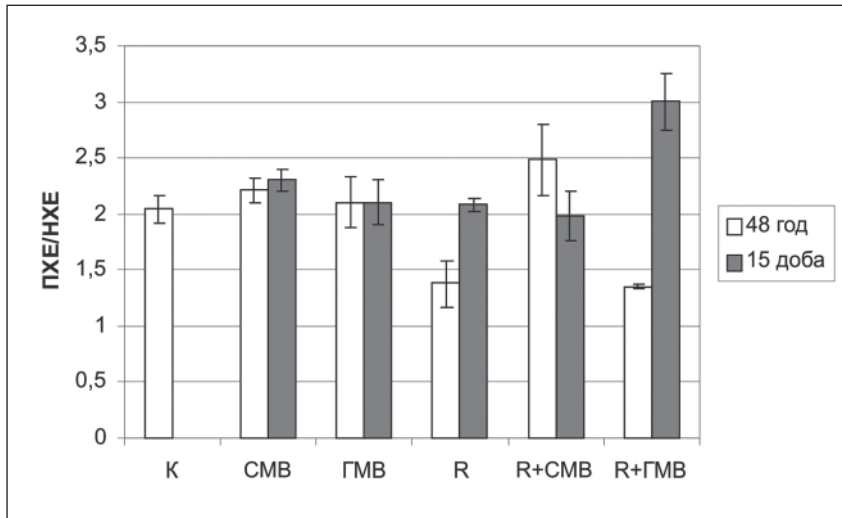


Рис. 3. Середньогрупові значення співвідношення поліхроматофільних еритроцитів (ПХЕ) до нормохромних еритроцитів (НХЕ) кісткового мозку щурів в експерименті. Умовні позначення – див. рис. 2

требує подальших досліджень при більш тривалому випоюванні тварин.

Опромінення в дозі 1,0 Гр призводило до істотного збільшення рівня цитогенетичних пошкоджень клітин кісткового мозку, що спостерігались і у віддалені терміни – на 15 добу після опромінення. При цьому у тварин, яких випоювали мінеральними водами, рівень МЯ уже через 48 год. був у 1,8 (R+CMB) та 1,9 (R+ГМВ) разів нижчим, ніж у опромінених тварин на звичайному водному раціоні. На 15 добу спостереження рівень МЯ в ПХЕ у опромінених тварин, що вживали мінеральну воду, практично не відрізнявся від контрольних значень ( $P > 0,05$ ). У той же час не зареєстровано до-

стовірної різниці між значеннями середньогрупової частоти МЯ в групах опромінених тварин, яких випоювали мінеральними водами, як на 48 год. спостереження, так і на 15 добу ( $P > 0,05$ ). Тобто випоювання тварин мінеральною водою як Синяцького, так і Голубинського родовищ, призводило до значного зниження генотоксичних ефектів рентгенівського опромінення тварин в дозі 1,0 Гр аж до контрольних значень, починаючи з ранніх термінів спостереження.

Зміни у співвідношенні різних пулів клітин кісткового мозку свідчать про цитотоксичну дію різноманітних агентів. Так, зменшення співвідношення ПХЕ/НХЕ в кістковому мозку є показником еритропоетичної супресії. Як видно на рис. 3, за показником ПХЕ/НХЕ досліджувані мінеральні води не справляли цитотоксичної дії на клітини кісткового мозку експериментальних щурів.

Через 48 год. після опромінення в дозі 1,0 Гр спостерігалось вірогідне зниження частки ПХЕ в еритроїдній популяції ( $P < 0,05$ ) порівняно з контролем. Подібний ефект у цей термін зареєстровано і для мінеральної води Голубинського родовища. З часом ці показники в групі опромінення стабілізувалися і на 15 добу не відрізнялися від контрольних значень ( $P > 0,05$ ). У той же час у групі опромінених тварин, яких випоювали водою Голубинського родовища, виявлено істотну стимуляцію еритропоезу та збільшення кількості ПХЕ. При випоюванні опромінених тварин мінеральною водою Синяцького родовища відзначалася рання нормалізація співвідношення ПХЕ/НХЕ, яка з часом не змінювалась і вірогідно не відрізнялась від значень контрольної групи ( $P > 0,05$ ).

### Висновки

Згідно з результатами досліджень, під час курсу випоювання тварин не виявлено *in vivo* генотоксичної дії мінеральних вод св. 4-Е Голубинського родовища та св. 15-РЕ Синяцького родовища на клітини кісткового мозку щурів за показниками мікроядерного тесту. Також не зареєстровано достовірних відмінностей між показниками еритропоетичної цитотоксичності у групі контролю та групах неопромінених тварин, які вживали досліджувану природну мінеральну воду.



Отримані дані свідчать про радіомодифікуючі властивості досліджуваних мінеральних вод, які проявилися в істотному зниженні радіаційно-індукованих цито- та генотоксичних пошкоджень клітин кісткового мозку експериментальних тварин. Механізми радіопротекторної дії можуть бути пов'язані як з прямим впливом окремих компонентів (макро- і мікроелементів, органічних складових) мінеральних вод на процеси репарації генетичного апарату ушкоджених клітин та стан антиоксидних ферментних систем, так і стимуляцією та нормалізацією процесів диференціювання та проліферації клітин кісткового мозку [1]. Однак для підтвердження цих припущень необхідні подальші ретельні дослідження.

1. Біологічні аспекти застосування природних мінеральних вод / А.Ю. Моїсеев, М.О. Дружина, Н.П. Моїсеева, В.М. Шестопапов. – К.: Кім, 2010. – 123 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації; За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 527 с.
3. ДСТУ 878–93. Води питні мінеральні. – [Перевидання, травень 1996]. – К.: Держстандарт України, 1996. – 88 с.
4. ИСО 10530. Сероводород и сульфиды. Фотометрическое определение с диметилпарафенилдиамином.
5. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів. Методичні рекомендації / В.М. Коваленко, О.В. Стефанов, Ю.М. Максимов, І.М. Трахтенберг. – К., 2000. – 43 с.
6. Карпер Дж. Ваши чудесные умственные способности. – Харьков: КСД, 2000. – 286 с.
7. Классификация минеральных вод Украины; Под ред. В.М. Шестопапова. – К.: Макком, 2003. – 121 с.
8. Лозинский А.А. Лекции по общей бальнеологии. – М.: Медгиз, 1949. – С. 22–31.
9. ОСТ 41-08-212-82. Управление качеством аналитической работы. Классификация методов анализа минерального сырья по точности результатов.
10. Comparative assessment of genotoxicity of mineral water packed in polyethylene terephthalate (PET) and glass bottles / Ceretti E., Zani C., Zerbini I. et al. // Water. Res. – 2010. – Vol. 44. – № 5. – P. 1462–1470.
11. Flow cytometric scoring of micronucleated erythrocytes: an efficient platform for assessing in vivo cytogenetic damage / S. Dertinger, D. Torous, M. Hayashi, J. MacGregor // Mutagenesis. – 2011. – Vol. 26. – № 1. – P. 139–145.
12. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (1995) ICH Harmonised Tripartite Guideline. S2A. Guidance on Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals. – <http://www.ich.org>
13. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells / Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T et al. // Mutagenesis. – 2011. – Vol. 26(1). – P. 125–132.
14. OECD Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects. – Paris: OECD Publishing, 1997.
15. Ubomba-Jaswa E., Fernandez-Ibanez P., McGuigan K.G. A preliminary Ames fluctuation assay assessment of the genotoxicity of drinking water that has been solar disinfected in polyethylene terephthalate (PET) bottles // J. Water Health. – 2010. – Vol. 8. – № 4. – P. 712–719.
16. Use of acridine orange in: flow cytometric assessment of micronuclei induction / Criswell K.A., Krishna G., Zielinski D. et al. // Mutation Research. – 1998. – № 414. – P. 63–75.
17. Validation of a flowcytometric acridine orange micronuclei methodology in rats / Criswell K.A., Krishna G., Zielinski D. et al. // Mutation Research. – 2003. – № 528. – P. 1–18.