

ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИ ВОССТАНОВЛЕННАЯ ВОДА: МОДИФИКАЦИЯ ИНКУБАЦИОННОЙ СРЕДЫ И ОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2018 г. А.Г. Погорелов*, В.Н. Погорелова, М.А. Погорелова

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3*

E-mail: agpogorelov@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.06.17 г.

Показано, что инкубационный раствор Дульбекко, приготовленный на электрохимически восстановленной воде, компенсирует оксидативный стресс, вызванный добавлением 0,2 мМ H_2O_2 в среду инкубации. Модифицированный подобным образом инкубационный раствор не влияет на развитие у раннего эмбриона мыши апоптоза, индуцированного добавлением H_2O_2 . Эмбриональная клетка в условиях экспериментальной модели апоптоза показывает наличие характерных морфологических изменений и уменьшение клеточного объема. Указанные апоптотические признаки зарегистрированы с помощью лазерной сканирующей микротомографии.

Ключевые слова: католит, окислительно-восстановительный потенциал, ранний эмбрион мыши, апоптоз, пероксид водорода, количественная лазерная микротомография.

При электролизе воды в камере катода накапливается метастабильная фракция, которую называют католит или ERW (electrochemically reduced water). Для этой фракции характерно щелочное значение pH и отрицательный окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) [1,2]. В отечественной литературе исчерпывающая информация по проблеме электрохимической активации воды представлена в работе В.М. Бахира [3]. Клинические испытания католита показали его лечебные свойства, которые проявились в улучшении состояния желудочно-кишечного тракта [4,5], имели положительный эффект при диабете [6], онкологии [7], нейродегенеративных изменениях [8] и склерозе [9]. Интригу вносит то, что похожими физико-химическими свойствами обладает лечебная вода природного происхождения, например, Nita Tenryosui (Япония) и Nordenau (Германия), или же вода из источников Архыза (Россия). В чем причина таких уникальных свойств католита?

ERW-фракция, показывая отрицательный ОВП, обладает антиоксидантной активностью [10]. Имитация свойств католита посредством насыщения молекулярным водородом водного раствора с заданным щелочным pH

не дала физиологического эффекта. Поддержание антиоксидантного статуса обусловлено, возможно, присутствием наночастиц, которые служат депо и генератором атомарного водорода и/или водород-аниона [1]. В цитируемой работе предположили, что для католита это могут быть наночастицы платины, материал электрода, или минерализованные наночастицы для природной воды. Предполагается, что антиоксидантная активность определяет способность католита компенсировать возрастное накопление активных форм кислорода (АФК) в организме [11]. При всей привлекательности высказанной гипотезы следует учитывать следующее обстоятельство. Католит, прежде чем попадет в ткани, взаимодействует в просвете желудочно-кишечного тракта с секретом, что непредсказуемым образом может изменить его свойства. Другими словами, антиоксидантный потенциал исходной фракции ERW может быть значительно нивелирован в условиях экспериментальной среды. Похожая ситуация возникает в клеточных биотехнологиях, где применяют инкубационные растворы со стабилизированными физико-химическими параметрами. Поэтому цель данной работы состоит в том, чтобы исследовать, в какой степени замена обычной воды католитом модифицирует ОВП физиологической среды. В качестве биологического теста на наличие антиоксидантных свойств у конечного раствора выбрана модель апоптоза,

Сокращения: ERW – электрохимически восстановленная вода (electrochemically reduced water), ОВП – окислительно-восстановительный потенциал, АФК – активные формы кислорода.

Таблица 1. Композиция солей (в мМ), входящих в состав трех физиологических сред, свойства которых тестируются в эксперименте с заменой бидистиллированной воды на католит

Соль	Среда		
	Дульбекко	М16	Тироде
NaCl	136,8	94,7	136,9
KCl	2,68	4,78	5,0
KH ₂ PO ₄	1,47	1,19	–
MgSO ₄	–	1,19	–
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,49	–	0,6
CaCl ₂	0,9	1,71	2,5
NaH ₂ CO ₃	–	25	7,7
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	7,0	–	–
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1,25	–	1,3

индуцированного *in vitro* у раннего эмбриона мыши добавлением пероксида водорода [12,13].

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Результат замены католитом обычной воды в физиологическом растворе изучали на трех известных средах: среде Дульбекко (фосфатный буфер), среде М16 (фосфатно-карбонатный буфер) и среде Тироде (фосфатно-карбонатный буфер). Среда Дульбекко используют для проведения кратковременных экспериментов, не связанных с длительной инкубацией раннего эмбриона мыши. М16 широко применяют при культивировании раннего эмбриона млекопитающих [13]. Раствор Тироде рекомендован для экспериментов, например, на изолированном сердце при перфузии по Лангендорфу. Электродный баланс тестируемых физиологических сред приведен в табл. 1.

Для подготовки физиологических сред (табл. 1) использовали бидистиллированную воду или ее ERW-фракцию (католит). Кислотность и ОВП водного раствора измеряли посредством рН-метра-иономера «Экотест-120» (НПП «ЭКОНИКС», Москва). ОВП регистрировали при помощи платинового электрода ЭПВ-1, рН определяли ионселективным стеклянным электродом, для сравнения использовали хлорсеребряный электрод. Отметим относительно быструю кинетику восстановления ERW-фракции из бидистиллированной воды, ОВП которой в течение первых 15–20 мин увеличивается с –800 мВ до квазистационарного уровня, близкого к –200 мВ. Однако в рамках используемой экспериментальной модели данный временной фактор опосредуется длительностью времени подготовки физиологического раствора и последующей процедурой индуцированного апоптоза.

В качестве теста на биологическую активность исследовали ранний эмбрион мыши NMRI, который инкубировали в физиологической среде Дульбекко в условиях апоптоза, индуцированного добавлением пероксида водорода. Препарат изолированных зигот и двухклеточных эмбрионов подготавливали в соответствии с методикой, описанной ранее [15,16]. Зародыши выделяли из яйцевода согласно опубликованной процедуре [17,18]. Апоптоз индуцировали инкубацией (40 мин) изолированных эмбрионов в среде Дульбекко, содержащей пероксид водорода в концентрации 0,2 мМ [12,13,19].

Принципы и детали подготовки препарата, основанной на сверхбыстрой криофиксации биологической ткани, обсуждали ранее [20,21]. Начальным этапом является криофиксация объекта в жидком пропане (–188°C). Замороженные эмбрионы лиофилизировали в вакууме (~10⁻³ Па) при низкой температуре (–100°C), используя установку MVA 5 (Balzers, Лихтенштейн). По завершении низкотемпературной дегидратации объект заключали в заливочную среду, приготовленную на основе эпоксидной смолы Epon 812. Применение криогенных подходов позволяет сохранить форму, размер и структуру клетки близкими к прижизненному состоянию.

Критерием апоптоза служили характерные морфологические признаки и уменьшение объема клетки, которые регистрировали посредством количественной лазерной микротомографии. Объем зиготы или двухклеточного эмбриона измеряли при помощи количественной трехмерной реконструкции [17,18,22,23]. Препараты изучали в лазерном сканирующем микроскопе Leica TCS SPE (Leica, Австрия) в режиме проходящего света «зеленого» лазера с длиной волны 532 нм. Для этого получали

Таблица 2. Значения pH и ОВП для физиологических сред, подготовленных на бидистиллированной воде или на католите

Физиологическая среда	pH (22°C)		ОВП, мВ	
	Бидистиллированная вода (5,6)	ERW (10,5)	Бидистиллированная вода (470)	ERW (-800)
Дульбекко	7,4	7,4	300	60
М16	7,7	7,7	320	-140
Тироде	7,5	7,5	330	-100

Примечания. Бидистиллированная вода – физиологическая среда подготовлена на бидистиллированной воде, ERW – физиологическая среда подготовлена на католите, полученном из исходной бидистиллированной воды. В скобках указаны значения кислотности или ОВП исходной бидистиллированной воды и ее ERW-фракции.

Таблица 3. Значение критерия оксидантной активности rH_2 для физиологических сред, приготовленных на бидистиллированной воде или на католите

Растворитель	Водная среда				
	Бидистиллированная вода	ERW-фракция	Дульбекко	М16	Тироде
Бидистиллированная вода	28,6	–	27,8	29,1	28,8
ERW-фракция	–	5,4	21,6	17,2	17,6

серию последовательных оптических срезов в вертикальном направлении с шагом 2 мкм. Учитывая низкий контраст полученного цифрового изображения, каждый срез дополнительно обрабатывали по унифицированному алгоритму [24]. На полученной микрофотографии в плоскости среза обводили границу клетки и по серии последовательных контуров получали трехмерную компьютерную модель микрообъекта [25].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Модификация католиком инкубационной среды. В табл. 2 приведены сравнительные данные, которые показывают величины pH и ОВП в эксперименте с заменой бидистиллированной воды на католит при подготовке физиологического раствора.

Анализ данных, представленных в табл. 2, показывает, что кислотность физиологической среды не зависит от того, использовали воду или ее ERW-фракцию при подготовке буферного раствора, но выбор растворителя влияет на величину ОВП. После растворения солевая композиция буфера оказывает разнонаправленное действие на ОВП исходной воды или католита. В результате наблюдаем уменьшение ОВП водного раствора и, наоборот, увеличение ОВП раствора, приготовленного на ERW-фракции. В случае католита ОВП среды Дульбекко даже меняет знак на положительное значение, которое, тем не менее, остается гораздо ниже уровня буферного раствора на воде. Получен-

ные результаты демонстрируют относительное снижение антиоксидантной активности католита в составе физиологической среды, но не позволяют оценить ее оксидантную активность. Для этого использовали унифицированный алгоритм сравнения, основанный на учете концентрации молекулярного водорода в водном растворе [2]. В цитируемой работе после преобразований получают следующее выражение:

$$rH_2 = A \times (E_h + \Delta) + 2pH, \quad (1)$$

где rH_2 – критерий оксидантной активности водного раствора; A – коэффициент пропорциональности (mV^{-1}); E_h – окислительно-восстановительный потенциал (мВ), измеряемый платиновым электродом; Δ – поправка (200 мВ) на хлорсеребряный электрод сравнения с насыщенным KCl при комнатной температуре ($\sim 22^\circ C$); pH – кислотность среды.

Состояние при $rH_2 \approx 28$ рассматривают как редокс-нейтральное (pH 7,2, $E_h = 320$ мВ). Подставляя указанные параметры в выражение (1), определяем, что коэффициент A равен $0,026 mV^{-1}$. В табл. 3 приведены величины критерия rH_2 для исходной бидистиллированной воды и ее ERW-фракции, а также физиологических сред Дульбекко, М16 и Тироде. Значения rH_2 рассчитаны на основе экспериментальных данных (табл. 2) с использованием выражения (1).

По шкале критерия rH_2 раствор считают антиоксидантным в интервале $0 < rH_2 < 28$ и прооксидантным для $28 < rH_2 < 42$ [2]. При сравнении данных (табл. 3) видно, что критерий

Таблица 4. Значение pH, ОВП и индекса оксидантной активности (rH_2) для физиологической среды Дюльбекко, подготовленной на бидистиллированной воде или на католите с добавлением пероксида водорода

	Параметры среды Дюльбекко, содержащей 0,2 мМ H_2O_2		
	pH	ОВП, мВ	Индекс rH_2
Бидистиллированная вода + H_2O_2	7,4	270	27,0
ERW-фракция + H_2O_2	7,4	120	23,1

оксидантной активности бидистиллированной воды, как и физиологических растворов на ее основе, по значению близок к нейтральному состоянию ($rH_2 \approx 28$). Замена воды на ERW-фракцию изменяет статус раствора в сторону антиоксидантного состояния, что в меньшей степени проявляется для среды Дюльбекко. Таким образом, инкубационная среда, модифицированная по католиту, обладает потенциалом к компенсации АФК. Так ли это? В табл. 4 приведены значения кислотности, ОВП и критерия rH_2 для среды Дюльбекко, в которую добавляют пероксид водорода, моделируя апоптоз у раннего эмбриона мыши [12,13,19].

Если сравнить значение критерия rH_2 до и после добавления пероксида водорода (табл. 3, табл. 4), видно разнонаправленное действие АФК на раствор Дюльбекко. Моделирование оксидативного стресса восстанавливает (с 27,8 до 27,0) обычную инкубационную среду, а приготовленную на католите – окисляет (с 17,2 до 23,1). Следует отметить то, что в обоих случаях добавление пероксида водорода оставляет физиологический раствор в области антиоксидантного статуса ($rH_2 < 28$).

Биологическая активность католита в модели индуцированного апоптоза. Биологический эффект ERW-фракции изучали в модели апоптоза, индуцированного добавлением пероксида водорода (0,2 мМ, 40 мин) в раствор Дюльбекко, в котором инкубировали ранние эмбрионы мыши. Предполагалось, что антиоксидантный статус физиологической среды на католите будет купировать апоптотическое действие АФК. Ожидаемый эффект должен отменить появление морфологических изменений, специфичных для апоптоза. На рис. 1 показаны микрофотографии зиготы мыши в норме (рис. 1а) и в состоянии природного (рис. 1б) или индуцированного апоптоза в среде Дюльбекко на католите (рис. 1г).

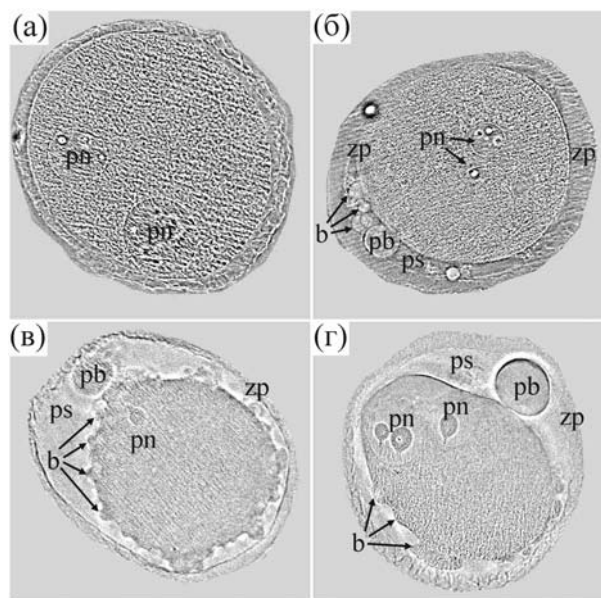


Рис. 1. Изображение одноклеточного эмбриона мыши NMR1 в плоскости оптического среза, полученное посредством количественной лазерной микротомографии. (а) – Контроль; (б) – природный апоптоз; (в) – экспериментальный апоптоз, вызванный добавлением АФК (0,2 мМ H_2O_2 , 40 мин) в обычный раствор Дюльбекко; (г) – экспериментальный апоптоз, вызванный добавлением АФК (0,2 мМ H_2O_2 , 40 мин) в раствор Дюльбекко, приготовленный на католите. Обозначения: b – выросты, pb – полярное тельце, pn – пронуклеус, ps – пространство между оболочкой и клеткой, zp – оболочка эмбриона.

Из микрофотографий видно, что по сравнению со здоровым эмбрионом (рис. 1а) в остальных случаях (рис. 1б–г) присутствует характерный для апоптоза признак – наличие цитоплазматических выростов. Другими словами, вопреки антиоксидантному статусу физиологического раствора на католите апоптоз развивался в присутствии АФК (40 мин, 0,2 мМ H_2O_2). Таким образом, антиоксидантный баланс католита позволяет компенсировать оксидативный стресс, но не предотвращает развитие индуцированного апоптоза.

Каскад событий, их последовательность и причины, а также разные сценарии активации апоптоза являются наиболее обсуждаемыми темами. В этой части можно сослаться на следующие публикации [26–28]. В двух последних работах показано, что сжатие клетки, которое рассматривается в качестве критерия ранней

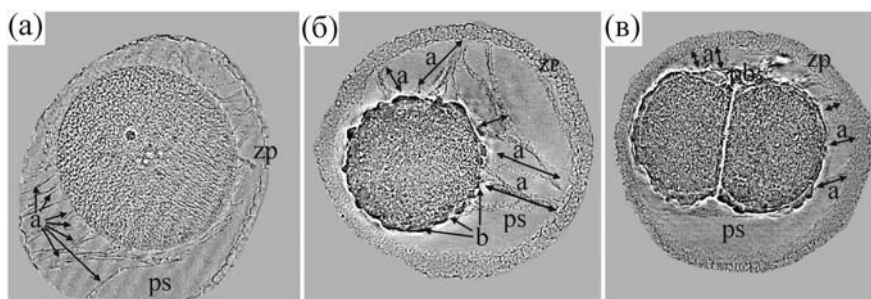


Рис. 2. Микрофотография зрелого ооцита и раннего эмбриона мыши NMRI в состоянии природного апоптоза, изображение получено в плоскости оптического среза. (а) – Сжатый ооцит, (б) – сжатый одноклеточный эмбрион, (в) – сжатый двухклеточный эмбрион. Обозначения: а – филаменты, соединяющие клетку и оболочку эмбриона, b – выросты, pb – полярное тельце, ps – пространство между оболочкой и клеткой, zp – оболочка эмбриона.

стадии апоптоза, предшествует появлению известных морфологических и биохимических признаков [29]. Уменьшение клеточного объема может быть обусловлено, например, выходом ионов калия через K_{2p} из семейства калиевых каналов [30,31]. Эффект сжатия эмбриона мыши при естественном апоптозе иллюстрируют представленные микрофотографии (рис. 2).

Изменение объема эмбриональной клетки *in vivo* (рис. 2) более выражено, чем в лабораторной модели апоптоза (рис. 1). Однако и в последнем случае апоптотическое сжатие визуально определяется как увеличение внеклеточного пространства между зиготой и оболочкой. С целью оценки статистической значимости уменьшения размеров эмбриона провели измерение его объема в эксперименте с индуцированным апоптозом, для чего использовали метод количественной лазерной микротомографии (рис. 3).

На рис. 3 приведены сравнительные данные по измерению объема двухклеточного эмбриона мыши относительно индекса оксидантной активности разных вариантов используемой инкубационной среды Дульбекко. Отметим, что апоптоз развивается в антиоксидантной области индекса rH_2 ($\sim 23 \div 27$), что само по себе неожиданно. Интересно то, что за пределами этого ограниченного диапазона значений как в обычной среде ($rH_2 = 27,8$), так и в среде на катоците ($rH_2 = 21,6$) признаков апоптоза не наблюдается. Если такое влияние субмиллимолярной концентрации пероксида водорода обсуждать в терминах редокс-чувствительного механизма, то следует отметить два предельных значения. Величину rH_2 , близкую к 23, можно рассматривать в качестве чувствительности, т.е. уровня, ниже которого эффект не проявляется. При значении rH_2 выше 27 индуцированный апоптоз отменяется, что может означать десенсibilизацию соответствующего механизма.

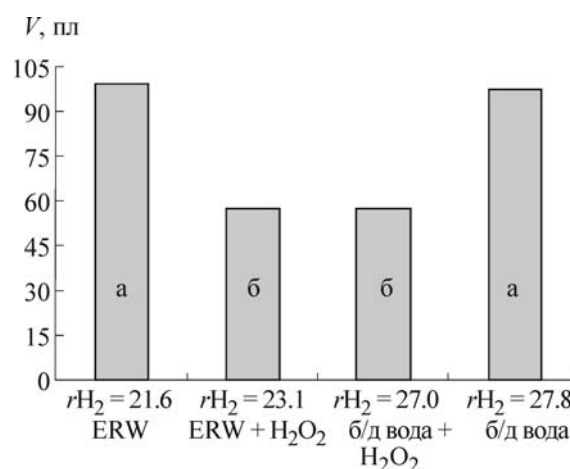


Рис. 3. Объем двухклеточного эмбриона мыши в эксперименте с индуцированным апоптозом (0,2 мМ H_2O_2 , 40 мин). Данные выстроены в зависимости от величины критерия оксидантной активности (rH_2). Обозначения: ERW – среда Дульбекко подготовлена на катоците, б/д вода – среда Дульбекко подготовлена на бидистиллированной воде, + H_2O_2 – в среду Дульбекко добавлен пероксид водорода в концентрации 0,2 мМ, V – объем эмбриона в пиколитрах. Данные в столбцах, у которых не совпадают маркировочные буквы, различаются с уровнем значимости $p < 0,05$. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента при количестве эмбрионов не менее 20 штук в каждой группе.

Мишенью экзогенной молекулы АФК может быть тиоловая группа [18], входящая в состав, например, Cys-петлевых рецепторов. Обсуждая представленные результаты, следует помнить о том, что они получены в экспериментальной модели с относительно коротким интервалом воздействия. Возможно, результат катоцита будет другим при длительном (хроническом) потреблении в условиях, например, просвета тонкой кишки с активными механизмами стабилизации гомеостаза.

Суммируя полученные результаты, можно сделать следующий вывод. Раствор Дюльбекко, приготовленный на католите, компенсирует оксидативный стресс, но не отменяет у раннего эмбриона мыши апоптоз, индуцированный добавлением пероксида водорода (0,2 мМ). Развитие апоптоза в ограниченной области значенной μH_2 позволяет предположить действие экзогенной молекулы H_2O_2 через редокс-чувствительный механизм. В этом случае мишенью молекулы H_2O_2 , возможно, является тиоловая группа Cys-петлевых рецепторов, $\text{K}_{2\text{p}}$ -калиевого канала или VSOAC-подобные транспортеры аниона Cl^- , ответственные за компенсаторное уменьшение объема клетки [31].

Авторы признательны В.М. Бахиру за предоставленную возможность использовать в своих исследованиях установку, созданную им для электролиза бидистиллированной воды в лабораторных условиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 16-16-00020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. Shirahata, T. Hamasaki, and K. Teruya, *Trends Food Sci. & Technol.* **23**, 124 (2012).
2. M. Henry and J. Chambron, *Water* **5**, 2094 (2013).
3. В. М. Бахир, *Электрохимическая активация: изобретения, техника, технологии* (Вива-Стар, Москва, 2014).
4. M. Koseki, Y. Tanaka, H. Noguchi, and T. Nishikawa, *J. Food Sci.* **72**, 298 (2007).
5. H. Tashiro, T. Kitahora, Y. Fujiyama, and T. Banba, *Dig. Absorpt.* **23**, 52 (2000).
6. K. Osada, Y.-P. Li, T. Hamasaki, et al., In *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Ed. by K. Ikura, et al., (Springer, Dordrecht, 2010), vol. 15, pp. 307–313.
7. S. Shirahata, E. Murakami, K.-I. Kusumoto, et al., In *Animal Cell Technology: Challenges for the 21st Century*, Ed. by K. Ikura (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1999), pp. 355–359.
8. T. Kashiwagi, T. Hamasaki, S. Kabayama, et al., In *Animal cell technology meets genomics*, Ed. by F. Godia and M. Fussenegger (Springer, Dordrecht, 2005), pp. 257–259.
9. M. Abe, S. Sato, K. Toh, et al., In *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Ed. by M. Kashiwagi, et al. (Springer, Dordrecht, 2010), vol. 16, pp. 315–321.
10. S. Shirahata, S. Kabayama, M. Nakano, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **234**, 269 (1997).
11. R. M. C. Ignacio, K.-B. Joo, and K.-J. Lee, *J. Food and Drug Analysis* **20** (Suppl. 1), 394 (2012).
12. L. Liu and D. L. Keefe, *Biol. Reprod.*, **62**, 1828 (2000).
13. J. R. Trimarchi, L. Lin, P. J. S. Smith, and D. L. Keefe, *Am. J. Physiol.* **282**, C588 (2002).
14. J. D. Biggers, *Int. J. Dev. Biol.*, **42**, 879 (1998).
15. A. G. Pogorelov, I. I. Katkov, and V. N. Pogorelova, *CryoLetters* **28**, 403 (2007).
16. М. А. Погорелова, В. А. Голиченков, В. Н. Погорелова и др., *Клеточные технологии в биологии и медицине* **3**, 155 (2011).
17. A. G. Pogorelov and V. N. Pogorelova, *J. Microscopy* **232**, 36 (2008).
18. А. Г. Погорелов и В. Н. Погорелова, *Биофизика* **54**, 482 (2009).
19. L. Liu, J. R. Trimarchi, and D. L. Keefe, *Biol. Reprod.* **61**, 1162 (1999).
20. A. G. Pogorelov, B. L. Allachverdov, I. V. Burovina, et al., *J. Microscopy* **12**, 24 (1991).
21. A. G. Pogorelov, I. I. Katkov, E. I. Smolyaninova, and D. V. Goldshtein, *CryoLett.* **27**, 87 (2006).
22. М. А. Погорелова, В. А. Яшин, А. Г. Погорелов и А. А. Голиченков, *Докл. РАН* **418**, 71 (2008).
23. М. А. Погорелова, Д. В. Гольдштейн, А. Г. Погорелов и В. А. Голиченков, *Клеточные технологии в биологии и медицине* **3**, 169 (2009).
24. М. А. Погорелова, В. А. Голиченков и А. Г. Погорелов, *Оптика и спектроскопия* **116**, 167 (2014).
25. М. А. Погорелова, А. И. Панаит и А. Г. Погорелов, *Биофизика* **61**, 528 (2016).
26. D. R. Littler, N. N. Assaad, S. J. Harrop, et al., *FEBS J.* **272**, 4996 (2005).
27. E. Maeno, Y. Ishizaki, T. Kanaseki, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 9487 (2000).
28. T. Shimizu, T. Numata, and Y. Okada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 6770 (2004).
29. Cohen G.M., Sun X.-M., Snowden R.T., Dinsdale D., Skilleter D.N., *Biochem. J.* **286**, 331 (1992).
30. C.-G. Hur, C. Choe, G.-T. Kim, et al., *Reproduction* **137**, 237 (2009).
31. C.-G. Hur, E.-J. Kim, S.-K. Cho, et al., *Reproduction* **143**, 625 (2012).
32. Y. Okada, *Am. J. Physiol.* **273**, C755 (1997).

Electrochemically Reduced Water: Modification of Incubation Medium and Oxidative Activity

A.G. Pogorelov, V.N. Pogorelova, and M.A. Pogorelova

*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Dulbecco's incubation medium prepared using electrochemically reduced water compensates oxidative stress induced by addition of hydrogen peroxide (H_2O_2 , 0.2 mM). An electrochemically reduced water modified incubation medium has no effect on apoptosis induced by H_2O_2 in early mouse embryos. In an experimental model of apoptosis, embryonic cells undergo distinct morphological changes and cell shrinkage. Apoptosis-related changes were detected using laser scanning microtomography.

Keywords: electrochemically reduced water, redox potential, early mouse embryo, apoptosis, hydrogen peroxide, quantitative laser microtomography