

УДК 577.2.04

**ПРЕВЕНТИВНОЕ И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ ВОДЫ С ПОНИЖЕННЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ДЕЙТЕРИЯ НА РАЗВИТИЕ МЕЛАНОМЫ B16***С.С. Обернихин, Н.В. Яглова, С.В. Назимова, В.В. Яглов**НИИ морфологии человека, Москва, Россия***ВВЕДЕНИЕ**

За последние несколько лет в научной литературе резко увеличился объем информации о влиянии воды с пониженным содержанием дейтерия (Deuterium-depleted water, DDW) на различные биологические процессы. Продемонстрированы эффекты DDW на различные физиологические и патологические процессы, такие как депрессия у человека [1], долговременная память у крыс [2], антивозрастные изменения [3], метаболизм глюкозы [4] у экспериментальных животных и человека [5]. Имеются данные о положительных её эффектах при лучевом воздействии. Так, показано, что у мышей, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия, значительно увеличивалась продолжительность жизни при летальном облучении, а также наблюдались более выраженные процессы репарации и усиление клеточного иммунитета у мышей в отдалённые сроки после нелетальных доз лучевого воздействия [6]. Длительное употребление воды с пониженным содержанием дейтерия приводит к снижению степени тяжести лучевых повреждений, обусловленных действием гамма-излучения в низких дозах в условиях ежедневного воздействия [7]. Накоплен значительный опыт о различных эффектах DDW на рост, развитие и прогрессирование опухолей, эффективность химио- и радиотерапии. Во многих работах отмечался противоопухолевый эффект DDW [8,9]. Целью нашего исследования являлось изучение профилактического и терапевтического эффектов потребления воды с пониженным содержанием дейтерия на развитие меланомы B16 у мышей.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.**

Эксперимент выполнен на самцах мышей C57/B16 (n=60) (филиал «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий). За животными, содержащимися в виварии, осуществлялся уход по нормам и правилам обращения с лабораторными животными в соответствии с Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985 г.), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ МЗ РФ от 19.06.2003 г. № 267) и законом «О защите животных от жестокого обращения» (гл. V, ст. 10, 4679-ГД от 01.12.1999 г.). Мыши были распределены на 3 группы. Первая группа (n=20) получала минерализованную дистиллированную воду с обедненным содержанием дейтерия 50ppm (Кубанский государственный университет, Россия) ad libitum со дня инокуляции опухоли, вторая группа (n=20) начала пить такую же воду за 30 дней до инокуляции. Третья группа (n=20) – контрольная, получала минерализованную дистиллированную воду (146 ppm) со дня инокуляции опухоли.

Мышам каждой группы подкожно вводили суспензию  $5 \times 10^5$  мышинных клеток меланомы B16 в 100 мкл среды для культивирования клеток RPMI в правую боковую область. Клеточная линия мышинной меланомы была получена из Коллекции опухолевых клеточных линий НИИ морфологии человека. Жизнеспособность клеток меланомы, оцененная по методу МТТ, составила около 95 %. Через 20 дней после инокуляции у 100 % мышей наблюдалась зрительная и пальпируемая опухоль. Оценивали выживаемость и среднюю продолжительность жизни. Размеры опухоли (продольный и поперечный диаметры) измеряли ежедневно с помощью штангенциркуля и рассчитывали объем опухоли. Индекс торможения роста опухоли (ТРО) рассчитывали следующим образом:  $\text{ТРО} = 1 - \frac{\text{средний объем опухолей в опытной группе}}{\text{средний объем опухолей в контроле}} \times 100 \%$ .

Статистический анализ проводился с использованием программного пакета Statistica 7.0 (StatSoft, США). Логарифмический тест использовали для сравнения кривых выживаемости. Центральная тенденция и дисперсия признаков с приблизительно нормальным распределением были представлены как среднее и стандартная ошибка среднего ( $M \pm m$ ). Количественные сравнения независимых групп были выполнены с использованием критерия Стьюдента с учетом значений критерия Левена для равенства дисперсий и  $\chi^2$ . Различия считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

У мышей-опухоленосителей, потреблявших дистиллированную воду, выживаемость равномерно снижалась после прививки опухолевых клеток. Минимальная продолжительность жизни составила 31 суток, максимальная – 50 суток. Средняя продолжительность жизни в этой группе составляла  $41.33 \pm 2.22$  суток. У мышей-опухоленосителей, потреблявших воду с пониженным содержанием дейтерия с момента прививки опухолевых клеток, также отмечалось постепенное уменьшение продолжительности жизни. Минимальная продолжительность составила 25, максимальная – 50 суток. Средняя продолжительность жизни в этой группе составляла  $38.83 \pm 2.69$  суток. У мышей-опухоленосителей, начавших потреблять воду с пониженным содержанием дейтерия за 30 дней до прививки опухолевых клеток, как и в предыдущих группах отмечалось постепенное уменьшение продолжительности жизни. Минимальная продолжительность составила 45, максимальная – 100 суток. Средняя продолжительность жизни в этой группе статистически значимо превысила значения двух предшествующих групп и составила  $70.10 \pm 7.44$  суток. Вскрытие животных после гибели показало наличие не только солидной опухоли, но и множественных метастазов в органы грудной и брюшной полости. Изучение торможения роста опухоли в группах с различными режимами потребления воды с пониженным содержанием дейтерия показало, что у животных, получавших воду с момента посадки опухоли, отмечалось замедление роста опухоли по сравнению с группой, потреблявшей дистиллированную воду, вплоть до 25-х суток. Затем торможение роста опухоли уменьшалось и после 45-х суток рост опухоли был более выражен, чем у животных, потреблявших дистиллированную воду. У мышей, начавших потреблять воду с пониженным содержанием дейтерия за 30 суток до имплантации опухоли, торможение роста опухоли было более высоким и стабильным.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Меланома B16, линия опухолевых клеток мыши, часто используется для изучения образования солидных опухолей из-за высокого злокачественного потенциала. Клетки меланомы могут начать распространяться даже на ранних стадиях развития опухоли, поэтому они также используются для моделирования метастазирования [10]. Мыши в контрольной группе показали сходную скорость образования опухоли после инокуляции клеток меланомы. Анализ выживаемости показал, что 50 % контрольных мышей умерли на 41-й день после инъекции опухолевых клеток, и средняя продолжительность жизни также составила 41 день. Это доказывает, что прогрессирование опухоли и метастазирование у контрольных животных имели одинаковую скорость. Многочисленные метастазы, обнаруженные при посмертном обследовании мышей, считаются основной причиной смерти.

В последние несколько лет все больше свидетельств указывает на то, что истощение дейтерия в плазме оказывает положительное влияние на предотвращение прогрессирования рака. Недавние исследования показали, что низкий уровень дейтерия способствует ингибированию пролиферации раковых клеток *in vitro* и *in vivo* [11,12]. В настоящее время предприняты серьёзные попытки объяснить биологические эффекты изотопов различных элементов в организме [13]. Однако, изменение баланса между уровнями изотопов водорода, а именно протия и дейтерия в организме млекопитающих продемонстрировало неожиданные биологические эффекты, механизмы которых до сих пор плохо изучены из-за недостатка знаний о специфической роли дейтерия в метаболизме. Истощение дейтерия, которое началось с момента трансплантации опухоли, не изменило параметры выживаемости у мышей, за исключением минимальной продолжительности жизни. Выживаемость 50 % животных, получавших DDW, и их средняя продолжительность жизни также были одинаковыми. Более продолжительная минимальная продолжительность жизни и значительное ингибирование роста опухоли в течение 15 дней после образования солидной опухоли указывают на то, что истощение дейтерия каким-то образом предотвращало быстрый рост опухоли на начальной стадии. Это соответствует данным S. Paryadzanjani et al., что потребление DDW снижает скорость роста меланомы F10 у мышей C57Bl/6 в течение 30 дней после трансплантации [14]. Наши данные показывают, что противоопухолевый эффект истощения дейтерия постепенно снижается через 25 дней после инокуляции опухоли. Месяцем ранее замена водопроводной воды на DDW значительно повысила все показатели выживаемости. Более длительная продолжительность жизни и более высокие показатели ингибирования роста опухоли доказывают, что пониженное содержание дейтерия к моменту инокуляции опухолевых клеток ингибировало как рост опухоли, так и метастазирование. Стабильное подавление роста меланомы в течение 50 дней после трансплантации может быть опосредовано ингибированием пролиферации или активацией апоптоза опухолевых клеток [15].

Возможно, оба механизма были задействованы. Известно, что замена обычной воды на DDW с содержанием дейтерия менее 50 ppm в течение одного месяца значительно снижает концентрацию дейтерия в организме [16], а увеличение продолжительности потребления DDW усиливает его физиологические эффекты [17]. Таким образом, различия в показателях ингибирования роста опухоли у мышей с различными режимами потребления DDW демонстрируют зависящий от времени эффект истощения дейтерия.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Следует отметить, что наши результаты демонстрируют то, что истощение дейтерия оказывает противоопухолевый эффект, подавляя рост опухоли и метастазирование. Но развитие противоопухолевого эффекта требует предварительного истощения содержания дейтерия. Это свидетельствует о том, что противоопухолевый эффект зависит не только от степени истощения дейтерия. Комплекс физиологических изменений, вызванных истощением дейтерия, вероятно, также обусловлен ослаблением роста опухоли. Для изменения физиологических параметров требуется определенный период времени, поэтому только предварительное истощение дейтерия продемонстрировало противоопухолевый эффект.

*Исследование частично выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-015-00236 А.*

### ЛИТЕРАТУРА

1. Strelakova T., et al. Deuterium content of water increases depression susceptibility: The potential role of a serotonin-related mechanism // *Behav. Brain Res.* – 2015. – V. 277. – P. 237–244. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.039
2. Mladin C., et al. Deuterium Depleted Water has stimulating effects on long-term memory in rats // *Neurosci. Lett.* – 2014. – V. 583. – P. 154–158. doi: 10.1016/j.neulet.2014.09.037
3. Ávila D.S., Somlyai G., Somlyai I., Aschner M. Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a *C.elegans* model. // *Toxicol. Lett.* – 2012. – V. 211. – P.319–324. doi: 10.1016/j.toxlet.2012.04.014
4. Molnár M., Horváth K., Dankó T., Somlyai G. Effect of deuterium oxide (D<sub>2</sub> O) content of drinking water on glucose metabolism on STZ-induced diabetic rats; Proceedings of the 7th International Conference Functional Foods in the Prevention and Management of Metabolic Syndrome; North Charleston, SC, USA. 4–5 December 2010. – P. 154–155.
5. Somlyai G., Somlyai I., Főrizs I., Czuppon G. Papp A, Molnár M. Effect of Systemic Subnormal Deuterium Level on Metabolic Syndrome Related and other Blood Parameters in Humans: A Preliminary Study // *Molecules.* – 2020. – V. 25. – N. 6. – P. 1376. doi: 10.3390/molecules25061376.
6. Синяк Ю.Е. Первый международный симпозиум по "бездейтериевой" воде // *Авиакосмическая и экологическая медицина.* – 2010. – Т. 44. – № 4. – С. 66–67.
7. Раков Д.В. Влияние воды с пониженным содержанием дейтерия и кислорода <sup>18</sup>O на развитие лучевых повреждений после гамма-облучения // *Авиакосмическая и экологическая медицина.* – 2007. – Т.41. – № 3. – С. 36–39.
8. Cong F.S., Zhang Y.R., Sheng H.C., Ao Z.H., Zhang S.Y., Wang J.Y. Deuterium-depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis // *Exp. Ther. Med.* – 2010. – N1. – P. 277–283. doi: 10.3892/etm\_00000043.
9. Gyöngyi Z, et al. Deuterium depleted water effects on survival of lung cancer patients and expression of Kras, Bcl2, and Myc genes in mouse lung. // *Nutr Cancer.* – 2013 – v. 65 – N2 – P. 240–246. doi: 10.1080/01635581.2013.756533
10. Giavazzi R, Decio A. Syngeneic murine metastasis models: B16 melanoma. // *Methods. Mol. Biol.* – 2014. – N.1070. – P. 131–140. doi: 10.1007/978-1-46-14-8244-4\_10
11. Yavari K, Kooshesh L. Deuterium depleted water inhibits the proliferation of human MCF7 breast cancer cell lines by inducing cell cycle arrest // *Nutrition and cancer.* – 2019. – V.71. – N.6. – P.1019–1029. doi: 10.1080/01635581.2019.1595048
12. Hassanzade A, Mandegary A, Sharif E, Rasooli R, Mohammadnejad R, Masoumi-Ardekani Y. Cyclooxygenase inhibitors combined with deuterium-enriched water augment cytotoxicity in A549 lung cancer cell line via activation of apoptosis and MAPK pathways. // *Iran J. Basic Med. Sci.* – 2018. – V. 21. – N.5. – P. 508–516. doi: 10.22038/IJBMS.2018.25366.6269.8
13. Basov A, Fedulova L, Vasilevskaya E, Dzhimak S. // *Molecules.* – 2019. – V.24. – N.22. – P. 4101. doi: 10.3390/molecules24224101
14. Paryad-zanjan S, Mahjoob MJ, Amanpour S, Kheirbakhsh R, Haji Akhoundzadeh M. A supplemental treatment for chemotherapy: control simulation using a mathematical model with estimated parameters based on in vivo experiment. // *IFAC-PapersOnLine* – 2016. – V.49. – N.26. – P.277–282. doi: 10.1016/j.ifacol.2016.12.138
15. Cong F, Laskay G, Somlyai G, Jakli G. Effects of deuterium depletion on proliferation and apoptosis in cultured murine haemopoietic cells. // *Eur. Chem. Bull.* – 2012. – V.1 – N.1 – P.44. doi: 10.17628/ecb.2012.1.39–47
16. Artsybasheva O, Barysheva E, Shashkov D, Vlasov R, Tekutskaya E. Changes of oxidation during use the food diet with deuterium depleted water in laboratory animals with purulent inflammation. // *Russ. Open Med. J.* – 2014. – V. 3. – art.0201.
17. Lisitsyn AB, Baryshev MG, Basov AA, Barysheva EV, Bykov IM, Dydykin AS, et al. Influence of deuterium depleted water on the organism of laboratory animals in various functional conditions of nonspecific protective systems // *Biofizika.* – 2014. – V.59. – N.4. – P. 757–765.