W. Bild, V. Bild, I. Haulica:

ENVIRONMENTAL DEUTERIUM AND CELL PROLIFERATION: IMPLICATIONS IN RADIOBIOLOGY

**Дейтерий в естественной среде и пролиферация клеток:**

**внедрение в радиобиологию**

Итак, цель изучения воды со сниженной концентрацией дейтерия – проверить, может ли она оказывать эффект защиты от радиации.

Есть небольшая предыстория: я изучал вопрос радиопротекции, и мне нужно было найти ещё не исследованную субстанцию, которая могла бы иметь радиозащитный эффект. И в определённый момент мне посчастливилось прочесть документ, содержащий информацию о способности тяжёлой воды имитировать круговые радиоволны – это означает, что долгое употребление тяжёлой воды оказывает эффект, аналогичный ионизирующему излучению. Поэтому я подумал: если есть такая вещь как вода со сниженной концентрацией дейтерия – почему бы мне не использовать её и не проверить, может ли она защищать от радиации?

Сперва я хотел бы упомянуть о некоторых вещах, связанных с ионизирующим излучением – как радиация осуществляет разрушение. 1) Она разрушает с помощью вещи, называемой «радиолиз воды» - он разлагает воду и производит окисленные продукты реакции, которые позже разрушают мембраны клеток и оказывают вредоносное влияние. 2) Конечно же, повреждения молекул в различных энзиматических системах клеток. 3) Повреждения ДНК, последствия которых – эффекты мутации и неоплазии. 4) Снижение иммунитета, которое, как всем известно, разрушает все быстро восстанавливаемые ткани в организме. Оно происходит из-за истощения гематогенного костного мозга и разрушения клеток, которые отвечают за производство иммунных клеток. 5) Истощение гематогенного костного мозга, что может привести к анемии, лимфопении, тромбопении и т.п. 6) Апоптоз, вызванный радиацией.

Итак, посмотрим на данные… Нормальное соотношение дейтерия и водорода составляет 140-145 частей на миллион. Изменение соотношения может привести к повышению содержания дейтерия (к образованию тяжёлой воды) или к понижению – и это произведёт определённые биологические эффекты.

Итак, если эффекты действительно присутствуют:

Мы знаем, что радиация приводит к смерти через так называемый гематологический синдром; панцитопению (низкое содержание всех форменных элементов крови); гастроинтестинальный синдром (гастроинтестинальная мукоза – самая быстровосстанавливаемая ткань в организме) – радиация замедляет процесс восстановления и приводит к атрофии мукозы, язвам, фистулам, инфекциям, которые постепенно приводят к смерти животного, над которым ставится эксперимент, или человека, подвергаемого облучению.

Теперь давайте посмотрим, как могут проявляться эффекты защиты от радиации. Мы собираемся изучить, срабатывает ли какой-либо антиокислительный механизм – поэтому проводим тест на наличие антиокислительной активности энзим и перекисное окисление липидов (усиливается ли оно или редуцируется). Так же нужно проверить, происходит ли стимуляция восстановления клеток, помогающая организму заменить истощённые радиацией клетки и повысить иммунитет. Мы можем протестировать признаки повышения иммунитета путем модулирования и оценки иммунной системы и введения в организм животного экспериментальных инфекций (радиоактивных или нет). И после этого мы можем увидеть, происходит ли стимуляция иммунитета путём замещения повреждённых клеток новыми, образованными с помощью лёгкой воды; можем увидеть, происходит ли стимуляция культивируемых клеток; используются ли в культивации селезёночные иммунные клетки. Мы так же попробуем протестировать механизмы мембран клеток, участвующих в восстановлении.

Что мы сделали: итак, сначала посмотрим, произошли ли какие-то изменения в организме, получившем лёгкую воду. Литература говорит о том, что после 2 недель постоянного потребления лёгкой воды, количество всей воды в организме изменится. Значит, мы должны подождать 2 недели, или, может, 15-20 дней, прежде чем лёгкая вода начнёт производить свой эффект. Что делали мы: в течение долгого времени давали крысам употреблять лёгкую воду, после этого же мы брали у них кровь, образцы мускулов, печени и т.д., далее выделяли воду из всех этих тканей и исследовали её на предмет количества дейтерия в жидкостях организма. Это было сделано несколькими способами на факультете медицины в Румынском Университете. И что мы обнаружили: вне зависимости от того, в течение какого времени мы давали крысам лёгкую воду (30 ppm), мы не смогли понизить содержание дейтерия в организме более чем на ~19% ppm.

Вот сводная таблица данных. Контроль – нормальная концентрация дейтерия – 140-145 ppm дейтерия. И после употребления крысами лёгкой воды в течение 2-3 недель, концентрация дейтерия в их мускулах и печени понизилась примерно до 90 ppm. Это хороший благоприятный результат, но в то же время он означает, что мы не можем радикально понизить количество дейтерия в организме.

Теперь тест на выживание при воздействии радиацией. Мы использовали 380 животных, швейцарских мышей, самцов, весом 15-20 г. Эксперименты проводились в течение 2 лет поэтапно. Использовался специально приготовленный сухой корм, лёгкая вода или дистиллированная вода - по вкусу. Мыши имели возможность пить столько воды, сколько им хотелось. Они получали лёгкую воду с концентрацией дейтерия 27-30 ppm или дистиллированную воду – 145-150 ppm. Кормление и питьё осуществлялось минимум 14 дней до облучения. У нас было 2 тестовых группы: мыши, получавшие лёгкую воду до и после облучения (Группа 1, Г1) и мыши, получавшие её лишь до (Группа 2, Г2) – вторая группа более не получала лёгкую воду после облучения. Мы так же попытались сформировать третью группу, которая получала лёгкую воду только после облучения, но это оказалось бессмысленным и никакого эффекта не наблюдалось. Полное облучение было произведено с помощью гамма-лучей; так же была группа особей, получившая облучение с помощью химикатов, оказывающих эффект, аналогичный радиации (этими химикатами являлись эмбихин гидрохлорида и дериват нитрогена мустарда, очень ядовитая субстанция). Степень радиоактивности варьировалась от 6,5 до 9,5 греев (650-950 рад). Мы так же наблюдали за некоторыми группами, получившими дозу классического радиопротектора – амифостина.

Что мы обнаружили: перед вами статистические данные о выживаемости 3 наблюдаемых групп. Среднестатистическая выживаемость мышей после облучения составляет 55%; выживаемость же Г1 составила 80%, а Г2 – 78,4 %. Это означает, что употребление лёгкой воды в течение 2 недель до облучения повышает выживаемость. Так же нескольким группам мышей сверх этого мы давали амифостин – здесь вы можете увидеть результаты этого эксперимента. И можно заметить, что комбинация лёгкой воды с радиозащитным химикатом оказывает незначительное влияние, никакого синергизма или дополняющего эффекта.

Это, возможно, может означать, что они не работают по одинаковой схеме. Мы знаем, что амифостин – поглотитель свободных радикалов, он поглощает свободные радикалы из жидкостей, а лёгкая вода, возможно, функционирует совсем другим образом.

 Итак, если смотреть на результаты облучения эмбихином гидрохлорида – мы можем увидеть, что в тестируемых группах значительно увеличился показатель выживаемости по сравнению со среднестатистическим. Это означает, что мыши оказались защищены и от облучения химикатами, идентичными радиации.

Итак, мы увидели пример оказываемого эффекта и теперь можно посчитать порог дозы – числовой эквивалент количества радиации, которое сможет быть редуцировано. Порог дозы был вычислен – 1,41.

Добавление химического радиопротектора (амифостина) несущественно повысило выживаемость. Отсутствие синергизма (взаимного усиления действия) или какого-либо дополняющего эффекта даёт возможность предположить, что механизмы их действия не различаются или что защита от радиации имеет определённый порог, который невозможно более повысить – это не моя идея, а идея одного из профессоров института. В определённый момент перестаёт иметь значение, сколько биологической защиты мы предоставляем организму – мы не можем защитить организм животного или человека от ионизирующего излучения всецело. Поэтому мы не имеем возможности сохранить его. Порог дозы – 1, 41. Это не большое число, если сравнить, к примеру, с порогом дозы амифостина (1,81). Но нужно помнить, что амифостин – очень ядовитая субстанция – и она должна быть введена в организм в первые же минуты после облучения, чтобы возыметь какой-то эффект. И мы не можем употреблять амифостин в течение долгого времени, т.к. он является дериватом и сильным вазодилататором, он гепатотоксичен – он защитит нас от некоторых эффектов радиации, но может убить, разрушив печень.

Итак, что мы видим. Мы протестировали кишечную мукозу. В контрольной группе мы наблюдали так называемый некротический энтерит с вакуолярным цитолизом и потерей микровилли. Восстановление клеток на поверхности кишечника сильно замедлилось. Это означало, что в этой области клетки разрушались, уничтожались и оставляли дыры на поверхности, что приводило к диарее с кровяными выделениями; микробы могли свободно проникать внутрь кишечника. На фоне этого радиация так же стимулировала подавление иммунитета и способствовала развитию септицемии, от этого животное умирало.

В то же время, если мы посмотрим на данные о группе, получавшей лёгкую воду и облученной радиацией в 7,5 греев – мы увидим, что разрушение клеток кишечника присутствует, но потеря микровилли и количество некротического эффекта меньше. Это означает, что данная группа была в той или иной мере более защищена.

Мы так же обследовали печень мышей. Что мы увидели: в группе, получавшей обычную воду, наблюдается разрушение структуры органа, области некроза и апоптоза – печень совершенно не выглядит здоровой. Мы видим здесь истощённые клетки, признаки апоптоза. А в группе В структура печени не нарушалась и не наблюдалось признаков некроза.

Так же анализ гематогенного костного мозга – мы брали его образцы из костей и вот что увидели. В группе А – потеря целлюлярности. Это означает, что происходило разрушение кровяных клеток, что является предвестником возможного разрушения и самого костного мозга.

Мы попробовали протестировать антиокислительные механизмы. Мы обнаружили сокращённое и статистически малозначительное повышение активности супероксиддисмутазы в печени и отсутствие эффекта на мозг. Содержание малондиальдегида (признак перекисного окисления липидов) значительно понизилось в мозге и осталось неизменным в печени. Несущественно сократилось количество глутатиона и –SH групп в целом. В общем и целом, можно сказать, что употребление лёгкой воды не оказывает антиоксидантного эффекта.

Итак, давайте посмотрим на исследование иммунологии. Сперва мы исследовали гематологический аспект путём вычисления количества белых и красных кровяных телец при помощи лейкоцитной формулы. Далее мы рассчитали количество T-лимфоцитов и B-лимфоцитов; затем проанализировали процесс фагоцитоза: - анализ фагоцитоза в нейтрофилах периферической крови; - анализ фагоцитоза брюшных макрофагов; - серологическая диагностика. Тест совсем несложный: берется некоторое количество микробов и помещается в контакт с сывороткой крови животного, затем субстанция вводится в другой сосуд. Если она разрушается, микробы растут медленнее, если нет – в обычном порядке. Итак, что мы наблюдали… фагоцитоз в периферической крови усилился, активность сыворотки крови также повысилась. Мощность фагоцитоза повысилась путём выброса меньшего количества шлака от микробов, которых мы использовали для опыта – это означает, что микробы были убиты брюшными макрофагами. Это очень хороший результат, показывающий, что организм был способен бороться с инфекциями.

Группа, получавшая лёгкую воду в течение двух недель, показала существенно большее количество лейкоцитов в крови, чем контрольная группа. В то же время, это количественное увеличение не приводило к лейкоцитозу – это означало, что не наблюдалось эффекта воспаления.

Употребление лёгкой воды не оказало существенного влияния на количество Т-лимфоцитов. Количество и активность В-лимфоцитов повысились, но несущественно. Лёгкая вода стимулировала мощность фагоцитоза полиморфоядерных лейкоцитов в периферической крови. Мощность фагоцитоза брюшных макрофагов также повысилась – это и есть тот самый эффект, о котором я говорил ранее.

Далее мы попробовали несколько стандартных исследований клеток. В отличие от результатов, которые мы наблюдали ранее, итак, что мы увидели… мы исследовали 3 типа клеток, которые были нам доступны в то время: почечная аденокарцинома мыши, аденокарцинома молочной железы (также у мыши) и стандартные фибробласты. Итак, что мы делали: мы использовали стандартный способ содержания клеток, но постепенно увеличивая в среде концентрацию лёгкой воды. И что пронаблюдали: в течение первых 3-4 дней количество клеток и уровень размножения клеток значительно повысились. Посмотрите, насколько выросли клетки – 90 ppm по сравнению с нормой. Росли и опухолевые клетки, аденокарциномы, и фибробласты, клетки с совершенно другой конфигурацией.

Пример, как это всё выглядит после 48 часов: в лёгкой воде выходит за рамки нормы, в простой же воде – стандартное возрастание в 2 раза.

Уровень размножения был повышен, а время, требуемое на размножение, сократилось – это означает, что клетки в целом размножались быстрее (время показывает скорость пролиферации). Также, что мы делали: у нас были не подвергавшиеся ранее опытам мыши, мы извлекли спленоцитов из их организма и поместили под действие химических стимуляторов, таких как бактериальный липополисахарид и конканавалин А – и это простимулировало рост клеток, конечно же, в специфичной среде – в деионизированной воде и лёгкой воде. Что мы пронаблюдали: клетки мышей из групп, получивших конканавалин А в среде лёгкой воды, росли очень быстро по сравнению с нормой (среднестатистическая группа здесь отмечена фиолетовым). В группе, получившей липополисахарид, клетки так же росли быстрее, уровень пролиферации естественных спленоцитов был повышен. Итак, в чём вывод данного эксперимента.

- пролиферация клеток значительно повышалась

- этот эффект наблюдался как в обычных клетках (фибробластах), так и в опухолевых (аденокарцинома почки и молочных желёз)

- рост и метаболизм спленоцитов повышался за счёт лёгкой воды в обеих группах, но в случае липополисахаридной стимуляции эффект был статистически малозначителен

- однако использование конканавалина А в качестве стимулятора пролиферации естественных спленоцитов дало существенный результат и особенно сильный прогресс.

Итак, мы задумались: чем это может быть вызвано? И мы подумали о том же самом, о чём говорилось ранее – это однозначно связано с передвижением протонов в мембране.

Что мы сделали: мы поместили клетки в специальный замедлитель реакции, амилорид (ингибитор протонов натрия) – и обнаружили, что не произошло каких-либо существенных изменений в росте.

- один тип клеток (мышиная аденокарцинома молочных желёз) имела одинаковый уровень роста в обеих средах, разница в пролиферации была статистически несущественна. Хотя, однажды я читал, что это может происходить из-за того, что наличие устойчивого к амилориду NHE-3 в изучаемых линиях клеток делает амилорид ненужным.

- возможность того, что перемещение протонов водорода и натрия причастно к пролиферации клеток, вызванной снижением концентрации дейтерия в среде, мала

Мы попробовали протестировать и другой блокатор, блокатор сульфгидрильных групп – лансопразол, который часто используется для лечения язв, т.к. он блокирует протонную помпу в брюшной полости и сокращает концентрацию соляной кислоты в желудочном соке. Итак, мы использовали эту субстанцию, и что было обнаружено – лансопразол практически устранил разницу в пролиферации клеток у группы в среде дистиллированной воды и группы в среде лёгкой воды. Разницы больше не было. Это означает, что эффект облегчения воды был устранён. И это даёт возможность предполагать, что сульфгидрильные группы участвуют в процессе стимуляции пролиферации клеток лёгкой водой. Мы не знаем, как именно это происходит, т.к. эксперимент ещё не завершён по причине нехватки материалов для его проведения.

Очень хорошей идеей было бы использовать для эксперимента метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp), чтобы контролировать разность потенциалов между сторонами мембраны, но эксперименты с применением этого метода очень дорогие и для них требуется масса оборудования, поэтому у нас не было возможности провести их.

Итак, какие выводы.

- лёгкая вода – эффективная вещь для снижения концентрации дейтерия в организме животного, употреблявшего данную воду продолжительное время. Концентрацию дейтерия можно понизить примерно на 90 ppm, и никакое дальнейшее употребление воды не может снизить её ещё больше.

- долгое употребление лёгкой воды даёт животному существенную защиту от облучения гамма-лучами. Был рассчитан порог дозы радиации– 1,41.

- употребление амифостина, самого мощного химического протектора от радиации, не приумножило защитного эффекта лёгкой воды

- гистологический анализ определённых тканей (гематогенного костного мозга, печени, селезёнки, малой кишки) показал проявление защитных эффектов от истощения клеток радиацией

- исследования показали, что антиокислительный эффект имеет место быть, но он не настолько силён, чтобы им можно было обосновать явление защиты от радиации

- самым важным действием была стимуляция неспецифичных иммунологических параметров

- была стимулирована пролиферация клеток, но на это не оказывало влияния перемещение соединений натрия с водородом

- в эффектах пролиферации скорее участвовали сульфгидрильные группы

Мы провели ещё несколько экспериментов (вы знаете, для нас это что-то вроде хобби) и что мы заметили:

- несистематические данные, полученные из наблюдения за приростом биомассы элодеи канадской (растение, используемое для создания флоры в аквариуме) и водных улиток рода Помацея показали, что прирост усиливается при замене в аквариуме простой воды на лёгкую. Лёгкая вода усиливали рост и его скорость. Лучший пример был показан здесь профессором, когда он продемонстрировал, что тяжёлая вода затормаживает рост, в то время как лёгкая вода его стимулирует.

Что мы заметили в эксперименте с улитками: в улитках, выращенных в среде с уже восстановленным количеством дейтерия, была обнаружена гепатопанкреатитная гипертрофия – феномен, схожий с ростом неоплазий в простейших. – ПРЕДОСТЕРЕЖЕНИЕ назначающим воду пациентам, больным раком. Я не онколог, я никогда даю подобных рекомендаций больным раком, но, судя по тому, что я прочёл и наблюдал, лёгкая вода оказывает благоприятный эффект и это совершенная правда, что лечение рака с помощью лёгкой воды представляется возможным. Тем не менее, оно должно осуществляться осторожно и постепенно, так как, скажем, лёгкая вода хоть и не стимулирует рост основной опухоли, кто знает, какой эффект она может оказать на метастазы и другие изменения, вызванные раком.

Итак, заключительные слова, которые мне хотелось бы произнести в завершение этой презентации – мы действительно должны изучить влияние уменьшения дейтерия на организм, так как у этой области перспективное будущее – все это видят и всем хотелось бы, чтобы изучение продолжалось. Будем же надеяться, что симпозиум поспособствует дальнейшему продуктивному исследованию. Спасибо.

- Спасибо вам большое. Есть какие-нибудь вопросы или комментарии?

- У меня есть три вопроса. Первый: если вы ставили опыты лишь на мышах, то можем ли мы утверждать, что пациенты, больные раком и получающие радиотерапию, должны употреблять лёгкую воду для защиты от разрушения клеток?

- Да, да. Я видел это собственными глазами – лёгкая вода действительно помогает снизить негативные эффекты радиотерапии, радиотерапии кобальтом или бетатроновую.

- Хорошо. Следующий вопрос: вы пробовали использовать мышей, больных раком, и осуществить облучение на них?

- Нет, у меня не было возможности найти особей со сниженным иммунитетом, чтобы провести эксперимент на них.

- То есть, мы не можем выяснить, имел ли место быть какой-либо эффект синергизма… И лёгкая вода может защищать от последствий радиотерапии.

- И третий вопрос: когда мы проводили наши опыты in vitro, мы наблюдали противоположное… вопрос: в чём причина… разница в наших двух экспериментах? Одно объяснение может быть таким: когда мы ставили эксперимент, то сначала наблюдали за клетками 24 или 48 часов, уравнивая их, и, как я уже говорил, видели, что клетки продолжали свой рост через 12 часов… а вы, вы производили наблюдение за клетками прежде чем начать эксперимент?

- Я думаю, что я не могу ответить однозначно на этот вопрос. Я скажу «нет». Давайте решим, что нет, потому что я не уверен. Тем не менее, клетки были взяты из резерва, они все были в замороженном виде; мы поместили их в одну среду одновременно – поэтому, наверное, можно сказать, что все они были в равных условиях, но я не могу ответить точно на ваш вопрос со стопроцентной уверенностью.

- Но, возможно, какие-то генетические истоки и изменения имели место быть… Если мы обнаружили, что ваш результат отличается, значит, что-то отличалось в механизме – возможно, временной фактор играет роль? Вы наблюдали за клетками в течение нескольких дней – значит, вы говорите об эффекте лёгкой воды не в течение первых 24 часов наблюдения, а по прошествии пары дней?..

- Нет, наблюдение велось 24, 48, 72 часов и так далее… до момента конфлюэнтности. Обычно конфлюэнтность достигается через 4-6 дней. Через неделю мы обычно заканчивали эксперимент.

- Хорошо. Мой последний комментарий будет заключаться в том, что нам действительно нужно подумать о безопасности. Очень важно следить за тем, чтобы не нанести вреда субстанцией, которая может быть опасна. А может, нам стоит волноваться, так как мы провели массу тестов на безопасность на кошках, собаках, но мы не можем знать, не станет ли вдруг лёгкая вода в течение ближайших 15 или 17 лет развивать раковые опухоли и метастазы – конечно, нам нужно всё сначала исследовать…

- Ну, эти исследования проводились достаточно давно и без оглядки на другие эксперименты.

- Спасибо. Ещё вопросы?

- Чисто из любопытства: вы знаете, почему вам не удалось уменьшить концентрацию дейтерия более чем на 90 ppm?

- Не имею понятия. Исследования проводились, скажем прямо, несистематически. У нас не было чёткой программы исследования. Ваш вопрос нашёл бы ответ, если бы он являлся частью крупного эксперимента, но наши эксперименты велись время от времени в течение нескольких лет и когда у исследователей было свободное время. Поэтому я не могу сказать вам точно, почему так происходит, я могу лишь сказать, что это поисходит. Возможно, нам удастся ещё понизить концентрацию, кто знает.

- Возможно ли то, что вода, произведенная в нашей системе в качестве продуктов клеточного обмена веществ, влияет на результат опыта?

- Животные получали только лёгкую воду. И так называемую специально высушенную еду. Конечно же, в ней не отсутствует вода вообще, влажность составляет около 25-40% - сравните с 90% влажности в других типах еды – то есть, в еде всё же содержался какой-то процент воды, обычной воды. А в воздухе? Большое количество паров воды, которые мы вдыхаем. Вокруг значительное количество источников воды, которое не позволит концентрации дейтерия опуститься ниже определённого числа. Хотя, возможно, такое может произойти. Я не знаю, возможно, нужно больше времени. Эксперимент длился 2, 3 недели, или 2 с половиной, в течение которых мы провели исследования. Может, если давать воду более долгий срок, полгода или год и держать под контролем атмосферу – концентрация понизится, не знаю.

- Ваши исследования по радиопротекции замечательны, я действительно под впечатлением от результатов. Это действительно интересно, как вес влияет на организм… это подтверждается в спорте. В Лос-Анджелесе футбольная команда «Гэлакси» тренировалась в утяжелённых бутсах, чтобы уже непосредственно на игре спортсмены бегали быстрее. И что было интересно – в первые же моменты игры игроки стали падать, так как чувствовалась большая разница по сравнению с тренировками в тяжёлой обуви. На следующий день, впрочем, скорость действительно повысилась. Тренер понял, что игрокам нужно время для адаптации к разным условиям и переключить привычность к тяжёлой обуви на привычность к лёгкой – не так-то просто.

Я думаю, что я ещё скажу об этом позже. Фактор адаптации также есть в употреблении лёгкой воды, которая ускоряет некоторые физиологические процессы, и я думаю, что если экспериментировать с дозированием время от времени, чтобы вычленить верное количество, наблюдая за изменениями в биохимических системах и зная как эти изменения могут повлиять на физиологию, в конечном счёте можно составить полную и ясную картину происходящего.

- Спасибо.