E. Azizi, K. Akbarzadeh, A. Hosseini: ANTIPROLIFERATIVE EFFECTS, CELL CYCLE ALTERATIONS AND APOPTOSIS INDUCTION OF DDW ON Z47D AND HT-29 HUMAN CARCINOMA CELL LINES

**Антипролиферационные эффекты, изменения в клеточных циклах**

 **и индукция апоптоза в линиях клеток карциномы человека T47D и HT-29,**

**вызванные лёгкой водой**

Итак, мы переходим к следующей беседе. Это будет речь доктора Хуссейна из Ирана – «Антипролиферационные эффекты, изменения в клеточных циклах и индукция апоптоза в линиях клеток карциномы человека T47D и HT-29, вызванные лёгкой водой». Доктор Хуссейн…

-Да, спасибо. Хорошо… мне нужно удостовериться, что сегодня всё работает, т.к. я хочу изложить очень много различной информации о лёгкой воде.

Как я говорил вчера вечером, мы занимались данными вопросами пару лет, с тех пор как получили доступ к лёгкой воде. Мы приглашали медицинские университеты к сотрудничеству и организовали научное исследование совместно с Тегеранским медицинским университетом в лаборатории доктора Азизи. Фактически, я представляю его здесь сегодня , т.к. он сам не смог приехать.

Работа, которую мы хотим представить вашему вниманию, - «Вызванные лёгкой водой антипролиферационные эффекты, изменения в клеточных циклах и индукция апоптоза в раковых клетках человека: рака молочных желёз - T47D и колоректального рака - HT-29»

Думаю, нет ни малейшего сомнения, что лечение рака должно осуществляться. Изменения в клеточных циклах и/или снижение индукции апоптоза как последствия химиотерапии, возможно, происходят благодаря молекулярным изменениям раковых клеток.

Изучение новых соединений в чистом виде или в комбинации с сильными химиотерапическими препаратами, например, доксорубицином, может открыть новые перспективы в лечении рака.

Предыдущие доклады сообщали о потенциальных способностях лёгкой воды противостоять раку. Итак, у нас была мотивация изучить эффективность лёгкой воды в лечении рака.

У нас был доступ к двум типам лёгкой воды. Мы назвали их А и В, и не знали, в какой из них содержание дейтерия выше.

Мы провели эксперименты на вышеозвученных клетках на выявление цитотоксических эффектов, изменения клеточных циклов и индукции апоптоза – и в присутствии, и отсутствии доксорубицина.

Все вещества, инструменты, используемые в эксперименте, описаны в соответствующей литературе.

Для экспериментов на цитотоксичность мы использовали 10000 клеток рака молочной железы или 5000 клеток колоректального рака, содержащихся в 96-луночных плашках и по прошествии 48 часов помещённых в среду с лёгкой водой А/лёгкой водой В в присутствии/отсутствии 250 нМоль доксорубицина. Клетки были обнаружены с помощью 540, а не 690, как ранее, нанометровых волн, с использованием клеточного анализатора «Санрайз», после обработки МТТ на второй, четвертый, шестой дни в случае T-47D или на десятый день в случае HT-29. Все эксперименты проводились минимум 3 раза с учетом погрешности.

Для экспериментов на изменение клеточного цикла мы использовали по 40000 клеток рака молочной железы и колоректального рака, содержащихся в 12-луночных плашках и по прошествии 48 часов помещённых в среду с лёгкой водой А/лёгкой водой В в присутствии/отсутствии 40 нМоль доксорубицина. Клетки были обработаны Трипсином-EDTA, далее обмыты в натрий-фосфатном буфере, очищены на центрифуге, гомогенизированы в DAPI и продержаны 30 минут в темноте. Далее клетки были перемещены в трубки для поточной цитометрии, интенсивность флуоресценции была прочитана и записана с использованием канала FL4. Анализ информации и вычисление процента клеток на G0/G1, S или G2/M фазах производилось с помощью программы FlowMax. Все эксперименты проводились минимум 3 раза с учетом погрешности.

Что насчёт тестов на апоптоз: они проводились практически идентично, только клетки были обработаны немного по-другому; интенсивность флуоресценции была прочитана с ипользованием каналов FL1 и FL2 и записана для каждого квадранта (Q1-Q4).

Итак, я хочу показать, что мы обнаружили… хорошо. Изучение цитотоксического влияния лёгкой воды без использования других веществ на клетки рака молочной железы T47D, проведённое по MTT-методу. На диаграммах показано положение дел на 2, 4 и 6 дни от начала эксперимента. 1 диаграмма – обычные условия, 2 – клетки, обработанные 250 нМоль доксорубицина, и находящиеся в простой воде, 3 и 4 – клетки, помещенные в среду лёгкой воды А и В. Как видите, между 1, 3 и 4 диаграммами практически нет разницы.

Однако мы исследовали влияние лёгкой воды на клетки рака молочной железы T47D в комбинации с доксорубицином – и увидели, что эффект сильно возрос.

А это результаты исследования с использованием линий клеток колоректального рака HT-29. Они очень схожи с результатами предыдущего опыта. Сначала мы не видим разницы, будь клетка помещена в нормальную воду, или в лёгкую воду, тем не менее наблюдается тенденция к повышению цитотоксичности, если мы подвергаем линии клеток обработке более долгий срок.

Это результаты исследования цитотоксического влияния лёгкой воды на клетки колоректального рака HT-29 в комбинации с доксорубицином. Они идентичны результатам с клетками рака молочной железы.

Результаты исследования индукции апоптоза, вызванной лёгкой водой в клетках рака молочной железы в комбинации с доксорубицином или без него – с использованием Annexiv-FITC/PI метода. Как вы видите, первые 3 ветви гистограмм – среда нормальной воды, среда лёгкой воды А и среда лёгкой воды В соответственно. Мы не видим существенных различий. Однако когда мы добавляем в среду лёгкой воды А или В 40 нМоль доксорубицина, мы видим, что доксорубицин усиливает сдерживающее влияние лёгкой воды на развитие апоптоза.

Это результаты точно такого же опыта, только на других линиях клеток, клетках колоректального рака HT-29.

Изучение изменения клеточного цикла лёгкой водой без присутствия доксорубицина или совместно с ним – на примере клеток рака молочных желёз T47D с использованием DAPI-метода. Как вы можете видеть здесь, на этих длинных гистограммах… в T47D прирост клеток происходит в основном в G2/M – фазах. Для линий клеток колоректального рака мы видим другой результат… ммм… я думаю, здесь ошибка. Точно. Пропущен верный слайд.

Итак, суммируем полученные результаты:

- оба типа лёгкой воды не оказали существенного влияния на пролиферацию линий клеток T47D и HT-29

- антипролиферационный эффект доксорубицина был немного повышен при комбинации доксорубицина с лёгкой водой

- S-фаза в клеточном цикле T47D значительно повысилась при обработке доксорубицином совместно с лёгкой водой типа А

- в клетках HT-29 была значительно продлена фаза G2/M при обработке доксорубицином совместно с лёгкой водой и типа А, и типа В по сравнению с результатами обработки лишь одним доксорубицином

- Клетки T47D, обработанные доксорубицином совместно с лёгкой водой А или В показали повышенный уровень апоптоза и некроза

- \*здесь ошибка на слайде, повторяется уже сказанное\*

В заключение хотелось бы сказать, что наши данные подтверждают уже сделанные предположения о сильном влиянии лёгкой воды на раковые клетки и её большом потенциале в повышении эффективности химиотерапии.

Спасибо вам за внимание. Если вы хотите получить больше информации, свяжитесь с доктором Азизи по e-mail: aziziebr@tums.ac.ir Спасибо большое.

- Итак, дискуссия открыта. Я бы хотел задать 1 вопрос. Это здорово – оставлять исследователям загадку, но тем не менее, какова была концентрация дейтерия в лёгкой воде А или В?

- Да, да, сейчас… в воде типа А – 50 ppm, В – 105.

- Итак, А – 50, а…

- А В – 105 ppm.

- Ещё какие-нибудь вопросы?

- У вас есть какие-нибудь соображения насчёт того, почему действие доксорубицина усиливается в присутствии лёгкой воды?

- На самом деле, не имею понятия, но я спрошу об этом Азизи!

- Оу. Спасибо.

- Фактически доксорубицин, имеющий пролиферационный эффект… ну, по крайней мере, к ак я это знаю, - т.к. мы проводили опыты, используя это вещество, - повышает оксидную ветвь пентациклов. И как я предполагаю, это что-то сродни адаптации клеток к усилению транквилизации. И если лёгкая вода как-то влияет на протонный обмен – это может и быть нужным механизмом. Но это всего лишь моё предположение, доктор Азизи скорее всего ответил бы на вопрос лучше.

- Я думал, вы повторили идею о том, что нужно проверять клетки через 24 часа после начала эксперимента на предмет их роста… и 1 вопрос, который может быть связан с вашим экспериментом… когда вы помещаете клетки в водную среду, а затем ставите в определённое помещение, вы пытаетесь препятствовать процессу влагообмена между средой с клетками и влажностью воздуха? Ведь, наверное, нет… Если вы этого не делаете – то, в конце концов, концентрация дейтерия в среде повысится и получится, что вы тестируете не среду с пониженной концентрацией дейтерия – происходит процесс обмена, углекислый газ попадает в воду… я думаю, этот фактор может мешать эксперименту.

- Ну а если они использовали закрытые плашки?

- Хм, хорошо… мне просто пришло это в голову. Потому что в своих экспериментах я всегда пытался предотвратить обмен влагой с воздухом. Хорошо, спасибо.