

ОБРАТИМОЕ ДЕЙТЕРИРОВАНИЕ ТКАНЕВОЙ ЖИДКОСТИ И БИОПОЛИМЕРОВ В НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ТКАНЯХ МЫШЕЙ

© 2018 г. А.В. Косенков*, М.В. Гуляев**, В.И. Лобышев*, Г.М. Юсубалиева***, В.П. Баклаушев***

*Физический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1/2

**Факультет фундаментальной медицины Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, 119192, Москва, Ломоносовский просп., 27/1

***Федеральный научно-клинический центр Федерального медико-биологического агентства, 115682, Москва, Ореховый бульвар, 28

E.mail: lobyshev@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.05.18 г.

Методом магниторезонансной томографии на ядрах ^1H и ^2H исследован обмен дейтерия в здоровых мышцах и мышцах с инокулированной карциномой молочной железы 4T1. Дейтерирование осуществлялось при употреблении мышами питьевой воды с увеличенным до 10% содержанием дейтерия. Обратный процесс регистрировали при переводе мышей на обычный питьевой режим. Среднее значение характерного времени обмена по разным отделам здоровых мышей равно 2,4 суток. Достоверного различия в скоростях обмена дейтерия у здоровых и зараженных мышей не обнаружено. Обмен дейтерия в биополимерах зависит от отдела мышцы и варьирует от 8 до 24 суток. После недельного дейтерирования в разных отделах тела мышей и месте локализации опухоли обнаружена немонотонная зависимость содержания дейтерия от времени. Медианное значение выживаемости привитых мышей, употреблявших воду с повышенным содержанием дейтерия, было на четверо суток больше, чем в контрольной группе животных.

Ключевые слова: тяжелая вода, злокачественные опухоли, карцинома молочной железы 4T1, выживаемость, ^1H МРТ, ^2H МРТ, обмен дейтерия.

DOI: 10.1134/S0006302918050216

Замена обычной воды на тяжелую (D_2O) приводит к разнообразным эффектам в живых и модельных биологических системах, в основном ингибирующего характера [1]. Для млекопитающих концентрация дейтерия в питьевой воде, превышающая 30%, является летальной. В то же время надежно установлено, что частичное дейтерирование мышей питьевой водой с увеличенной концентрацией дейтерия приводит к увеличению их резистентности к гамма-облучению [2,3], к ослаблению иммунитета [4], замедлению и даже остановке роста привитых опухолей и увеличению срока жизни животных с онкологическими заболеваниями [1,5,6]. Замедление роста разнообразных опухолей наблюдали во всех случаях, в том числе на привитой мышам карциноме разных органов человека [5], аденокарциноме поджелудочной же-

лезы человека [6], асцитной опухоли и лейкемии [1]. Известна также положительная попытка использования тяжелой воды для лечения опухолей матки и шейки матки человека [7]. Антипролиферативный эффект был более выражен при трансплантации слабо дифференцированной карциномы [5]. Особо значимые эффекты были достигнуты при комбинированном воздействии тяжелой воды и рентгеновского облучения либо химиотерапии. Возможности применения этого подхода особенно актуальны вследствие его неспецифичности и обратимости. Онкологические заболевания сильно разнятся по своей природе и причине возникновения. Если одни виды заболеваний поддаются успешному лечению, другие являются неизлечимыми по причине невосприимчивости опухоли к химио- или лучевой терапии, либо отсутствия высокоэффективных методов терапии, таких как иммунная, антивазкулярная и т.д. В отличие

Сокращения: МРТ – магниторезонансная томография.

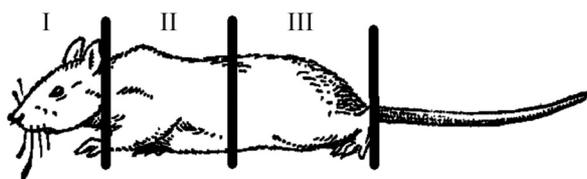


Рис. 1. Схема условного разбиения тела крысы на отделы: I – голова, II – грудь, III – таз.

от классических химиотерапевтических препаратов тяжелая вода быстро выводится естественным путем [8] и в концентрации до 25% не вызывает токсического действия [6], что позволяет надеяться на выработку методик, минимально травмирующих здоровые ткани. Есть все основания предположить, что дополнительное применение тяжелой воды повысит эффективность терапевтического лечения. Основной целью данного исследования было нахождение характерных времен обмена дейтерия в тканевой жидкости и в синтезируемых биополимерах при продолжительном пероральном употреблении мышами растворов тяжелой воды как при дейтерировании, так и при обратном процессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод ^2H -ЯМР уже использовался для изучения скорости потока крови и перфузии тканей [9]. В нашей работе все эксперименты проводили на биоспектротографе BioSpec 70/30 USR (Bruker, США) с магнитным полем 7,05 Тл, адаптированном для осуществления ЯМР-спектроскопии и магниторезонансной томографии (МРТ) на ядрах дейтерия. Для этого были изготовлены объемные и поверхностные катушки, настраиваемые на резонансную частоту дейтерия в поле 7,05 Тл. Обе катушки позволяют работать в режиме single coil. Поверхностная катушка имеет диаметр 3,0 см и глубину сканирования 2,0 см. Объемная катушка приспособлена в первую очередь для анализа образцов жидкости в пробирках диаметром до 2,8 см. Обе катушки позволяют получать ЯМР-спектры при естественном содержании дейтерия около 150 ppm. Работы, связанные с анализом дейтерирования мышей, проводили с использованием поверхностной катушки, так как она наиболее удобна для работы с животными [10].

Спектры получали с использованием последовательности 90° -FID. Время подачи радиочастотного импульса P1 составляло 80 мкс, продолжительность паузы между импульсами D1 – 2 с. Коэффициент усиления равнялся 12 дБ, количество оцифрованных точек TD – 8192, размер преобразования Фурье SI – 8192, ширина

полосы возбуждения SWH – 20 МГц. Поверхностную приемопередающую катушку размещали на спине у животного в горизонтальной плоскости. При снятии спектров тело животного условно разделяли на три отдела: голову, грудь и таз (рис. 1).

Глубина сканирования 2 см достаточна для получения сигнала от всех отделов, с учетом поправки на рассеяние радиочастотного поля при удалении от катушки. В нашем случае все измерения однотипны, поэтому данным фактором можно пренебречь.

После снятия спектров от каждого отдела каждого животного вычисляли площади под спектром, величина которых линейно коррелирует с количеством ядер дейтерия в измеряемом отделе тела животного и при известном объеме линейно связана с концентрацией дейтерия. Результаты вычислений усредняли по животным соответствующей группы, по результатам усреднения строили зависимости количества дейтерия в отделе тела мышцы от времени как на стадии насыщения, так и на стадии выведения. Погрешность измерения была оценена экспериментальным путем и составляла 4% от величины интенсивности сигнала, которой соответствует площадь под спектром. При понижении содержания дейтерия в теле животного до концентраций, близких к естественной, погрешность измерения возрастала до 6% от значения найденной величины. Спектры ^2H -ЯМР, соответствующие опухолям, получали путем помещения поверхностной приемопередающей катушки непосредственно на опухоль со спинной стороны в горизонтальной плоскости. Для группы мышей, у которой опухолей не было, катушку помещали в точку, где располагалась бы опухоль в случае ее наличия.

Карцинома молочной железы 4T1 была использована в качестве экспериментальной опухоли. Клетки карциномы 4T1 характеризуются высокой метастатической активностью. При подкожном введении инокулята в жировую клетчатку второй молочной железы зрелых самок медиана выживаемости составляет 32 дня. После имплантации клеток чаще обнаруживаются множественные метастазы в легких, печени, селезенке, позвоночнике и региональных лимфатических узлах, реже в головном мозге. Это соответствует клинической картине карциномы молочной железы человека [11].

Эксперименты проводили на самках мышей линии BalbC массой 20–25 г. Группам животных прививали карциному молочной железы 4T1 в соответствии со стандартизованной моделью [11]. Мышам в течение длительного времени предлагали 10%-й раствор тяжелой воды,

после чего его вновь заменяли обычной водой. В течение всего эксперимента регистрировали ^2H -ЯМР-спектры от разных отделов тела животного, ^1H -МРТ и ^2H -МРТ через постоянные промежутки времени. Для контроля роста опухоли применяли ^1H -МРТ. Перед помещением в биоспектротомограф мышей обездвиживали с помощью газового анестезирующего препарата «Изофлуран».

Схема эксперимента. Общее количество подопытных животных было случайным образом разделено на группы I и K1 по 5 мышей в каждой и K2 с 24 животными. Исходный возраст всех мышей составлял семь недель. Каждую группу мышей содержали в отдельной клетке и адаптировали к новым условиям неделю до начала эксперимента. Мыши группы K2 употребляли воду только с естественным (природным) содержанием дейтерия, всем им была привита карцинома молочной железы 4T1. Мыши двух групп (I, K1) после недельной адаптации употребляли 10%-й раствор D_2O в течение пяти недель. Мышам группы I была привита карцинома молочной железы спустя три недели после начала употребления 10%-го раствора D_2O . Животные контрольной группы K1, употреблявшие 10%-й раствор D_2O в течение пяти недель, не прививались. Через пять недель мышам для питья вновь давали обычную воду.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спустя неделю после начала употребления 10%-го раствора D_2O два раза в неделю регистрировали ^2H -ЯМР-спектры по выше описанной схеме. Вычисляли площади под спектром и усредняли по отделам тела животных для каждой группы. Были получены зависимости количества дейтерия в теле животных от времени как на стадии обогащения дейтерием, так и на стадии его выведения. После недельного дейтерирования во всех трех отделах тела мышей и месте локализации соответствующей опухоли обнаруживается немонотонная зависимость содержания дейтерия от времени. Поскольку было бы наивно ожидать от группы животных синфазности метаболизма, приведены данные для одного животного из группы K1 (рис. 2). Линии на данном графике представлены для наглядности. Наличие колебаний содержания дейтерия в разных отделах тела мышей на стадии насыщения согласуется с результатами, полученными ранее в работах с обменом тритиевой воды в организме крыс [8]. Интерпретация такой динамики процесса обмена связана, по-видимому, со спецификой метаболизма, но не может быть проанализирована

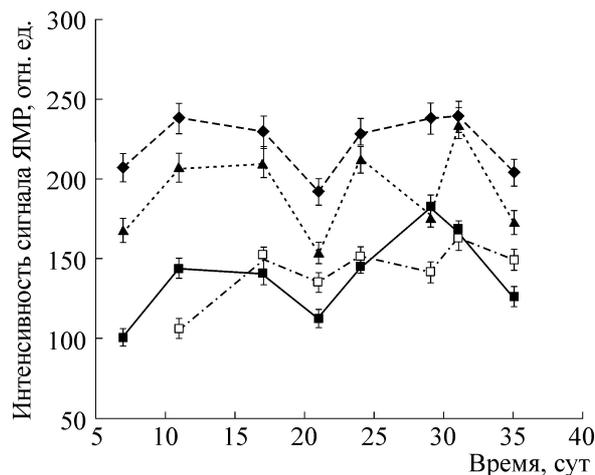


Рис. 2. Зависимость интенсивности ^2H -ЯМР-сигнала от времени для разных отделов тела мыши из группы K1 на этапе насыщения: темные квадраты – голова, ромбы – грудь, треугольники – таз, светлые квадраты – опухоль. Приведены среднеквадратичные отклонения.

в настоящее время, так как для получения адекватных характеристик этого процесса необходима увеличенная частота регистрации данных. Следует заметить также, что мыши во время всего эксперимента употребляли пищу с нормальным соотношением изотопов.

Процесс включения дейтерия в биополимеры происходит существенно медленнее, чем процесс изотопного замещения в водной фазе организма. Химический сдвиг в спектре ЯМР дейтронов в составе молекул воды и липидов (биополимеров) различается, что позволяет идентифицировать разные фракции обменных дейтронов. Видно, что амплитуда «водного» пика после продолжительного дейтерирования значительно превышает амплитуду пика дейтерия, связанного с биополимерами, но в процессе выведения можно наблюдать обратное соотношение амплитуд соответствующих сигналов ЯМР (рис. 3).

Следует отметить, что кинетика дейтерирования характеризуется очень большим разбросом, что затрудняет нахождение надежных численных данных, в то время как кинетика выхода дейтерия из организма регистрируется значительно точнее. Зарегистрированная кривая выведения дейтерия из организма мыши хорошо аппроксимируется функцией убывающей экспоненты с двумя характерными временами, что наглядно видно из графика зависимости логарифма амплитуды ^2H -ЯМР-спектров с течением времени (рис. 4). Это наблюдение говорит о том, что дейтерий воды и дейтерий биополимеров выводятся с разными скоростями. Изме-

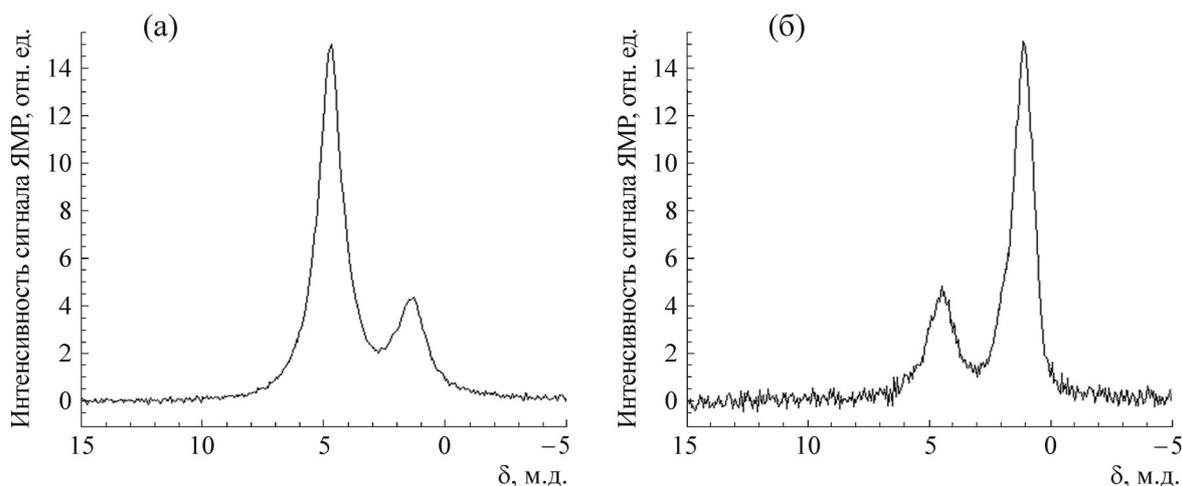


Рис. 3. Вид ^2H -ЯМР-спектра через неделю (а) и через пять недель (б) после отмены 10%-й D_2O .

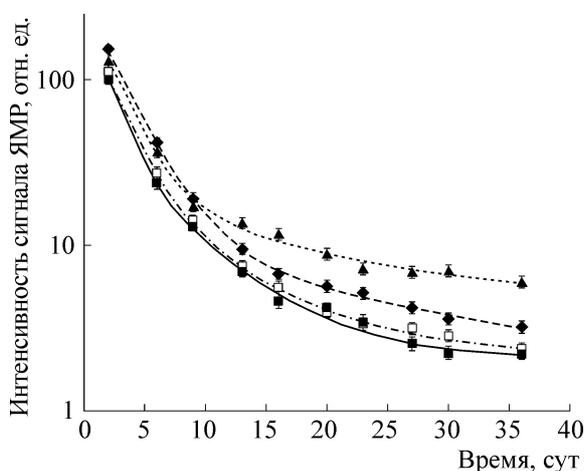


Рис. 4. Зависимость содержания дейтерия в отделах тела мыши группы К1 от времени после отмены 10%-й D_2O : темные квадраты – голова, ромбы – грудь, треугольники – таз, светлые квадраты – опухоль. Приведены среднеквадратичные отклонения.

ренные кинетические характеристики выведения дейтерия из водной фазы и фазы биополимеров тела мыши представлены в табл. 1.

Обратим внимание на то, что для водной фазы организма получены близкие значения в различных отделах, что согласуется с высокой скоростью перераспределения воды в организ-

ме. Известно, что характерные времена перераспределения воды в организме значительно меньше времен, соответствующих водообмену [8]. Среднее значение характерного времени обмена по разным отделам здоровых мышей равно $2,4 \pm 0,8$ суток.

У животных с опухолью быстро уменьшался объем жировой ткани (рис. 5) и скорость выведения дейтерия из организма мышей с развитой опухолью соответствовала скорости выведения воды из водной фазы. Расчетные данные времени полувыведения дейтерия получены на основе анализа соответствующих экспоненциальных функций и представлены в табл. 2. Среднее значение характерного времени обмена по разным отделам мыши, включая опухоль, равно $2,9 \pm 0,7$ суток. Разницы кинетических характеристик обмена дейтерия в водной фазе при выведении дейтерия из организма здоровых и больных мышей не обнаружено.

Был также проведен анализ выживаемости мышей, употреблявших 10%-й раствор D_2O и употреблявших обычную воду. Среднее время жизни животных из привитой группы К2, употреблявших обычную воду, оказалось близко ко времени, описанному в работе [11], и равнялось 30 суткам (рис. 6).

Таблица 1. Кинетические характеристики обмена дейтерия в водной фазе тела мыши (τ_1) и в фазе биополимеров (τ_2) по отделам для группы не привитых мышей К1. Приведены среднеквадратичные отклонения

	Голова	Грудь	Таз	Место привития опухоли
τ_1 , сутки	$1,9 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,3$
τ_2 , сутки	8 ± 1	19 ± 4	24 ± 5	18 ± 4

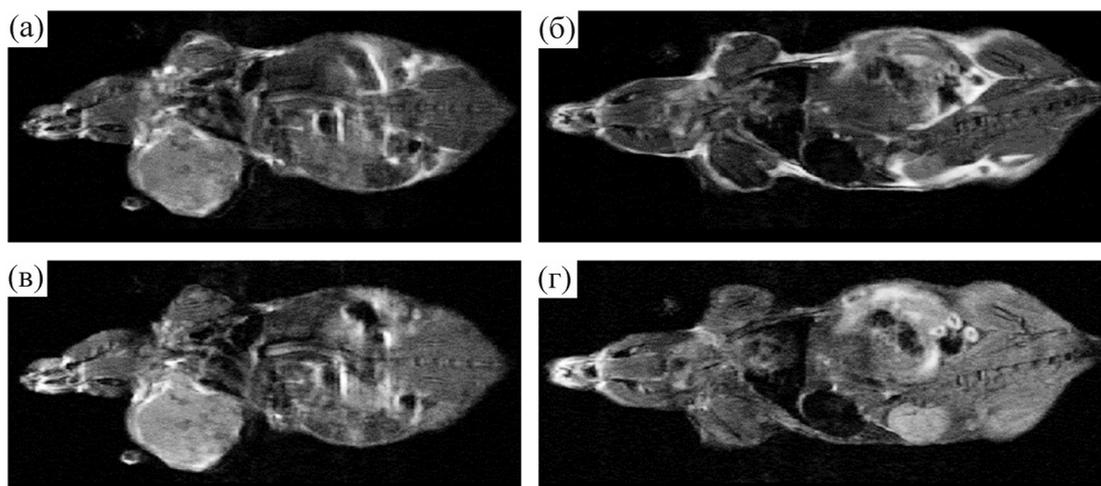


Рис. 5. ^1H -МРТ PD (proton density) – взвешенное изображение мыши с карциномой 4T1 (а, в) и здоровой мыши (б, г). Изображения (а) и (б) выполнены без подавления сигнала жировой ткани, изображения (в) и (г) – с подавлением. Видно, что у здорового животного значительно больше подкожного жира (светлые области по контуру животного), чем у животного с карциномой молочной железы, что свидетельствует о сильном истощении последнего.

Видно, что животные, употреблявшие 10%-ю D_2O , живут дольше, чем в контрольной группе. Отметим также, что после прививки карциномы мыши употребляли раствор D_2O только две недели, а затем пили обычную воду. Различия между выживаемостью животных контрольной группой К2 и выживаемостью животных группы I достоверно с 5%-м уровнем значимости. Это согласуется с результатами ранее проведенных экспериментов по воздействию D_2O на животных с новообразованиями онкологической природы. Небольшая величина эффекта (в среднем четверо суток) объясняется недостаточно высокой концентрацией D_2O в питьевой воде. Концентрация D_2O , равная 10%, достаточна для изучения процессов водообмена и метаболизма дейтерия в организме, но для терапевтического применения требуется более высокая концентрация D_2O . Судя по литературным данным, раствор тяжелой воды с концентрацией дейтерия 25% еще не является токсичным [6].

Резюмируя полученные результаты, можно утверждать, что употребление нетоксичного 10%-го раствора D_2O сопровождается достоверным увеличением времени выживания мышей с привитыми опухолями. К сожалению, наличие метастаз исключает возможность связать объем опухоли и продолжительность жизни животного при имеющейся выборке.

Кинетика выведения дейтерия водной фазы для здорового организма достоверно не различается между его отделами. Характерное время выведения дейтерия водной фазы составляло в среднем $2,4 \pm 0,8$ суток.

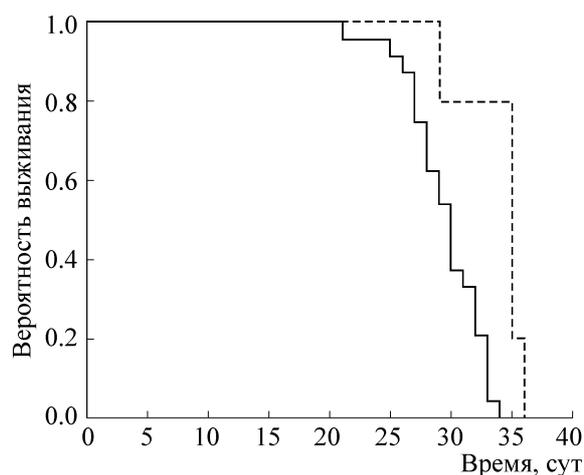


Рис. 6. Кривые выживаемости животных в группах I (пунктирная линия) и К2 (сплошная линия). Начало отсчета соответствует времени прививки.

Время полувыведения дейтерия биополимеров значительно превышает время полувыведения дейтерия водной фазы и различается между отделами тела. Для головного отдела период полувыведения дейтерия составил 8 ± 1 суток, а для остальных отделов тела в среднем составил 20 ± 7 суток.

Таблица 2. Кинетические характеристики убыли дейтерия воды по отделам тела для группы I привитых мышей

	Голова	Грудь	Таз	Опухоль
τ_1 , сутки	$3,0 \pm 0,3$	$2,9 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,2$	$2,7 \pm 0,3$

Кинетика выведения дейтерия из тела мыши с привитой опухолью также не различается между отделами, включая опухоль, и в основном обусловлена выведением дейтерия водной фазы вследствие практически полного отсутствия жировой ткани. Характерное время выведения дейтерия из зараженных мышей составляет $2,9 \pm 0,7$ суток и достоверно не отличается от такового для здоровых животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. В. И. Лобышев и Л. П. Калиниченко, *Изотопные эффекты D₂O в биологических системах* (Наука, М., 1974).
2. J. A. Laissue, E. Bally, D. D. Joel, et al., *Radiat. Res.* **96**, 59 (1983).
3. J. A. Laissue, H. J. Altermatt, E. Bally, and J.-O. Gebbers, *Exp. Hematol.* **15**, 177, (1987).
4. J. A. Laissue and R. D. Stoner, *Virchows Arch. A* **383**, 149, (1979).
5. H. J. Altermatt, J.-O. Gebbers, and J. A. Laissue, *Cancer* **62**, 463, (1988).
6. J. Hartmann, Y. Bader, Zs. Horvath, et al., *Anticancer Res.* **25**, 3407, (2005).
7. Л. А. Воскресенская и А. И. Волкова, *Свертывающая система крови в акушерстве и гинекологии* (Изд-во Томского ун-та, Томск, 1966).
8. К. М. Богданов и Л. Л. Романовская, *Биофизические закономерности обмена тритиевой воды в организме* (Энергоиздат, Москва, 1981).
9. L. Bogin, R. Margalit, H. Ristau, et al., *Microvasc. Res.* **64**, 104 (2002).
10. A. V. Kosenkov, M. V. Gulyaev, N. V. Anisimov, et al., *Phys. Wave Phenomena* **23** (4), 213 (2015).
11. V. P. Baklaushev, N. F. Grinenko, G. M. Yusubaliev, et al., *Cell Technologies in Biology and Medicine*, No. 4, 581 (2015).

Reversible Effect of Deuteration on Tissue Fluid and Biopolymers in Normal and Tumor Tissue of Mice

A.V. Kosenkov*, M.V. Gulyaev**, V.I. Lobyshev*,
G.M. Yusubaliev***, and V.P. Baklaushev***

*Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/2, Moscow, 119991 Russia

**Faculty of Fundamental Medicine, Lomonosov Moscow State University,
Lomonosovskii prosp. 27/1, Moscow, 119192 Russia

***Federal Research & Clinical Center, Federal Medical & Biological Agency,
Orekhovy bulvar, 28, Moscow, 115682 Russia

Deuterium concentration in normal mice and mice, inoculated with 4T1 mammary carcinoma, was studied by means of magnetic resonance imaging (MRI) and ¹H and ²H contrast. Mice received deuterium (up to 10%) in drinking water. The reversible effect was observed when mice began to drink normal drinking water. An average period of time that is need to perform hydrogen/deuterium exchange in all parts of the mouse body is 2,4 days. Rates of hydrogen/deuterium exchange in normal and deuterated mice are not reliably distinguished. The day range for hydrogen/deuterium exchange in biopolymers depends on the part of a mouse body and varies from 8 to 24 days. Nonmonotonic character of the dependence of the deuterium level on a time period was observed after a week consumption of drinking water with increased deuterium content and in tumor localization. The median survival rate of the inoculated mice that had received drinking water with the increased content of deuterium was 4 days longer than that in control group.

Keywords: heavy water, malignant tumor, 4T1 mammary carcinoma, survival, MRI and ¹H and ²H contrast, deuterium exchange