

اثر آب تهی شده از دوتریم بر روی رشد سلولی و سیستم آنتی اکسیدانی سلول های سرطان سینه

کمال یآوری*^۱، لیدا کوشش^۲، منیره موحدی^۲

۱- پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، تهران، ایران
۲- دانشکده علوم زیستی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهد که کاهش طبیعی میزان دوتریم می‌تواند منجر به مهار رشد تومور در هر دو مدل *in vivo* و *in vitro* شود. هدف از این مطالعه بررسی اثر آب تهی شده از دوتریم (DDW) تنها و در ترکیب با 5-FU بر روی رشد و سیستم آنتی اکسیدانی سلول‌های سرطان سینه است.

مواد و روش‌ها: آزمایش سمیت سلولی با استفاده از روش MTT انجام شد. سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلفی از DDW تنها، 5-FU تنها و هر دو تیمار شدند. سطح مالون دی‌الدئید و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپر اکسید دیسموتاز به روش اسپکتروفتومتری انجام گردید. آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) و t-Test برای تجزیه و تحلیل آماری استفاده شدند. $P \leq 0.05$ سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف DDW تنها به‌ویژه در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۲۵ ppm باعث مهار رشد سلول‌های MCF-7 گردید. 5-FU تنها نیز به‌طور قابل توجهی میزان بقاء سلول‌های MCF-7 را کاهش داد و استفاده از DDW به همراه 5-FU اثر مهار 5-FU بر روی سلول‌ها را افزایش داد. در مقایسه با گروه کنترل (۱۵۰ ppm)، مشاهده گردید که در سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های پایین‌تر DDW، فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز افزایش ولی سطح مالونیل دی‌آلدئید کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری: آب تهی شده از دوتریم می‌تواند به عنوان یک کمک کننده در داروهای ضد سرطان در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: آب تهی شده از دوتریم، سرطان سینه، آنزیم‌های آنتی اکسیدان، مهار رشد سلولی، MTT

مقدمه

سرطان سینه یکی از شایع‌ترین انواع سرطان در بین زنان است. امروزه پیشرفت‌های علمی باعث تشخیص زود هنگام و درمان بهتر سرطان سینه شده است، با این حال این بیماری هم‌چنان به‌عنوان مهم‌ترین عامل مرگ و میر در بین زنان به-

نویسنده مسئول:

پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، تهران، ایران

پست الکترونیکی: kyavari@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۱/۱۳۹۷/۷

[DOR: 20.1001.1.22285458.1397.9.33.1.5]

HDO^2 تولید خواهد شد. دوتریوم در آب‌های سطحی به دو فرم HDO و D_2O با غلظت $16/8 \text{ mmol/L}$ یا 150 ppm وجود دارد (۱۳). DDW که به‌عنوان آب سبک یا آب بدون دوتریوم نیز شناخته می‌شود، از جدا کردن دوتریوم طی پروسه بهره‌برداری از آب سنگین به دست می‌آید (۱۶). فناوری تولید آب سنگین محدود به چند کشور است که با تلاش محققان ارجمند علوم هسته‌ای، ایران نیز از جمله این کشورهای تولید کننده D_2O و DDW است. مطالعه‌های اخیر نشان می‌دهند که آب تهی شده از دوتریوم کاربردهای مهمی در پزشکی و سلامت ایفا می‌کند. با توجه به این‌که تاکنون اثر DDW بر روی سرطان سینه مورد مطالعه قرار نگرفته است، بنابراین هدف از پژوهش حاضر ابتدا بررسی اثر سیتوتوکسیک DDW به تنهایی و همراه با داروی 5-FU بر روی رشد سلول‌های سرطان سینه و سپس بررسی تأثیر آن بر فعالیت آنتی اکسیدانی سلول‌ها از طریق سنجش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، سوپراکسید دیسموتاز و فاکتور مالون دی آلدئید است.

مواد و روش‌ها

الف: کشت سلولی

سلول‌های MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت RPMI با ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک جنتامایسین نگهداری و پاساژ داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، CO_2 ۵ درصد و رطوبت ۹۰ درصد تا زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ درصد رشد برسند، نگهداری شدند. آب تهی شده از دوتریم با غلظت‌های ۳۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و 150 ppm از شرکت مصباح انرژی تهیه گردید.

ب: بررسی مهار رشد سلولی به روش MTT

شمار می‌رود (۳۰، ۱۱). فاکتورهای متعددی در افزایش خطر ابتلا به سرطان سینه دخیل هستند که از جمله این عوامل می‌توان به افزایش سن، سابقه خانوادگی، چاقی پس از یائسگی، مصرف الکل، فعالیت کم جسمانی، قاعدگی زودرس، یائسگی دیر هنگام، تغذیه بد، تماس با میدان‌های الکترومغناطیسی، تماس با انواع حشره‌کش‌ها یا مواد شیمیایی و غیره اشاره کرد (۱۲، ۶). درمان اول سرطان سینه جراحی است ولی در صورت متاستاز، از شیمی درمانی، هورمون درمانی و رادیوتراپی نیز استفاده می‌شود (۱۵). استفاده از ایمونوتراپی به‌همراه سایر روش‌های درمانی از جمله ژن درمانی، نور درمانی، واکسن‌ها و آنتی سنس‌ها نیز به‌منظور تکمیل درمان مورد توجه محققین هستند (۲۱). از داروهای رایج ضد سرطانی ترکیب ۵ فلوروپوراسیل (5-FU) است که آنالوگ پیریمیدین بوده و برای اولین بار در سال ۱۹۵۷ توسط Charles Heidelberger سنتز گردید. اثر ضدسرطانی این دارو بر سرطان‌های کولون، سینه، سیستم لنفاوی، سر و گردن و پوست تأیید شده است (۷، ۸). مشکلی که در استفاده از این نوع داروها وجود دارد این است که این ترکیب‌ها به تنهایی اثر قابل توجهی در مهار رشد سلول‌های سرطانی ندارند و بنابراین محققین به‌طور مداوم در صدد افزایش توان مهار رشد سلولی این عوامل درمانی از طریق همراهی با روش‌ها و ترکیب‌ها جدید هستند (۱۸، ۱۰). مطالعه‌های اخیر حاکی از اثر ضدسرطانی آب تهی شده از دوتریم دارد.

مطالعه‌های جدید نشان داده‌اند که آب تهی شده از دوتریوم (DDW^1) در کنترل و درمان انواع سرطان‌ها از طریق مهار تکثیر سلولی و القای آپوپتوز نقش مهمی ایفا می‌کند (۱۷). هیدروژن سنگین یا دوتریوم (Deuterium) ایزوتوپ پایدار هیدروژن است که به نسبت یک به ۶۶۰۰ از اتم‌های هیدروژن در طبیعت حضور دارد (۴). اگر یکی از اتم‌های هیدروژن با دوتریوم جایگزین شود، آب نیمه سنگین یا همان

² Semiheavy Water

¹ Deuterium Depleted Water

آن را با دور rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده تا سلول ته نشین گردند. به ۰/۵ml از محلول رویی حاوی MDA، ۰/۵ml تیوباربیتریک اسید ۰/۵٪ اضافه کرده و به مدت ۰/۵ ساعت در بن ماری 100°C قرار داده شد. میزان محصول صورتی رنگ با روش رنگ سنجی در طول موج ۵۴۰-۵۳۰ nm اندازه گیری اندازه گردید.

ج: آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار Graphpad Prism 5.01 و روش واریانس یک طرفه (ANOVA) و t-Test مورد بررسی قرار گرفت. $P \leq 0.05$ به عنوان سطح معنی داری در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج مهار رشد سلولی

با توجه به تغییرهای کل منحنی ها درصد زنده ماندن سلول های تیمار شده با دارو و بدون دارو نشان داده شده است.

الف: نتایج آزمون ۲۴ ساعت MTT

در تیمار ۲۴ ساعت سلول ها به تنهایی و یا همراه با 5-FU، افزایش غلظت دارو با $P\text{value} < 0.0154$ و کاهش غلظت دوتریوم موجود در آب با $P\text{value} < 0.001$ به صورت معنی داری بر درصد بقای سلولی تأثیر گذاشت. کمترین درصد بقای سلولی مربوط به غلظت های ۱۰۰ و ۱۲۵ ppm از DDW و غلظت های ۸، ۱۶ و $32\mu\text{g/ml}$ از داروی 5-FU بود. در غلظت های بالای دارو (۱۶ و $32\mu\text{M}$) اختلاف درصد بقا میان نمونه های تیمار شده و نمونه های کنترل به بیشترین مقدار خود رسید (شکل ۱).

آزمون سیتوتوکسیک سلولی بر اساس روش MTT انجام شد. تعداد ۵۰۰۰ سلول به هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ای با ۴ بار تکرار اضافه گردید. سلول ها در محیط RPMI کشت داده شدند و روز بعد هریک از چاهک ها با محیط کشت تهیه شده از DDW با غلظت های مختلف (۳۰، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵ و ۱۵۰ ppm) به تنهایی و یا همراه با داروی 5-FU با غلظت های (۲، ۴، ۸، ۱۶ و $32\mu\text{g/ml}$) تعویض گردید. سلول ها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند و سپس آزمون MTT طبق پروتکل بر روی آن ها انجام گردید (۲۹).

پ: سنجش سوپراکسید دیسموتاز

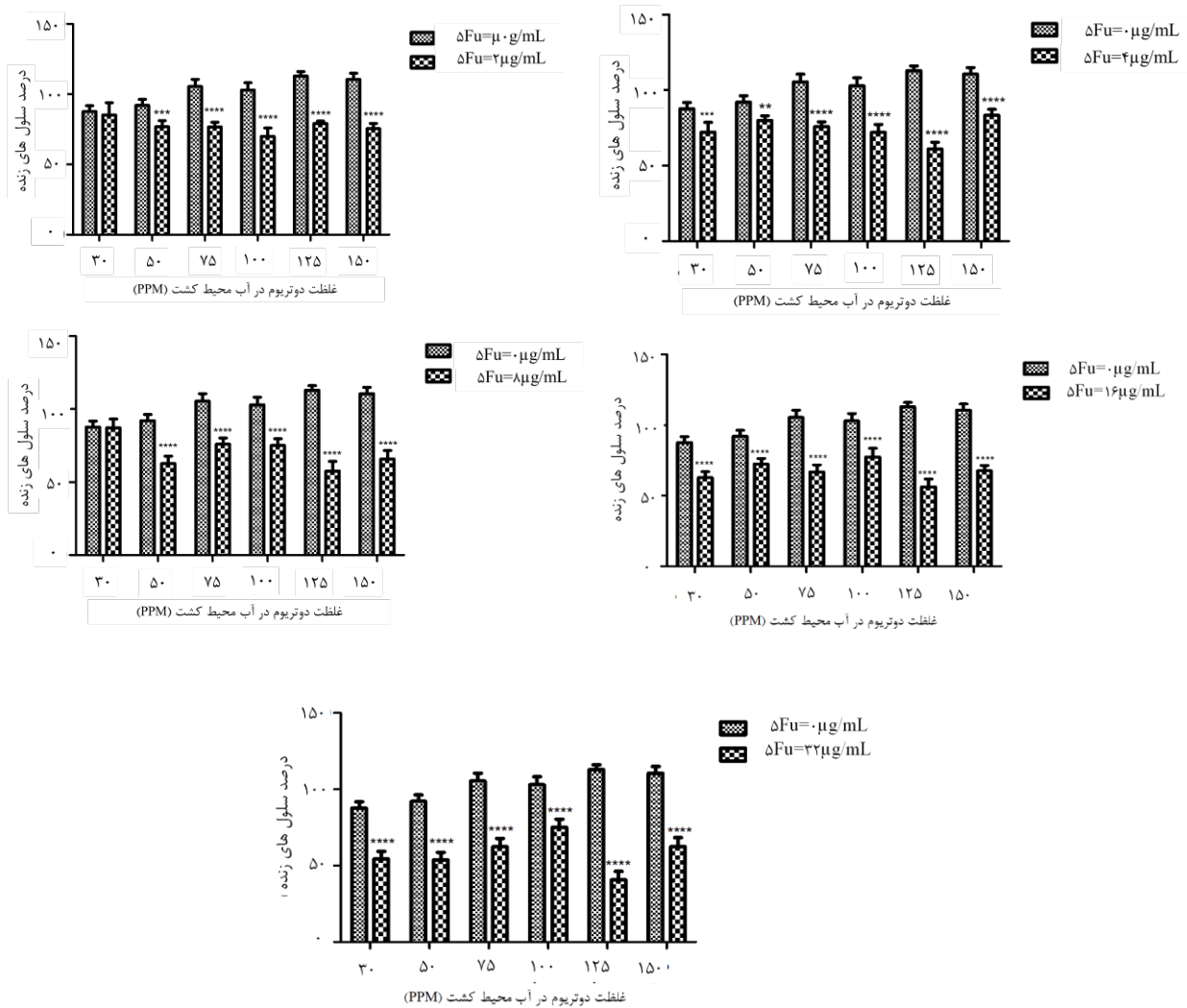
محلول واکنش جهت سنجش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از تریتون $100\times$ یک درصد، محلول Pyrogallol 0.9mM/L ، محلول NBT 0.98mM/L ، مهارکننده آنزیمی 1mM/L و بافر Tris-Cacodylic ساخته شد و سپس میزان فعالیت آنزیم مورد نظر به روش رنگ سنجی در طول موج ۵۶۰ nm اندازه گیری گردید (۲۰).

ت: سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز

محلول واکنش جهت سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز از ترکیب تریتون $100\times$ یک درصد، EDTA 1mM/L ، بافر فسفات سدیم 100mM/L ، مهارکننده آنزیمی 1mM/L و $50\mu\text{L}$ محلول آب اکسیژنه تهیه گردید و میزان فعالیت آنزیم کاتالاز به روش رنگ سنجی در طول موج ۲۴۰ nm سنجیده شد (۱).

ث: سنجش مالون دی آلدئید

به منظور اندازه گیری میزان MDA، 500×10^3 سلول را شمارش کرده و در یک میکروتیوپ ۲ میلی لیتر ریخته و با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. محلول رویی به آرامی با سمپلر خالی شده و روی رسوب سلولی ۱/۵ ml تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ اضافه گردید. سلول ها را با دستگاه سونیکاتور به مدت ۲ دقیقه با تعداد ۶۰ سیکل در ثانیه سونیکه کرده و بعد از شفاف شدن محلول حاوی سلول و همگن سازی،

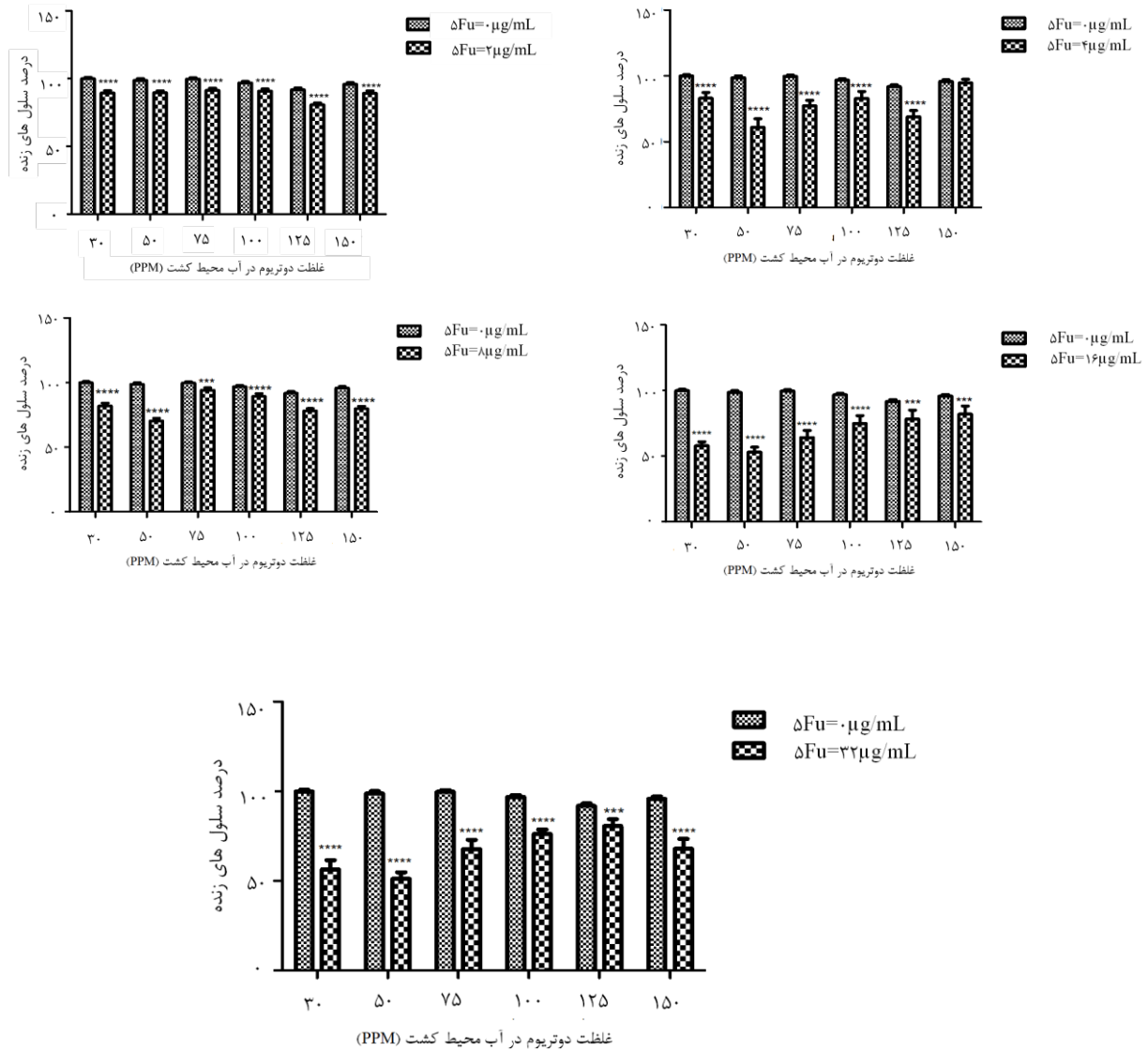


شکل ۱: مهاری رشد سلولی پس از ۲۴ ساعت

غلظت DDW ۱۰۰ ppm بوده، در میان سایر غلظت‌ها، کم‌ترین درصد بقای سلولی به غلظت ۵۰ ppm DDW تعلق داشت (شکل ۲).

ب: نتایج آزمون ۴۸ ساعت MTT

در تیمار ۴۸ ساعت سلول‌ها با DDW به تنهایی و یا همراه با 5-FU، تأثیر غلظت دارو، غلظت دوتریوم و اثر سینرژیک این دو عامل با $Pvalue < 0/0001$ بر روی درصد بقای سلولی از نظر آماری معنی‌دار بود. کم‌ترین درصد بقای سلولی مربوط به

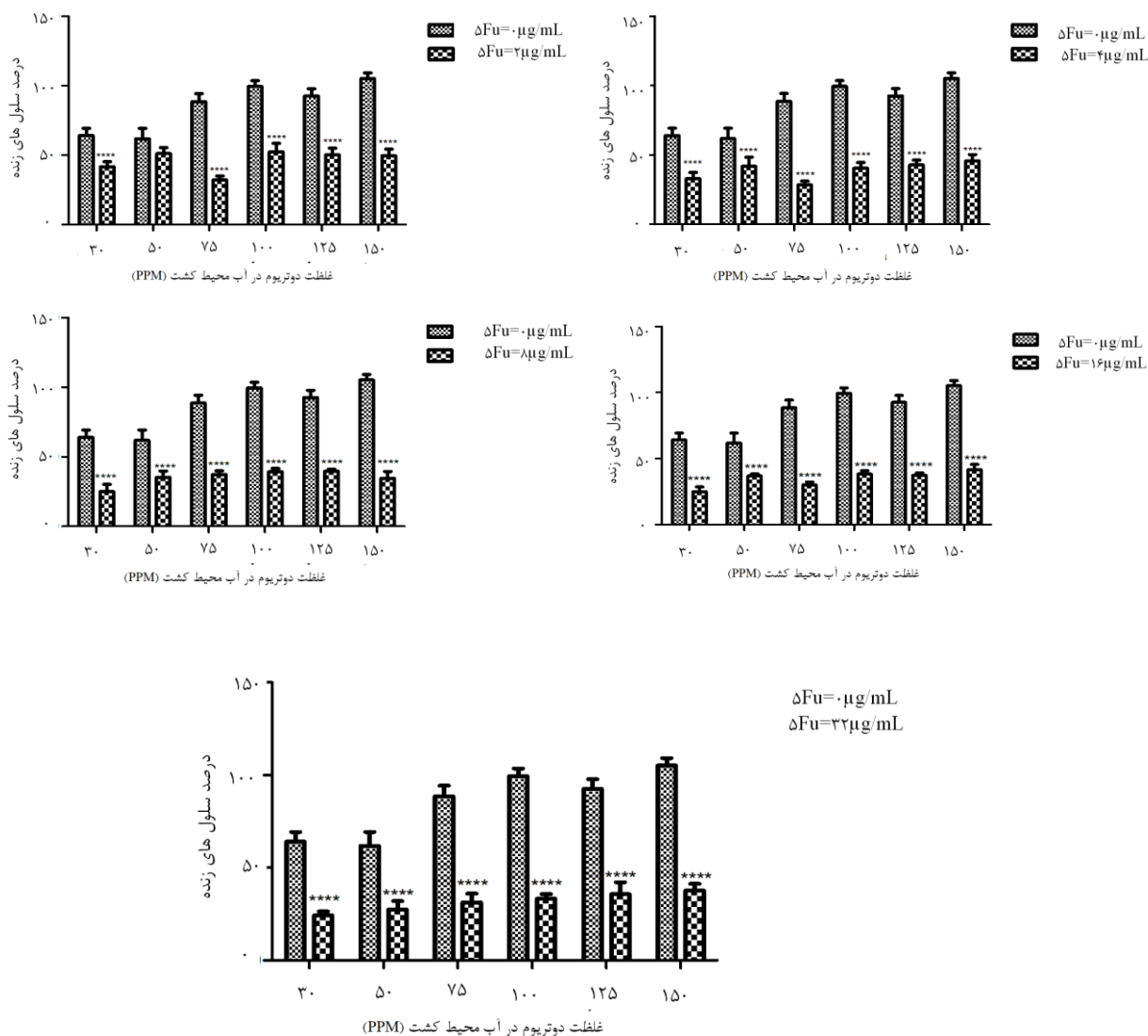


شکل ۲: مهار رشد سلولی پس از ۴۸ ساعت

پ:نتایج آزمون ۷۲ ساعت MTT

در مطالعه ۷۲ ساعت آزمایش مهار رشد سلولی، بیشترین و کمترین درصد بقای سلولی به ترتیب در گروه های سلولی تیمار شده با ۳۰ ppm DDW به همراه 5-FU با غلظت ۳۲ μg/ml و ۱۵۰ ppm DDW به همراه 5-FU با غلظت های

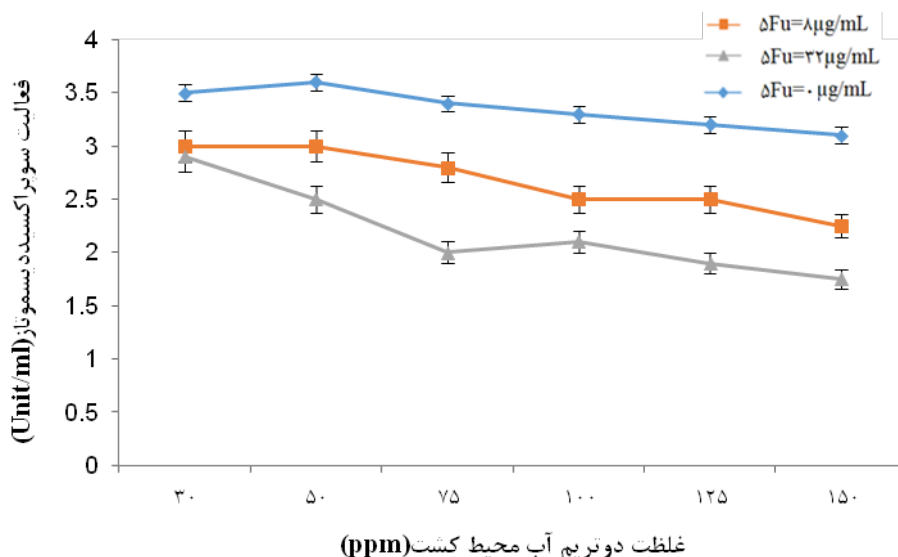
۲ و ۴ μg/ml دیده شد. غلظت های مختلف DDW بدون 5-FU نیز بر روی مهار رشد سلولی اثر متفاوتی را نشان دادند. بیشترین کاهش رشد سلولی در غلظت ۳۰ ppm و کمترین کاهش رشد سلولی در غلظت ۱۵۰ ppm DDW مشاهده گردید (شکل ۳).



شکل ۳: مهار رشد سلولی پس از ۷۲ ساعت

ترین فعالیت معنی دار آنزیم در غلظت های ۸ و ۳۲ μg/ml از داروی 5-FU و DDW با غلظت بالای دوتریوم به ویژه در ۱۲۵ppm و ۱۵۰ppm مشاهده گردید (شکل ۴).

ت: نتایج بررسی فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز مطالعه ما نشان داد که اثر سینرژیک آب تهی شده از دوتریوم و داروی 5-FU از نظر آماری معنی دار است. DDW در غلظت های پایین دوتریوم از جمله در غلظت های ۳۰ و ۵۰ ppm اثر معنی داری بر افزایش فعالیت سوپراکسید دیسموتاز داشت. کم-



شکل ۴: فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در سلول های MCF-7 پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف دوتریوم و غلظت های ۸ و ۳۲ µg/ml از داروی 5-FU

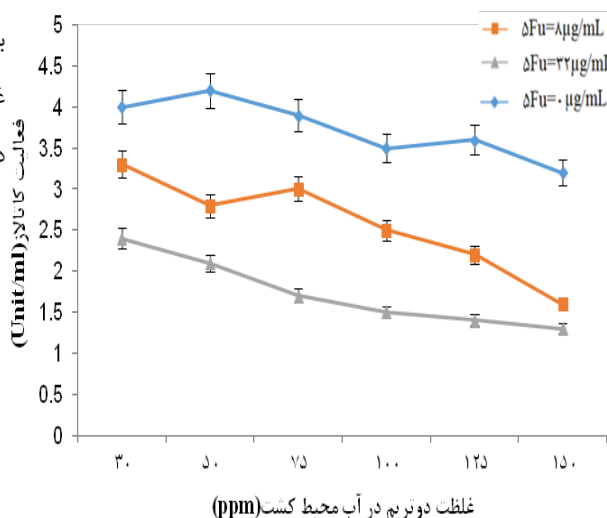
مشاهده گردید و کمترین فعالیت نیز متعلق به سلول های تیمار شده با ترکیب ۱۵۰ ppm از DDW و داروی 5-FU با غلظت ۳۲ µg/ml بود (شکل ۵).

ث: نتایج بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز

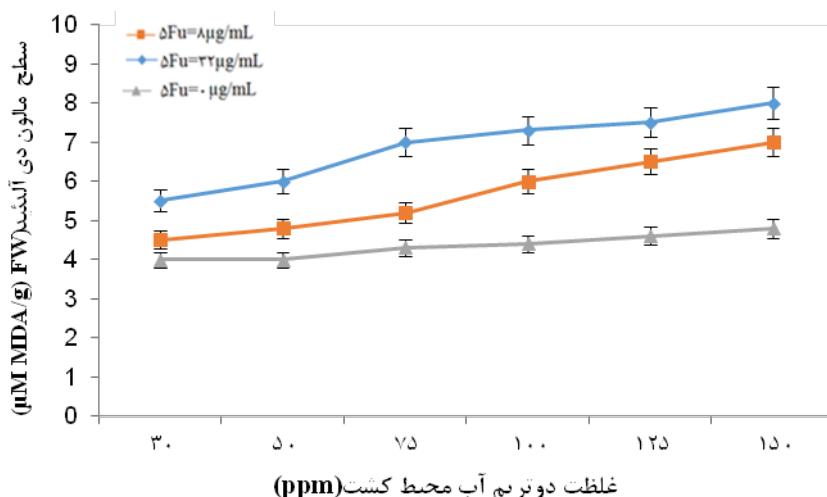
در مطالعه فعالیت آنزیم کاتالاز مشاهده گردید که هر چه غلظت دوتریوم کم تر شود، فعالیت کاتالاز روند افزایشی را نشان می دهد. بیشترین فعالیت آنزیم در غلظت ۵۰ ppm DDW

ج: نتایج میزان فاکتور مالونیل دی آلدئید

بررسی میزان فاکتور مالونیل دی آلدئید نشان داد که هر چه غلظت دوتریوم در محیط کشت زیاد می شود، سطح مالونیل دی آلدئید نیز روند افزایشی پیدا می کند (شکل ۶).



شکل ۵: فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول های MCF-7 پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف دوتریوم و غلظت های ۸ و ۳۲ µg/ml از داروی 5-FU



شکل ۶: میزان فاکتور مالونیل دی آلدئید در سلول های MCF-7 پس از ۴۸ ساعت تیمار با غلظت های مختلف دوتریم و غلظت های ۸ و ۳۲ µg/ml از داروی 5-FU

بحث

سرطانی PC-3 (سلول سرطانی پروستات)، MDA (سلول سرطانی سینه)، HT-29 (سلول سرطانی کولون) و M14 (ملانوما) از طریق به تعویق انداختن پیشرفت چرخه سلولی ارائه دادند؛ بدین معنا که سلول ها نیازمند زمان طولانی تری برای تکثیر هستند (۲۷). براساس مطالعه های انجام شده غلظت های بالای دوتریم می تواند رشد سلول ها را مهار کند و آن ها را در برابر پرتوها محافظت کند، اما در بلند مدت اثر منفی دارد. در یک مطالعه نشان داده شد که تیمار کوتاه مدت موش ها با DDW باعث کاهش طول عمر و حتی مرگ موش ها می شود (۳۱،۴). مکانیسمی که برای این اثرهای ضدسرطانی آب ارائه گردیده نشان می دهد که جایگزینی هیدروژن با دوتریم به دلیل وجود تفاوت جرمی میان هیدروژن و دوتریم منجر به بروز تغییرهایی در رفتار فیزیکی و شیمیایی سلول شده که در سیستم های بیولوژیکی از اهمیت ویژه ای برخوردار است (۳۳). مطالعه های قبلی نیاز به بررسی بیشتری داشت و به منظور تکمیل پژوهش های انجام شده پیرامون اثر آب تهی شده از دوتریم، در این تحقیق به بررسی اثر آب تهی شده از دوتریم به تنهایی و همراه با داروی 5-FU بر روی رشد سلولی و ارتباط آن با فعالیت آنزیم های سیستم آنتی اکسیدانی پرداخته شد. برای این منظور رشد رده سلولی MCF7 در محیط کشت

هدف از این مطالعه بررسی خواص ضد سرطانی آب تهی شده از دوتریم بر روی رده های سلولی سرطان سینه بود. مطالعه ما نشان داد که DDW به طور مؤثری رشد سلول های سرطانی MCF-7 را مهار می کند و تخلیه دوتریم آب باعث افزایش خاصیت توکسیسیتی وابسته به زمان و غلظت 5-FU می گردد. مطالعه های قبلی نشان داده DDW می تواند در سیستم های درون تنی و برون تنی اثر مهار رشد سلول سرطانی داشته باشد. در اولین مطالعه انجام شده در این رابطه، اثر آب تهی شده از دوتریم بر رشد رده سلولی فیروبلاستی L929 در سال ۱۹۹۰ توسط Somlyai و همکاران مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه بیان گر مهار رشد این رده سلولی در غلظت های پایین دوتریم بود. در ادامه، اثر جایگزینی آب نوشیدنی با DDW با غلظت ۳۰ ppm دوتریم بر روی موش های ترانسپلنت شده با سلول های سرطانی MCF-7 و MDA-MB-231 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی حاکی از افزایش مدت زمان زنده ماندن موش های توموری و ناپدید شدن تومور در ۵۹٪ از آن ها بود (۲۶). مطالعه های بعدی شواهدی را مبنی بر اثر مهاری DDW بر رشد سلول های

مشاهده گردید که خود DDW به تنهایی اثر مهار رشد سلولی دارد (۳۳،۲۵).

بررسی سیستم آنتی‌اکسیدانی سلول آزمایش دیگری است که در انواع تحقیق‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. لازم به توضیح است که رادیکال‌های سوپراکسید و پراکسید هیدروژن از جمله گونه‌های فعال اکسیژن هستند که به‌عنوان محصول‌های جانبی متابولیسم نرمال اکسیژن در سلول‌ها و بافت‌ها تولید می‌شوند. به‌علت فعالیت ذاتی بالای ROS، این ترکیب‌ها به‌صورت ناخواسته وارد واکنش‌هایی می‌شوند که درنهایت سبب وارد آمدن آسیب به سلول‌ها می‌گردد. اکثر سلول‌های سرطانی به‌دلیل تحریکات انکوژنیک، فعالیت متابولیک افزایش یافته و بدعملکردی میتوکندریایی، تحت استرس اکسیداتیو هستند (۳۱). در سلول‌های سرطانی، میزان واکنش‌های گلیکولیز و تنفس به‌ترتیب بیش‌تر و کم‌تر از سلول‌های نرمال هست و این تفاوت منجر به افزایش استرس اکسیداتیو می‌شود (۲۸). وضعیت اکسایشی بالا در سلول، شکل‌گیری تومور را از طریق رشد سلولی تحریک کرده و با سرکوب فعالیت‌های ضدتوموری منجر به آسیب ساختمان DNA می‌شود (۸). اثر آنتی-اکسیدانی آب تهی شده از دوتریوم از دلایل مهم دیگر به کارگیری DDW در زمینه پزشکی است. طی مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Olarium و همکاران انجام گرفت، مشخص گردید که آب تهی شده از دوتریوم در کوتاه مدت اثر پراکسیدانی دارد ولی در طولانی مدت اثرهای آنتی‌اکسیدانی خود را از طریق تحریک سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی اعمال می‌کند (۲۳). چندین فرضیه در مورد مکانیسم اثر DDW بر روی سیستم آنتی‌اکسیدانی مطرح است. مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که تغییر نسبت هیدروژن به دوتریم در سلول باعث تغییر پتانسیل غشاء سلول‌ها گردیده و فعالیت‌های فیزیوشیمیایی سلول از جمله برخی پمپ‌ها و آنزیم‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از جمله گروه‌های فعال شده توسط DDW در این راستا است. مکانیسم دیگر برای نقش احتمالی DDW در سیستم دفاعی، کاهش میزان

دارای غلظت‌های مختلف DDW به تنهایی و همراه با غلظت‌های مختلف از داروی 5-FU مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان دادند که DDW به تنهایی در غلظت‌های پایین دوتریوم (پایین‌تر از ۱۲۵ ppm) به‌خصوص در غلظت‌های ۳۰-۱۲۵ ppm، منجر به مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شود. همچنین مشاهده گردید که به‌کارگیری DDW در ترکیب با 5-FU، رشد سلولی را به طور چشم‌گیرتری مهار می‌کند. این تفاوت در تمام غلظت‌های دارو نسبت به کنترل صفر دارو قابل مشاهده بود.

در مطالعه‌ای که توسط Feng- Song Cong و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر رده سلولی A549 صورت گرفت، مشخص شد که بیش‌ترین مهار رشد سلولی در غلظت ۵۰ ppm از DDW رخ داده است (۳). در مطالعه انجام شده توسط Wang و همکاران در سال ۲۰۱۲، مهار رشد سلول‌های NPC توسط آزمون MTT و سنجش تشکیل کلونی (plate colony formation assay) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه بیان‌گر مهار رشد سلولی در غلظت‌های ۷۵/۵۰ و ۱۰۰ ppm از دوتریوم و کاهش توانایی تشکیل کلونی بود (۲۹،۳۳). در مطالعه دیگری که توسط Soleyman-Jahi و همکاران انجام شد، اثر سینرژیک داروی پاکلیتاکسل با غلظت ۰/۵ μM و غلظت‌های ۴۰، ۶۲، ۸۴، ۱۰۶ و ۱۲۸ ppm از DDW بر روی رده‌های سلولی سرطانی سینه (MDA-MB-231)، پروستات (PC-3)، روده (HCT-116) و گلیوبلاستوما (U-87MG) مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیق آن‌ها مشخص گردید که کاهش غلظت دوتریوم آب در محیط کشت سبب افزایش سمیت داروی پاکلیتاکسل بر رده‌های سلولی MDA-MB-231، PC-3، U-87MG می‌گردد ولی اثر سینرژیکی مهار رشد سلولی توسط DDW بر روی رده سلولی HCT-116 معنی‌دار نبود (۲۵). مهم‌ترین مکانیسمی که تا به حال برای DDW جهت مهار رشد سلولی مطرح گردیده است اثر مهار DDW بر سیکل چرخه سلول‌های سرطانی و القاء آپتوز است به‌طوری‌که ازدیاد و تکثیر آن‌ها را مهار می‌کند و به دنبال آن مانع ازدیاد سلول‌های جهش یافته می‌شود (۱۴،۳۴،۳۳).

نتایج تحقیق ما تا حدودی با یافته‌های این محققین هم‌خوانی دارد با این تفاوت که در مطالعه ما بر عکس یافته‌های Soleyman-Jahi ولی در مطابقت با یافته‌های Wang،

استرس اکسیداتیو از طریق کاهش فعالیت مسیر گلیکولیز سلول سرطانی و در نتیجه تغییر شرایط پراکسیداتیو سلول به نفع شرایط آنتی اکسیداتیو است (۲،۳۳).

فاکتور دیگری که در سیستم آنتی اکسیدانی و پراکسیدانی مهم است، فاکتور MDA است. مالون دی آلدئید محصول پراکسیداسیون لیپید اسیدهای چرب غیر اشباع است و یکی از چند محصول عمده در سنتز ترومبوکسان A_2 است، جایی که در آن سیکلواکسیژناز ۱ یا سیکلواکسیژناز ۲ در سلولها اسید آراشیدونیک را به پروستاگلاندین H_2 متابولیزه می کند. این محصول نیز بیش تر متابولیزه می گردد تا این که توسط ترومبوکسان سنتاز به ترومبوکسان A_2 ، هیدروکسی هپتادکاتری انوئیک اسید و مالون دی آلدئید تبدیل می گردد. علاوه بر این ممکن است به صورت غیر آنزیمی به مخلوطی از ایزومرهای ۸-سیس و ۸-ترانس ۱۲- هیدروکسی ایکازوهپتانوئیک اسید و مانویل دی آلدئید تبدیل شود (۲۲).

گونه های واکنش پذیر اکسیژن (ROS) لیپیدهای غیر اشباع را تجزیه می کنند و مانویل دی آلدئید را تشکیل می دهند. این ترکیب یک آلدئید از گونه های الکتروفیل واکنشی است که باعث ایجاد استرس سمی در سلولها می شود و به عنوان بیومارکر برای اندازه گیری سطح استرس اکسیداتیو در سلول مورد استفاده قرار می گیرد (۲۴،۷،۵).

استرس سلولی توسط کاهش میزان دوتریم در DDW عواملی باشند که باعث مهار سنتز آنزیم های اشاره شده در مسیر سنتز مالون دی آلدئید می گردند (۲،۲۳).

در پژوهش حاضر نیز فاکتورهای مؤثر در سیستم آنتی-اکسیدانی در سطح سلول مورد بررسی قرار گرفت و مشاهده شد که با کاهش غلظت دوتریم در DDW فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان سوپراکسید دیسموتاز و کاتالاز روند افزایشی پیدا می کند و بنابراین می توان چنین استنباط کرد که کاهش رشد سلولی و افزایش فعالیت آنزیم های سیستم آنتی اکسیدانی با هم ارتباط معنی داری داشته و در نهایت به صورت هماهنگ مهار رشد سلول های سرطانی را القا می کنند. از طرف دیگر مشاهده گردید که با افزایش غلظت DDW، سطح مالون دی آلدئید (فاکتور شرایط پراکسیداتیو) نیز افزایش می یابد. نتایج این پژوهش نشان داد که DDW بر عکس آب شهری (DDW150ppm) در القاء سیستم آنتی اکسیدانی و مهار شرایط پراکسیداتیو نقش مهمی را ایفا می کند.

نتیجه گیری

مطالعه های ما نشان داد که آب تھی شده از دوتریم در غلظت های پایین دوتریم به ویژه در غلظت های زیر ۱۲۵ ppm به صورت سینرژیک با داروی شیمی درمانی 5-FU، باعث کاهش رشد سلول های سرطانی سینه و القاء سیستم آنتی اکسیدانی سلول می گردد.

در مورد مکانیزم اثر MDA گزارش شده که مالون دی آلدئید با دزوکسی آدنوزین و دزوکسی گوانوزین در DNA واکنش می دهد و قطعه های DNA را تشکیل می دهد که MIG اولیه یکی از آنها بوده و موتاژن است (۹،۵،۱۹). در انسان آلدئید دهیدروژناز قادر به اکسیداسیون مالون دی آلدئید است. مشاهده گردیده است که DDW به خصوص در غلظت های پایین میزان MDA را کاهش می دهد (۱۹،۹). دلیل این کار زیاد مشخص نیست ولی احتمال داده می شود که بنابر دلایلی هم چون تغییر پتانسیل غشاء سلولی توسط تغییر نسبت دوتریم و هیدروژن و کاهش میزان دوتریم، بسته شدن یا کوتاه شدن مسیرهای چرخه سلولی از جمله فاز S و G1/M و مهار شرایط

منابع

1. Abei H. Catalase in vitro. *Methods enzymol*, 1984; 105:121-6.
2. Chen KS, Katz J. Zonation of glycogen and glucose syntheses, but not glycolysis, in rat liver. *Biochem J*, 1988; 255: 99-104.
3. Cong FS, Zhang YR, Sheng HC, Ao ZH, Zhang SY, Wang JY. Deuterium-depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis. *Exp Ther Med*, 2010; 2(1) 227-83.
4. Criss RE. Principles of stable isotope distribution. 1st ed. (NY): *Oxford University Press*; 1999.
5. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Card Dis*, 2005; 15 (4): 316-28.
6. Duffy MG. CA15-3 and related mucins as circulating markers in breast cancer. *Ann Clin Biochem*, 1999; 5:579 - 586.
7. Farmer EE, Davoine C. Reactive electrophile species. *Curr Opin Plant Biol*, 2007; 10 (4): 380-6.
8. Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2002; 2(1):38-47.
9. Hartman PE, Putative mutagens and carcinogens in foods. IV. Malonaldehyde (malondialdehyde). *Environ Mutagen*, 1983; 5(4):603-7.
10. Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danneberg P, Mooren D, Griesbach L, Duschinsky R, Schnitzer RJ, Plevin E, Scheiner J. Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature*, 1957; 179(4561):663-6.
11. Howell A, Sims AH, Ong KR, Harvie MN, Evans DGR, Clarke RB. Mechanisms of disease: prediction and prevention of breast cancer-cellular and molecular interactions. *Nat Rev Clin Oncol*, 2005; 2(12):635-46.
12. Kabel AM. Tumor markers of breast cancer: New prospective. *J Oncol Sci*, 2017; 3(1):5-11.
13. Katz JJ, Crespi HL. Isotope effects in biological system. New York (NY): *Van Nostrand Reinhold*; 1970.
14. Katz JJ, Crespi HL, Czajka DM, Finkel AJ. Course of deuteriation and some physiological effects of deuterium in mice. *Am J Physiol*, 1962; 203(5):907-13.
15. Kim JY, Van Cott EM, Lewandrowski KB. The use of decision analysis tools for the selection of clinical laboratory tests: Developing diagnostic and forecasting models using laboratory evidence. *Arch Pathol Lab Med*, 2011: 305-322.
16. Kirshenbaum I. Physical properties and analysis of heavy water. *London (NY): McGraw-Hill*; 1979.
17. Krempels K, Somlyai I, Somlyai G. A retrospective evaluation of the effects of deuterium depleted water consumption on 4 patients with brain metastases from lung cancer. *Integer Cancer Ther*, 2008; 7(3):172-81.
18. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer*, 2003; 3(5):330-8.
19. Marnett LJ. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res*, 1999; 424 (1-2): 83-95.
20. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969; 244(22):6049-55.
21. Murry RK, Ganner DK, Maybs PA, Rodwel VW. Harper's Illustrated Biochemistry. 28th ed. New Delhi(India): *McGraw-Hill*; 2009.
22. Nair V, O'Neil CL, Wang PG. Malondialdehyde. In: Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis. Nair V, O'Neil CL, Wang PG. Ltd. New York: *John Wiley & Sons*; 2008.
23. Olariu L, Petcu M, Tulcan C, Chis-Buiga I, Pup M, Florin M, et al. Deuterium depleted water-Antioxidant or Prooxidant. *Lucr St Med Vet Timisoara*, 2007:265-9.
24. Pryor WA, Stanley JP. Letter: A suggested mechanism for the production of malondialdehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem*, 1975; 40 (24): 3615-7.
25. Soleyman-Jahi S, Zendehelel K, Akbarzadeh K, Haddadi M, Amanpour S, Muhammadnejad S. In vitro assessment of antineoplastic effects of deuterium depleted water. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014; 15:2179-83.
26. Somlyai G, Jancso G, Jakli G, Vass K, Barna B, Lakics V, et al. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells. *FEBS Lett*, 1993; 317(1):1-4.
27. Somlyai G, Molnar M, Laskay G, Szabo M, Berkenyi T, Guller I, et al. Biological significance of naturally occurring deuterium: the antitumor effect of deuterium depletion. *Orv Hetil*, 2010; 151(36):1455-60.
28. Spitz DR, Sim JE, Ridnour LA, Galoforo SS, Lee YJ. Glucose Deprivation Induced Oxidative Stress in Human Tumor Cells: A Fundamental Defect in Metabolism?. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 899(1):349-62.

29. Twentyman P, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br J Cancer*, 1987; 56(3):279.
30. Varangot M, Barrios E, Sonora C, Aizen B, Pressa C, Estrugo R, et al. Clinical evaluation of a panel of mRNA markers in the detection of disseminated tumor cells in patients with operable breast cancer. *Oncol Rep*, 2005; 14(2):537-46.
31. Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 2006; 160(1):1-40.
32. Wang H, Zhu B, He Z, Fu H, Dai Z, Huang G, et al. Deuterium-depleted water (DDW) inhibits the proliferation and migration of nasopharyngeal carcinoma cells in vitro. *Biomed Pharmacother*, 2013; 67(6):489-96.
33. Xu Y, Xin Y, Diao Y, Lu C, Fu J, Luo L, et al. Synergistic effects of apigenin and paclitaxel on apoptosis of cancer cells. *PloS one*, 2011; 6(12):e29169.
34. Yavari K, Gholamali M, Yazdian F. Decreasing of Deuterium Concentration of Water: A Possible Tool in Diabetes Therapy. *Electron J Boil*, 2017; 13(4): 314-319.