

# Влияние гидроплазмы на пролиферативный потенциал клеточной культуры ММСК человека

Еремин П.С., Костромина Е.Ю., Воробьева И.Г., Фесюн А.Д.

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр реабилитации и курортологии» Минздрава России

[ereminps@gmail.com](mailto:ereminps@gmail.com)

**Abstract.** Рассмотрено влияние биологически активной добавки «Гидроплазма» на пролиферативный потенциал коммерческой культуры клеток ММСК человека. Оценивали такие параметры как: цитотоксичность исследуемого препарата, время удвоения клеточной популяции, исследование клеточной миграции и межклеточного взаимодействия (Wound Healing Assay), и секреторную активность клеточной культуры. Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистического пакета IBM SPSS Statistics 19.

Было показано, что в гидроплазме «Water for life», в рекомендуемых производителем концентрациях, и в гидроплазме «Absolute Energy», в предельно низкой концентрации, не было обнаружено статистической значимой разницы в пролиферативной и секреторной активности клеточной культуры по сравнению с контрольной культурой ММСК. При оценке общего влияния гидроплазмы АЕ в стандартной концентрации было отмечено, что, начиная с 1 суток культивирования, отмечается гибель единичных ММСК. К 5 суткам после начала эксперимента абсолютно все клетки погибают. С этим связано низкое содержание в кондиционированной среде TNF $\alpha$ , IL-6/-8, а также небольшое увеличение количества IL-10.

## 1. Введение

Одной из причин патологических процессов в организме, приводящих к различным соматическим заболеваниям является повреждение клеточных оболочек и других клеточных структур свободными радикалами кислорода. Кроме того, по мере старения организма возрастает активность свободных радикалов, приводящих к оксидативному стрессу клеточных структур (1-2).

Оксидативный стресс это химическое внутриклеточное состояние, которое отражает дисбаланс между образованием активных форм кислорода (свободные радикалы и пероксиды) и способностью клетки инактивировать их с помощью антиоксидантной системы (глутатион, аскорбиновая кислота, токоферол, карнитин, пентоксифиллин и т.д.) (3). С целью коррекции процессов свободнорадикального окисления (СРО) при различных заболеваниях используются лекарственные препараты, обладающие антиоксидантной активностью. Все антиоксиданты (АО) классифицируют на препараты косвенного и прямого действия. АО косвенного действия проявляют активность *in vivo* и неэффективны *in vitro*, стимулируют АОС и способны уменьшать интенсивность СРО. АО прямого действия обладают выраженными антирадикальными свойствами, которые определяются в тестах *in vitro*. Основная часть лекарственных препаратов, обладающих антиоксидантным эффектом, относится к этой группе (4-6).

В последнее время интерес к природным, натуральным препаратам (нутрицевтикам, парафармацевтикам) значительно вырос, так как они более безопасны и физиологичны для организма человека. Одним из самых распространенных природных соединений являются биофлавоноиды – крупнейший класс растительных полифенолов (7). Среди множества биологических добавок с биофлавоноидами можно выделить так называемую «Гидроплазму». По заявлению производителя, «Гидроплазма» представляет собой концентрат для приготовления биогенной воды, которая увеличивает степень биологической активности любой жидкости, упорядочивая ее структуру, создавая эффект структуризации биоплазмы с энергоемкой биогенной памятью «живой воды». Данный продукт нейтрализует воздействие радикалов, восстанавливает центральную и нервную систему, мышечный аппарат, повышает работоспособность головного мозга на 20-25%, повышает силовые показатели при физических нагрузках, увеличивает выносливость, работоспособность, наполняет организм энергией, улучшает концентрацию, память. Нейтрализует все виды зависимостей, незаменим при больших умственных нагрузках, при физических тренировках, подъемах в горы и в тех сферах, где нужны затраты человеческого ресурса. Это концентрат при широком спектре заболеваний, необходим для восстановления при

тяжелых состояниях, способствует скорейшему выздоровлению, обладает профилактирующими свойствами, обеспечивает здоровьем, молодостью, энергией, стрессоустойчивостью и долголетием.

Все вышеизложенное явилось поводом для исследования эффективности и безопасности гидроплазмы *in vitro* на культуре клеток ММСК человека.

### **Материалы и методы.**

Исследование влияния гидроплазмы на пролиферативный потенциал клеточной культуры ММСК человека проводили на коммерческой линии клеток мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) человека (Sigma-Aldrich (Merck), Lot.: 492-05A, 2-й пассаж). Нарращивание клеточной массы проводилось согласно рекомендации производителя, на ростовой среде, предназначенной для культивирования ММСК. Объекты исследования – Гидроплазма Absolute Energy (AE) и Гидроплазма Water for Life (WoL) разводили в ростовой среде согласно инструкции до концентрации  $\times 1$ ,  $\times 0,5$  и  $\times 2$ , в случае гидроплазмы AE, в исследование было включено предельно высокое разведение  $\times 10^{-5}$ .

Для оценки пролиферативного потенциала, культуру клеток пассировали на 6-ти луночные планшеты из расчета  $10^4$ кл/см<sup>2</sup>, добавляли исследуемые препараты в различных концентрациях и культивировали в течение 5 суток. Рост клеток визуализировали каждые 24 часа при помощи инвертированного микроскопа Zeiss Axio Observer A1 с цифровой камерой AxioCam MRC5, на программном обеспечении Axiovision. По истечению времени культивирования клетки снимали раствором трипсина с 0,25% ЭДТА (StemCellTechnology, США) с поверхности пластика, производили подсчет с оценкой жизнеспособности на автоматизированном счетчике Bio-Rad TC-20 (Bio-Rad, США) по методике производителя и рассчитывали время удвоения клеточной популяции (DT) по формуле:  $TD = (\log_2 2) \times t / [\log_2(N/N_0)]$ , где  $t$  — время прироста популяции,  $N$  — число клеток через время  $t$ ,  $N_0$  — исходной число клеток.

Для изучения клеточной миграции и межклеточного взаимодействия использовали метод Wound healing assay. Культуру клеток так же пассировали на 6-ти луночный планшет из расчета  $10^4$ кл/см<sup>2</sup> и культивировали до образования монослоя. После чего моделировали «царапину» при помощи носика стерильной серологической пипетки и добавляли в культуральную среду исследуемые препараты. Визуализировали изменения при помощи микроскопа.

Для оценки секреторной активности по завершению эксперимента по оценке пролиферативного потенциала, оценивали среду в которой культивировались ММСК. Полученную кондиционированную среду аккуратно отбирали в отдельные промаркированные пробирки и замораживали при  $-20^\circ\text{C}$ . После получения образцов кондиционированных сред проводили оценку секреторной активности клеток в культуральной среде с использованием ИФА-наборов Вектор-Бест (Россия) по методике производителя.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистического пакета IBM SPSS Statistics 19. Парное сравнение групп проводилось с использованием непараметрического критерия по Манну-Уитни. Данные, приведенные в результатах и обсуждении представлены в виде Me [Q1;Q3]

### **Результаты и обсуждение.**

При визуальной оценке, токсичность препарата WoL не отмечается. Клетки хорошо растут в присутствии препарата. При совместном культивировании с WoL на 3 сутки культивирования визуально наблюдается некоторое опережение группы контроля в скорости роста. Визуальной разницы между разведениями  $\times 0,5$ ,  $\times 1$ ,  $\times 2$  не отмечалось. В связи с чем было принято решение продолжать дальнейший эксперимент в разведении  $\times 1$ . При оценке роста культуры клеток с препаратом AE в разведениях  $\times 0,5$ ,  $\times 1$ ,  $\times 2$  отмечалось гибель культуры клеток ММСК, что вероятно связано с наличием фотодинамические активные компоненты, имеющие синезеленоватый оттенок в составе препарата. При предельно разведении препарата AE  $\times 10^{-5}$ , токсическое воздействие на клетки отсутствует (рис.1).

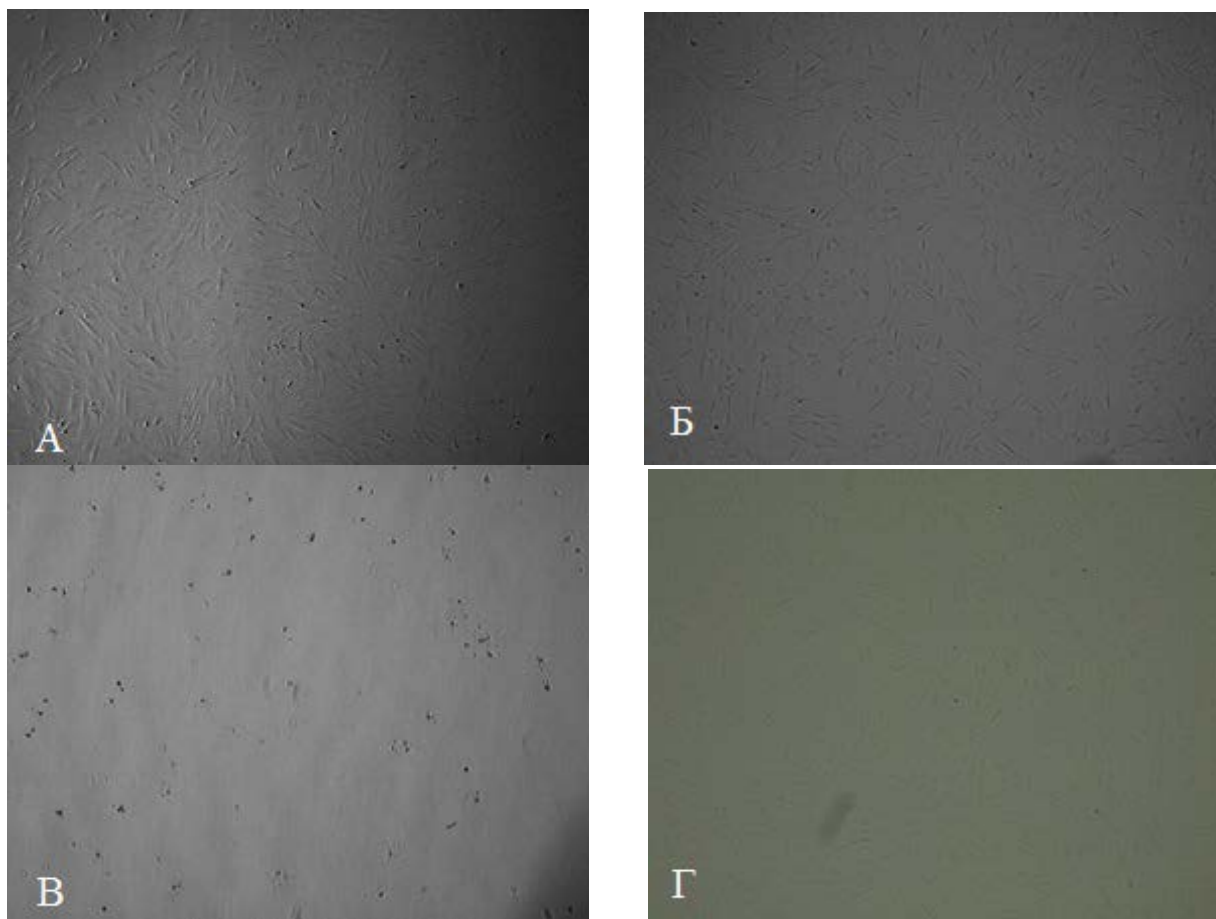


Рис.1 Фотография культуры клеток ММСК в среде на 5 сутки культивирования. А – нативная культура клеток ММСК, Б - культура клеток ММСК в среде, содержащей исследуемый препарат WoL в концентрации  $\times 1$ , В - культура клеток ММСК в среде, содержащей исследуемый препарат АЕ в концентрации  $\times 1$ , Г - культура клеток ММСК в среде, содержащей исследуемый препарат АЕ в концентрации  $\times 10^{-5}$ . Ув.  $\times 50$

При исследовании пролиферативной активности отмечена равнозначная динамика роста опытных и контрольных культур клеток ММСК. Количество получаемых клеток с одной культуральной посуды в группе контроля составило  $221[197;237,5]\times 10^3$ , против  $210[193,5;223,5]\times 10^3$  клеток в исследуемой группе WoL в разведении  $\times 1$  и  $212,5[190,75;242]\times 10^3$  в группе АЕ с концентрацией  $\times 10^{-5}$ . Время удвоения клеточной популяции (DT) для контрольной группы ММСК составила  $54,77[52,62;64,23]$  часа, что соответствует литературным данным. При культивировании клеток в средах, содержащих препарат WoL DT составило  $56,57[54,67;63,61]$  ч. В связи с тем, что в культуре ММСК, которые культивировались в среде, содержащей препарат АЕ в стандартных концентрациях не обнаружено жизнеспособных клеток, параметр время удвоения клеточной популяции не рассчитывался. При концентрации  $\times 10^{-5}$  препарата АЕ, скорость пролиферации клеток ММСК составила  $55,9[52,23;65,33]$  часа. Статистически значимой разницы между контрольной культурой клеток и клетками, культивируемыми в средах, содержащих препарат WoL, не обнаружено, что позволяет предположить одинаковую скорость пролиферации клеточной культуры.

Для визуальной наглядности пролиферативной активности клеточной культуры ММСК был проведен Wound healing assay – исследование клеточной миграции и межклеточного взаимодействия (рис. 2).

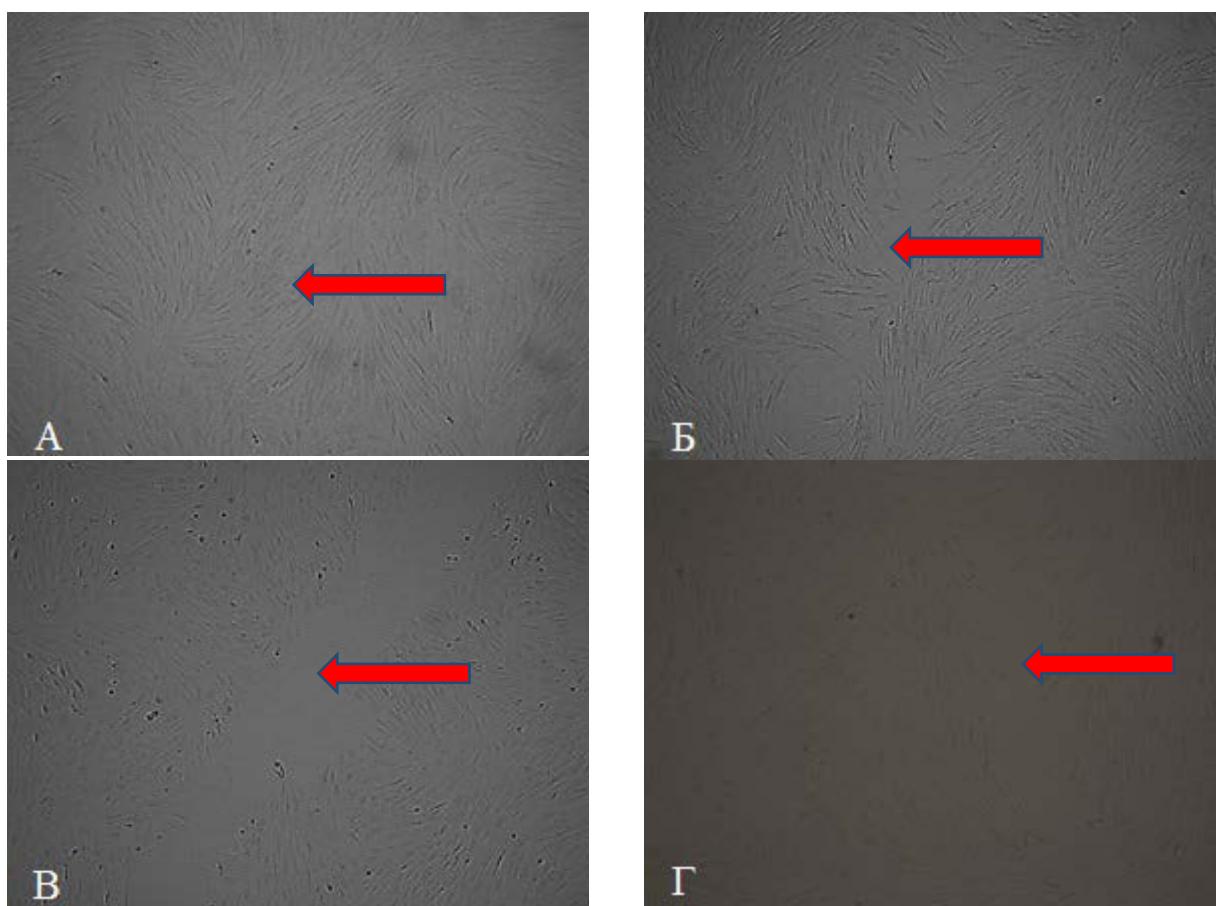


Рис.2 Wound healing assay, 18 часа культивирования после формирования «царапины» на монослое. А – ММСК культивируемые в стандартной ростовой среде, Б – ММСК культивируемые в среде, содержащую препарат WoL в разведении  $\times 1$ . В - ММСК культивируемые в среде, содержащую препарат AE в концентрации  $\times 1$ . Г - ММСК культивируемые в среде, содержащую препарат AE в концентрации  $\times 10^{-5}$ . Ув.  $\times 50$ . Красной стрелкой указано место «царапины».

На представленных фотографиях видно, что в контрольной группе клетки активно мигрируют и полностью закрыли «дефект» монослоя. В культуре ММСК, которые культивировались в среде с добавлением препарата WoL, клетки закрыли дефект на 80%, так же как и в среде с добавлением препарата AE в концентрации  $\times 10^{-5}$ . Полное закрытие дефекта наблюдалось через 24 часа после начала эксперимента. При культивировании в среде, содержащей гидроплазму AE в концентрации  $\times 1$ , клетки не мигрировали, ошаривались, в ростовой среде наблюдались единичные мертвые клетки.

Данные секреторной активности кондиционированной среды в контроле полностью коррелируют с литературными данными (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты исследования секреторной активности ММСК в контрольной и опытных группах

	TNF $\alpha$ (пг/мл)	IL-6 (пг/мл)	IL-8 (пг/мл)	IL-10 (пг/мл)
Контроль	2,4[2,2;2,85]	71,8[71,7; 74,6]	65,1[61,9;67,7]	2,8[1,7; 3,4]
WoL $\times 0,5$	3,5[2,1;3,8]	68,6[62,4;71,9]	67,1[60,5;70,4]	1,8[1,3; 2,2]
WoL $\times 1$	4,8[1,8;5,4]	70,4[58,7;72,4]	58,7[54,4;61,1]	1,6[1,1; 2,3]
WoL $\times 2$	1,8[1,7;2,1]	75,9[75,1; 78,9]	68,1[67,1; 70,6]	1,3[1,1; 1,6]
AE $\times 10^{-5}$	2,3[1,9;2,6]	70,3[65,3; 78,7]	68,3[63,9;71,1]	2,5[1,2; 3,1]
AE $\times 0,5$	0	22,5[16,5; 27,6]*	17,3[16,2;18,5]*	5,8[4,6; 6,7]*
AE $\times 1$	0	19,1[10,5;25,2]*	15,7[15,3; 16,4]*	6,2[4,9;7,1] *
AE $\times 2$	0	11,8[10,3;12,8]*	12,9[11,3; 13,8]*	5[4,3;5,5]*

\* отмечено статистические значимые различия ( $p < 0,05$ ).

Секреторная активность ММСК, которые культивировались в среде с добавлением препарата WoL и препарата АЕ в предельно низкой концентрации, сопоставима с контролем. Незначительно выше уровень секреции клетками TNF $\alpha$ . Статистически значимых различий не обнаружено. Секреторная активность IL-6/-8 ММСК, которые культивировались в среде с добавлением препарата АЕ в нормальной концентрации была ниже в 5 раз, клетки TNF- $\alpha$  не секретировали, секреция IL-10 была выше в 2-3 раза. По – видимому, это связано с ранней гибелью клеток.

### **Выводы**

В рамках работы были проанализированы 2 образца гидроплазмы: WoL и АЕ. Каждый образец был проанализирован в 3 разведениях, в трех повторениях. По полученным данным вычислено среднее значение и стандартное отклонение. При оценке общего влияния гидроплазмы WoL и гидроплазмы АЕ в предельно низкой концентрации на пролиферативную и секреторную активность ММСК не было обнаружено статистической значимой разницы по сравнению с контрольной культурой ММСК. При оценке общего влияния гидроплазмы АЕ было отмечено, что, начиная с 1 суток культивирования, отмечается гибель единичных ММСК. К 5 суткам после начала эксперимента абсолютно все клетки погибают. С этим связано низкое содержание в кондиционированной среде TNF $\alpha$ , IL-6/-8, а также небольшое увеличение количества IL-10.

### **Список литературы**

1. Каликинская Е.Ю. Антиоксиданты - защита от старения и болезней. Наука и жизнь. 2000. N 8. с.90-94
2. Баджинян С.А. Антиоксидантная терапия – защита мозга от свободных радикалов. Медицинская наука Армении. 2017. т. LVII. № 1. С. 35-44
3. Новиков А.И., Фесенко В.Н., Кореньков Д.Г. и др. Новый взгляд на коррекцию оксидативного стресса в семенной плазме у мужчин с патоспермией в инфертильном браке // Вопросы урологии и андрологии. - 2016. -№ 4 (3). - С. 11-17.
4. Шахмарданова С.А. , Гулевская О.Н. , Селецкая В.В. и др. Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине. Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2016. N3. С. 4-15
5. Ушкалова Е.А. Антиоксидантные и антигипоксические свойства актовегина у кардиологических больных. Трудный пациент. 2005; 3(3): 22-6.
6. . Halliwell В. The antioxidant paradox. Lancet. 2000; 355: 1179- 80.
- 7.. Трегубова И.А., Косолапов В.А., Спасов А.А. Антиоксиданты: современное состояние и перспективы. Успехи физиологических наук. 2012. Т. 43. № 1. С. 75–94