Probl Cryobiol Cryomed 2018; 28(1):049–053
https://doi.org/10.15407/cryo28.01.049

УДК 546.212:546.11*2:611.013.395.085.23

А.В. Злацкая[1,2], Д.А. Зубов[1,2], Р.Г. Васильев[1,2], А.В. Сыроешкин[3], И.А. Злацкий[3,4,*]

Влияние дейтерия на пролиферацию и клоногенный потенциал дермальных фибробластов человека *in vitro*

UDC 546.212:546.11*2:611.013.395.085.23

O.V. Zlatska[1,2], D.O. Zubov[1,2], R.G. Vasyliev[1,2], A.V. Syroeshkin[3], I.A. Zlatskiy[3,4,*]

Deuterium Effect on Proliferation and Clonogenic Potential of Human Dermal Fibroblasts *In Vitro*

Ключевые слова: изотопный состав воды; вода, обедненная по дейтерию; дермальные фибробласты человека; пролиферативный потенциал; колониеобразующая способность.

Ключові слова: ізотопний склад води; вода, збіднена по дейтерію; дермальні фібробласти людини; проліферативний потенціал; здатність до колонієутворення.

Key words: water isotopic composition; deuterium depleted water; human dermal fibroblasts; proliferative potential; colony-forming ability.

Все живые организмы эволюционно адаптированы к природной воде с постоянным соотношением изотопов водорода протия и дейтерия 0,24 М [1, 4]. Исследования физических и химических свойств воды с разным соотношением изотопов водорода выявили аномальные явления в воде с пониженным либо повышенным содержанием дейтерия, связанные с колоссальным изотопным эффектом [5, 10].

В органических химических соединениях, входящих в состав живых тканей, дейтериевая вода более устойчивая, поэтому практически не участвует в обменных процессах и тормозит их [2, 9]. Протекторные свойства воды, обедненной по дейтерию (ddw – deuterium depleted water), подтверждены результатами токсикологических исследований. За счет транспортных свойств ddw эффективно выводит токсины и продукты метаболизма из организма [3, 6, 8].

На молекулярном уровне выявлены некоторые особенности динамики реакций дыхательной цепи в митохондриях при изменении изотопного состава воды: снижает содержание дейтерия в воде до уровня, ниже природных концентраций, деингибирует и ускоряет исследуемую реакцию [7, 10].

С учетом вышеописанного роль дейтерия в биологических системах *in vitro* окончательно не опре-

All living organisms have been evolutionarily adapted to natural water with 0.24 M constant ratio of hydrogen isotopes: protium and deuterium [3, 7]. Studies of physical and chemical properties of water with different ratio of hydrogen isotopes revealed abnormal phenomena in water with either reduced or increased deuterium content, associated with a huge isotopic effect [4, 10].

In organic chemical compounds within living tissues the deuterium water is more stable, and that is why it scarcely participates in metabolic processes and inhibits them [6, 9]. Protective properties of deuterium depleted water (DDW) are confirmed by findings in toxicological research. The DDW efficiently removes toxins and metabolic products out of body due to its transport properties [2, 5, 8].

Some features in dynamics of respiratory chain reactions in mitochondria were revealed at the molecular level when changing water isotope composition, *i. e.* a decrease in deuterium content in water down to the level below natural concentrations de-inhibited and accelerated the studied reaction [6, 8].

Proceeding from the stated above the role of deuterium in the *in vitro* biological systems has not been finally determined yet. In this context this research was aimed to study the effect of isotope composition of deuterium

[1]Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України, м. Київ, Україна
[2]Біотехнологічна лабораторія ilaya regeneration, Медична компанія ilaya®, м. Київ, Україна
[3]Російський університет дружби народів, м. Москва, Росія
[4]Інститут колоїдної хімії та хімії води ім. А.В. Думанського НАН України, м. Київ, Україна

[1]State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
[2]Biotechnological Laboratory ilaya regeneration, Medical Company ilaya®, Kyiv, Ukraine
[3]Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia
[4]A.V. Dumansky Institute of Colloid Chemistry and Water Chemistry of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**
вул. Вишгородська, 67, м. Київ, Україна 04114;
тел.: (+38 044) 468-75-50; факс: (+38 044) 468-75-41
електронна пошта: zlatskiy@ukr.net

***To whom correspondence should be addressed:**
67, Vyshhorodska str., Kyiv, Ukraine 01114;
tel.:+380 44 468 7550, fax: +380 44 468 7541
e-mail: zlatskiy@ukr.net

Надійшла 26.01.2018
Прийнята до друку 19.02.2018

Received January, 29, 2018
Accepted February, 19, 2018

© 2018 I.A. Zlatskiy et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

делена. В связи с этим целью работы было изучить влияние изотопного состава среды, обедненной по дейтерию, на пролиферацию и колониеобразующую способность фибробластов человека в культуре *in vitro*.

Физико-химический анализ воды с разным содержанием дейтерия. В работе использовали исходную ddw с концентрацией дейтерия 0,6 мМ (ЗАО «Легкая вода»). В ходе приготовления ростовых сред для культивирования конечная концентрация изотопа водорода составляла 1,1 мМ. Контролем служила деионизированная вода системы miliQ с концентрацией дейтерия 16 мМ – природное соотношение дейтерия/протия. По физико-химическим показателям [5] и микроэлементному составу деионизированная вода и ddw не имели отличий, кроме концентрации дейтерия, что исключило многофакторность в группах сравнения.

Химический анализ воды с разным содержанием дейтерия осуществляли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе «ICP-QMS Agilent 7500CE» («Agilent Technologies», США). Для градуировки прибора использовали градуировочные растворы в широком интервале концентраций элементов (0,1–100 мкг/дм^3) по международному стандартному образцу 2.74473.0100 «ICP Multi Element Standard Solution XXI CertiPUR®», содержащему следующие элементы: Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn, Hg. Установлено, что в ddw и деионизированной воде концентрация всех элементов не превышала предел обнаружения –10^{-6} мг/дм^3.

Культивирование дермальных фибробластов человека. Работу выполняли на основании информированного согласия доноров на использование полученных дермальных фибробластов в данном исследовании.

Дермальные фибробласты человека (ДФЧ) получали после ферментативной обработки из биоптатов кожи в растворе 0,1%-й колагеназы IA («Sigma», США) и 0,1%-й проназы («Sigma») с добавлением 2%-й эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Sigma», в течение 2 ч. Суспензию клеток переносили в культуральную посуду и культивировали на среде 199 («Sigma»), приготовленной из 10-кратного концентрата путем разведения ddw и водой с природным изотопным составом. Дополнительно в культуральную среду добавляли 10%-ю ЭТС («Sigma»), 2 мМ глутамина («Sigma») и 1×10^{-12} г/дм^3 FGF-2 («Sigma»). Культивирование проводили в мультигазовых инкубаторах при 37°С при абсолютной влажности 5%-й концентрации CO_2; 5 и 20%-х концентрациях O_2. Для изучения колониеобразующей способности на дно

depleted medium on proliferation and colony-forming ability of human fibroblasts in an *in vitro* culture.

Physicochemical analysis of water with different deuterium content. We used here an initial DDW with 0.06 mM deuterium concentration (CJSC Legkaya Voda, Russia). When preparing the growth media for cultivation, the final concentration of hydrogen isotope was 1.1 mM. The deionized water of miliQ system with 16 mM deuterium concentration (natural deuterium/protium ratio) served as the control. By physicochemical parameters [4] and microelement composition, a deionized water and DDW had no differences, except deuterium concentration, which excluded multifactority in comparison groups.

Water with different deuterium content was chemically analyzed with inductively coupled plasma mass spectrometry using the ICP-QMS Agilent 7500CE device (Agilent Technologies, USA). For calibration of instrument we used the graduating solutions within a wide range of element concentrations (0.1–100 μg/dm^3) according to the international certified reference standard 2.74473.0100 ICP Multi Element Standard Solution XXI CertiPUR®, containing the following elements: Ag, Al, As, Ba , Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, U, V, Zn, Hg. It was found that in DDW and deionized water the concentration of all the elements did not exceed the detection limit –10^{-6} mg/dm^3.

Culture of human dermal fibroblasts. The research was implemented with the informed consent of donors to use the procured dermal fibroblasts in this study.

Human dermal fibroblasts (HDF) were derived after enzymatic treatment from skin bioptates in 0.1% collagenase IA solution (Sigma, USA) and 0.1% pronase (Sigma), supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) (Sigma) for 2 hrs. The cell suspension was transferred into a culture dish and cultured in medium 199 (Sigma), prepared from a 10-fold concentrate by diluting with DDW or water with a natural isotope composition. The culture medium was additionally supplemented with 10% FBS (Sigma), 2 mM glutamine (Sigma) and 1×10^{-12} g/dm^3 FGF-2 (Sigma). The culture was performed in multi-gas incubators at 37°C with absolute humidity, 5% CO_2 concentration; 5 and 20% O_2 concentrations. To study the colony-forming ability, 100 cells were inoculated onto the bottom of the Petri dish (100 mm diameter) (herewith the FBS concentration in growth medium increased up to 20%.). In 14 days the cells were fixed with cold ethanol and stained with azur-eosin by Romanowsky to calculate the number of colonies. The experiment was performed in triplicate for each cell line in passages 2 and 4 (P2 and P4, respectively).

чашки Петри (диаметр 100 мм) засевали по 100 клеток (при этом концентрация ЭТС в ростовой среде повышалась до 20 %). Через 14 суток клетки фиксировали холодным этанолом и окрашивали азур-эозином по Романовскому для подсчета числа колоний. Эксперимент проводили в трех повторах на каждую линию клеток на втором (П2) и четвертом (П4) пассажах.

Эффективность колониеобразования вычисляли по стандартной формуле

ЭК = (количество сформированных колоний/количество посеянных клеток) × 100%.

Показатель времени удвоения клеточной популяции (population doubling time, PDT) определяли на 2–6-м пассажах по стандартной формуле

$$PDT = T / 3{,}31 \lg (X_k / X_0),$$

где T – время культивирования клеток; X_k – количество полученных клеток; X_0 – количество засеянных клеток.

Наблюдение за ДФЧ проводили с помощью светового микроскопа «Axio ObserverA1» и программного обеспечения «ZEN 2012» с использованием фотокамеры «AxioCam ERc 5s» (все производства «Carl Zeiss», Германия).

Статистическую обработку данных выполняли стандартными статистическими методами с применением «Excel» («Microsoft», США), «Origin 8» (США). Для определения различий между двумя группами данных использовали t-критерий Стьюдента при $p < 0{,}05$.

Показатели пролиферации дермальных фибробластов человека *in vitro* в среде на основе воды с разной концентрацией дейтерия (n = 3)

Proliferation indices of human dermal fibroblasts *in vitro* in water-based medium with differently concentrated deuterium (n = 3)

Пассаж Passage	Группы сравнения Comparison groups	ЭК % ECF, %	PDT, ч PDT, hr
П2 P2	Контроль Control	22 ± 1,9	41 ± 1,4
	ddw	28 ± 2,1*	44 ± 1,5*
П3 P3	Контроль Control	–	33 ± 0,9
	ddw	–	34 ± 1,1
П4 P4	Контроль Control	16 ± 1,5	39 ± 1,4
	ddw	11 ± 1,2*	37 ± 1,2
П5 P5	Контроль Control	–	54 ± 1,6
	ddw	–	51 ± 1,5*
П6 P6	Контроль Control	–	58 ± 1,6
	ddw	–	52 ± 1,6*

Примечание: * – различия значимы между двумя группами, $p < 0{,}05$.

Note: * – significance of differences between two groups, $p < 0.05$.

Показатель ЭК в условиях нормоксии был значительно ниже в обеих группах сравнения, чем в условиях гипоксии, поэтому эксперимент проводили только при 5% содержании O_2.

Результаты культивирования дермальных фибробластов человека *in vitro* при разных соотношениях дейтерия и протия в ростовых средах при 5%-м содержании O_2 представлены в таблице.

На этапе П2 установлено, что присутствие ddw способствует активации колониеобразования при смене условий культивирования клеток со среды с природным изотопным составом на воду, обедненную по дейтерию. На П4 уже наблюдалась иная картина: ЭК в культуре ДФЧ была выше после культивирования в средах, приготовленных на основе воды с природным изотопным составом. В ddw выявлено значимое снижение ЭК не только по сравнению с результатами на П2, но и с показателем воды природного изотопного состава.

В результате изучения показателя PDT культуры ДФЧ в средах с разным изотопным соотношением дейтерия и протия установлено, что на поздних пассажах (П5, П6) он значимо не отличался. В обеих

The efficiency of colony formation (ECF) was calculated by the standard formula

ECF = (number of colonies formed / number of inoculated cells) × 100%.

The index of population doubling time was determined in passages 2–6 by the standard formula

$$PDT = T / 3.31 \lg (X_k / X_0),$$

where T is time of cell culture; X_k is a number of obtained cells; X_0 is a number of inoculated cells.

The HDF were observed with light microscope Axio Observer A1 and ZEN 2012 software using AxioCam ERc 5s camera (all manufactured by Carl Zeiss, Germany).

The data were statistically processed with the standard statistical methods using Microsoft Excel (USA), Origin 8 (USA) softwares. The Student's t-test at $p < 0.05$ was used to determine the differences between two groups of data.

The ECF index under normoxia was significantly lower in both comparison groups than under hypoxic conditions, therefore the experiment was carried out only at 5% O_2 content.

The findings of *in vitro* culture of human dermal fibroblasts at different ratios of deuterium and protium

группах сравнения наблюдалось увеличение РДТ по сравнению с результатами, полученными на более ранних пассажах, что свидетельствует о начале старении популяции и снижении пролиферативной активности клеток, причем в ddw данный показатель имел меньшую динамику снижения. Возможно, при отсутствии дейтерия в культуральной среде замедляется процесс старения культуры и сохраняется высокий уровень пролиферации клеток. Однако для подтверждения данного предположения необходимо проведение дополнительных исследований.

Таким образом, показана возможность использования клеточных культур *in vitro* для изучения биологической активности воды с разным изотопным соотношением дейтерия и протия. Установлено, что присутствие ddw в ростовых средах по-разному влияет на пролиферативную активность и колониеобразующую способность дермальных фибробластов человека в культуре *in vitro*, по сравнению с водой, имеющей природный изотопный состав.

Публикация подготовлена при поддержке Программы РУДН «5-100».

Литература

1. Игнатов И., Мосин О.В. Изотопный состав воды и ее температура в процессе эволюционного происхождения жизни и живой материи, Науковедение 2013; 14(1): 1–16.
2. Boros L.G., D'Agostino D.P., Katz H.E. et al. Submolecular regulation of cell transformation by deuterium depleting water exchange reactions in the tricarboxylic acid substrate cycle. Med Hypotheses 2016; 87: 69–74.
3. Doina P.M., Olariu L., Cuna S. et al. Bulletin UASVM, Veterinary Medicine 2008; 65(1): 1843.
4. Goncharuk V.V. Science about water. Kyiv: Naukova dumka; 2010.
5. Goncharuk V.V., Kavitskaya A.A., Romanyukina I.Yu., Loboda O.A. Revealing water's secrets: deuterium depleted water. Chemistry Central Journal 2013; 7: 103–107.
6. Goncharuk V.V., Syroeshkin A.V., Zlatskiy I.A. et al. Quasi-chemical description of the kinetics of cell death Spirostomum ambiguum biosensor for biological activity of aqueous solutions. Journal of Water Chemistry and Technology 2017; 39(2): 97–102.
7. Hang M., Huynh V., Meyer T.J. Colossal kinetic isotope effects in proton-coupled electron transfer. PNAS 2004; 101(36): 13138–13141.
8. Pomytkin I.A., Kolesova O.E. Relationship between Natural Concentration of Heavy Water Isotopologs and Rate of H_2O_2 Generation by Mitochondria. Bull Exp Biol Med 2006; 142(5); 570–572.
9. Robins R.J., Remaud G.S., Billault I. Natural mechanisms by which deuterium depletion occurs in specific positions in metabolites. European Chemical Bulletin 2012; 1(1): 39–40.

in growth media under 5% O_2 content are presented in the Table.

At P2 stage the DDW presence was established to promote the colony formation activation when changing the culture conditions from a medium with natural isotope composition to deuterium depleted water. In P4 there has been already observed a different picture: the ECF in HDF culture was higher after culturing in the water-based media with a natural isotopic composition. In DDW there was revealed a significant decrease in ECF not only in comparison with the P2 findings, but as compared with water index of natural isotopic composition as well.

As a result of studying the PDT index of HDF culture in the media with different isotopic ratio of deuterium and protium, it was established as not significantly differing in late passages (P5, P6). The PDT increase was observed in both comparison groups *vs.* the findings obtained in earlier passages, which testified to the onset of population ageing and a decrease in cell proliferative activity, moreover this index had a lower decrease dynamics in DDW. Perhaps with no deuterium in culture medium the process of culture ageing slows down and a high level of cell proliferation is kept. However, this assumption requires additional studies to be confirmed.

Thus, the possibility of using *in vitro* cell cultures to study biological activity of water with different isotopic ratio of deuterium and protium was demonstrated. The DDW presence within the growth media base was established to differently affect the proliferative activity and colony-forming ability of human dermal fibroblasts in an *in vitro* culture, as compared to water with natural isotope composition.

The publication was supported by the Peoples' Friendship University of Russia Program 5-100.

References

1. Boros L.G., D'Agostino D.P., Katz H.E. et al. Submolecular regulation of cell transformation by deuterium depleting water exchange reactions in the tricarboxylic acid substrate cycle. Med Hypotheses 2016; 87: 69–74.
2. Doina P.M., Olariu L., Cuna S. et al. Bulletin UASVM, Veterinary Medicine 2008; 65(1): 1843.
3. Goncharuk V.V. Science about water. Kyiv: Nauk Dumka; 2010.
4. Goncharuk V.V., Kavitskaya A.A., Romanyukina I.Yu., Loboda O.A. Revealing water's secrets: deuterium depleted water. Chemistry Central Journal 2013; 7: 103–107.
5. Goncharuk V.V., Syroeshkin A.V., Zlatskiy I.A. et al. Quasichemical description of the kinetics of cell death Spirostomum ambiguum biosensor for biological activity of aqueous solutions. Journal of Water Chemistry and Technology 2017; 39(2): 97–102.

10.Turov V.V., Goncharuk V.V., Ogenko V.M. et al. The isotope effect in formation of surface water clusters in heterogeneous systems. Journal of Water Chemistry and Technology 2015; 37: 211–218.

6. Hang M., Huynh V., Meyer T.J. Colossal kinetic isotope effects in proton-coupled electron transfer. PNAS 2004; 101(36): 13138–13141.
7. Ignatov I., Mosin O.V. Isotopic composition of water and its temperature in process of evolutionary origin of life and living matter. Naukovedenie 2013; 14 (1): 1–16.
8. Pomytkin I.A., Kolesova O.E. Relationship between natural concentration of heavy water isotopologs and rate of H_2O_2 generation by mitochondria. Bull Exp Biol Med 2006; 142(5); 570–572.
9. Robins R.J., Remaud G.S., Billault I. Natural mechanisms by which deuterium depletion occurs in specific positions in metabolites. European Chemical Bulletin 2012; 1(1): 39–40.
10.Turov V.V., Goncharuk V.V., Ogenko V.M. et al. The isotope effect in formation of surface water clusters in heterogeneous systems. Journal of Water Chemistry and Technology 2015; 37: 211–218.