

UČINKI SLOVENSKE TERMALNE VODE NA KOŽNE CELICE, GOJENE *IN VITRO*

THE INFLUENCE OF THERMAL WATER FROM SLOVENIA ON *IN VITRO* CULTURED SKIN CELLS

AVTORJI / AUTHORS:

asist. Lidija Gradišnik, mag. soc. gerontol., ing. živ. teh.^{1,2}

prof. dr. Danica Železnik, prof. zdr. vzg.^{2,3}

Boštjan Krajnc, mag. farm.¹

prof. dr. Uroš Maver, mag. farm.¹

Andrej Eržen, univ. dipl. prav.⁴

Asist. Marko Milojević, mag. lab. biomed.¹

prof. dr. Tomaž Velnar, dr. med.⁵

¹ Medicinska fakulteta Maribor, Taborska 8, 2000 Maribor

² AMEU Maribor, Slovenska 17, 2000 Maribor

³ Visoka šola za zdravstvene vede Slovenj Gradec,
Glavni trg 1, 2380 Slovenj Gradec

⁴ IARMR Terme Dobrna, Dobrna 50, 3204 Dobrna

⁵ Univerzitetni klinični center Ljubljana,
Klinika za nevrokirurgijo, Zaloška 7, 1000 Ljubljana

NASLOV ZA DOPISOVANJE / CORRESPONDENCE:

E-mail: tvelnar@hotmail.com

POVZETEK

Termalna voda ima zdravilne učinke na različne kožne bolezni, kot so protibolečinski, protivnetni in regenerativni učinki. V raziskavi smo testirali učinke slovenske termalne vode iz Term Dobrna na gojenih kožnih celicah *in vitro*, in sicer neobdelano termalno vodo, z UV-svetlobo sterilizirano termalno vodo, filtrirano termalno vodo ter ultračisto vodo in vodovodno vodo kot kontroli. Živost oz. viabilnost celic v celičnih kulturah smo določali s kolorimetričnim testom MTT. Termalna voda je rast keratinocitov statistično značilno najbolj spodbudila pri redčitvah 1 : 8 in 1 : 16. Rast fibroblastov je spodbudila pri vseh redčitvah (1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16), vendar učinki niso dosegli meje statistično značilnih vrednosti. Pri obeh celičnih kulturah in pri vseh redčitvah je bil vpliv termalne vode na rast celic *in vitro* podoben vplivu termalne vode, predhodno sterilizirane z UV-svetlobo. Ugotovili smo, da ima termalna voda iz Dobrne koristne učinke na rast in regeneracijo človeških kožnih celic *in vitro*, zato menimo, da je priporočljiva za preventivno in terapevtsko uporabo pri določenih kožnih boleznih.

KLJUČNE BESEDE:

celične kulture, fibroblasti, keratinociti, koža, termalna voda

ABSTRACT

Thermal water exerts healing effects on various skin diseases such as antinociceptive, anti-inflammatory and regenerative effects. The effects of thermal water from Dobrna springs, Slovenia, were tested in *in vitro* skin cell models, including untreated thermal water, UV-sterilised thermal water, filtered thermal water, and ultrapure water and tap water as controls. Cell viability in cell cultures was determined using the MTT test. Thermal water stimulated the growth of keratinocytes statistically significantly, at 1:8 and 1:16 dilutions. At all dilutions (1:2, 1:4, 1:8 and 1:16), it stimulated the growth of fibroblasts, however, values were not statistically significant. In both cell cultures and at all dilutions, the effects of thermal water and UV-sterilised thermal water on the cell growth were similar. To conclude, thermal water from Dobrna has a beneficial effect on the growth and regeneration of skin cells



in vitro. It can therefore be recommended for preventive and therapeutic use for various skin diseases.

KEY WORDS:

cell culture, fibroblasts, keratinocytes, skin, thermal water

1 UVOD

S staranjem se spreminjajo vsi organski sistemi v telesu, tudi koža, vendar zelo različno (1). Človeški organizem ima različne obrambne in reparativne mehanizme, s katerimi ščiti in obnavlja kožo. Epitelijske kožne celice oz. keratinociti se hitro delijo, rastejo in odpadajo s poroženelih povrhnjih plasti, s čimer se koža obnavlja. Obstajajo pa tudi različni načini, s katerimi lahko vplivamo na zdravje kože od zunaj in jih uporabljamo v preventivne in kurativne namene. Znano je, da ima termalna voda blagodejne učinke na kožo pri različnih kožnih boleznih, kot so alergije, luskavica in dermatitis (2, 3).

Zgodovinsko gledano ima voda v medicini zelo pomembno vlogo. Tudi danes je glavna komponenta različnih vrst zdravljenj, ki jih imenujemo spa terapije. Ime izhaja iz latinskega jezika in pomeni zdravje skozi vodo (*sanus per aquam*). Pri spa terapijah uporabljamo vodo enteralno kot vehikel za trdne komponente z zdravilnim učinkom ali pa dermalno v obliki kopeli v vodi z zdravilnimi učinki, kar imenujemo balneoterapija (3, 4). To je starodavna metoda, namenjena preventivi, zdravljenju in rehabilitaciji, saj ima dokazane blagodejne učinke na človeško telo (2, 5). Tako naj bi tovrstna voda po stiku z obolelo kožo omogočila njeno regeneracijo in izboljšano zaščitno funkcijo ter delovala protibolečinsko in protivnetno (3, 4).

2 PREGLED DOSEDANJIH RAZISKAV

Kljub široki terapevtski uporabi termalnih vod je na voljo le malo raziskav, ki bi proučevale njihove pozitivne učinke in mehanizme delovanja na celičnih modelih *in vitro* (2, 4). Objavljena so poročila, ki potrjujejo ugodne učinke mineralne sladke in morske vode, pa tudi različnih vrst blata,

pogosto v kombinaciji z morskim zrakom oz. morsko klimo in soncem, na kožo bolnikov z luskavico, atopijskim dermatitisom in revmatoidnim artritisom s prizadetostjo kože ter različnimi vrstami alergij (3–5).

Pri vnetnih kožnih boleznih, ki kožo okvarijo na mikroskopski in makroskopski ravni, so patogenetski procesi, ki se izražajo v kožnih plasteh in vplivajo tako na celice kot na druge organske sisteme, posledica imunskih interakcij, v katerih sodelujejo keratinociti, celice vezivnega tkiva (fibroblasti), celice prirojene in pridobljene imunosti ter številni topni mediatorji (3, 6). Za blaženje in zdravljenje tovrstnih bolezni pogosto uporabljamo balneoterapijo oz. kopanje v termalni izvirski ali morski vodi, kar kombiniramo z ustreznimi zdravili in drugimi vrstami naravnih snovi (7).

Mehanizem delovanja mineralne in morske vode na kožne celice je podoben, a specifičen, glede na sestavo topljenec, hitrost učinkovanja, indikacije za zdravljenje in terapevtske učinke. Pri tovrstnem zdravljenju prevladujejo lokalni učinki številnih ionov, npr. natrijevih in kloridnih (4). Voda in ioni, ki pridejo v stik z vrhnjimi plastmi kože, prodirajo skozi in nato v kožnih celicah spremenijo osmotski tlak, preko celičnih membranskih ionskih kanalčkov pa stimulirajo živčne receptorje. Zdravilno delovanje mineralnih vod je torej posledica mehanizma, ki ga pogojujeta koncentracija in vrsta soli, ki jih vsebujejo. V kožnih celicah se s pomočjo celične osmoze sproži bodisi aktivacija ali zaviranje celičnih apoptoznih ali nekroznih procesov. Osmotski mehanizem nato vpliva tudi na mehansko občutljive celične transmembranske kanalčke oz. proteine, ki so vključeni v proces signalizacije. V osnovi gre torej predvsem za učinke adsorpcije/absorpcije in penetracije v mineralnih vodah raztopljenih ionov skozi kožo (8).

Proliferacija in migracija keratinocitov in fibroblastov sta bistveni za popravilo in obnovo kožne bariere po različnih poškodbah kože (8, 9). Termalne vode, ki vsebujejo številne različne soli in elemente v sledovih, kot sta npr. bor in mangan (v nekaterih termalnih izvirih sta prisotna v visokih koncentracijah), lahko pripomorejo k boljšemu in hitrejšemu celjenju ran (9). Z uporabo celičnih modelov *in vitro* so ugotovili, da imata omenjena mikroelementa pozitivne učinke na kulturo človeških keratinocitov (8). Opazili so namreč, da je že po 24-urni inkubaciji kulture keratinocitov v mediju z dodatkom termalne vode, ki je vsebovala borove soli v koncentracijah od 0,5 µg/ml do 10 µg/ml in manganeve soli v koncentracijah od 0,1 µg/ml do 1,5 µg/ml, prišlo do pospešenega zapiranja oz. preraščanja mehansko povzročene vrzeli (rane) v primerjavi s kontrolno kulturo, kjer je bil prisoten le gojitveni medij. Pri tem pa zaprtje vrzeli oz. rane ni bilo posledica pospešene celične proliferacije.

racije. Opažene učinke hitrejšega preraščanja namerno povzročene vrzeli v kulturi keratinocitov so zato pripisali delovanju bora in mangana, ki ugodno vplivata na celjenje ran tako, da pospešita migracijo kožnih epitelijskih celic, ki rano zato hitreje epitelizirajo in zaprejo (8, 9). Proučevali so tudi vplive drugih ionov, kot so kalcijevi, cinkovi in manganovi (10, 11). Ti spodbujajo proliferacijo in diferenciacijo keratinocitov ter modulirajo izražanje njihovih integrinskih receptorjev. To so transmembranski proteini, ki so povezani s celičnim citoskeletom. Vključeni so v procese celičnega signaliziranja in omogočajo pritrdjevanje celic ter njihovo povezovanje z zunajceličnim ogrodjem. Prisotnost integrinov omogoča hiter, spremenljiv in prilagodljiv odziv celice na površinske dražljaje, kar je ključno za celično migracijo in adhezijo v procesih obnove kože in celjenja ran (11–13). O ugodnem delovanju mineralne termalne izvirske vode na človeške keratinocyte, gojene *in vitro*, so poročali tudi Tacheau in sod. (14). Pokazali so, da se je povečalo izražanje genov, povezanih s homeostazo kože. Pomembne spremembe so tako opazili na nivoju uravnavanja epidermalne kohezije in medcelične komunikacije, v bolj uravnoteženi celični proliferaciji, v učinkovitejših mehanizmih popravljanja napak dednega zapisa ter v večjem obsegu izražanja antioksidantov in posledični odpornosti na oksidativni stres (14, 15). Na celičnem in subceličnem nivoju mineralne vode spodbujajo izražanje genov, ki so vključeni v zaščito celic, delovanje celičnega cikla, dolgoživost in uravnavanje hidracije človeških keratinocitov (16). Rezultati raziskav kažejo tudi na to, da lahko termalno vodo uporabljamo kot pomembno sestavino za zmanjševanje ali zaviranje nekaterih škodljivih učinkov, ki povzročajo staranje kože (14, 17–19). Mineralne vode poleg pospeševanja proliferacije in diferenciacije keratinocitov ugodno učinkujejo tudi na fibroblaste, pri čemer različno delujejo na različno zrele celice (20). Ugotovili so, da je dodatek mineralne vode v celično kulturo izzval predvsem množenje mladih, nekoliko manj pa povečal proliferacijo starih fibroblastov (20, 21). Povečanje celične proliferacije so pripisali prisotnosti kalcija in magnezija v testiranih vzorcih vode, saj spodbujata proliferativno aktivnost celic preko aktivacije transmembranskih receptorjev, prenosa znotrajceličnih in medceličnih signalov ter povečanja učinkov topnih rastnih dejavnikov. Za obnovo kože, predvsem po poškodbah, so pomembni predvsem mladi fibroblasti, ki se lahko razrastejo v dermisu (20–22). Mineralne in termalne vode ne učinkujejo ugodno le na kožne, ampak tudi na druge vrste celic, še posebej na vnetne, endotelijske in celo celice respiratornega trakta (7, 16). Termalne vode lahko tako uporabljamo za spodbujanje oz. vzdrževanje zdravja, preprečevanje in zdravljenje ne-

katerih vnetnih in degenerativnih bolezni kože in sklepov, pri metabolnih boleznih, boleznih ožilja, dihal ter pri rehabilitaciji (23–25). Vse pogostejše jih vgrajujejo tudi v kozmetične izdelke (2, 24).

Namen naše raziskave je bil proučiti delovanje termalne vode iz Term Dobrna na kulture kožnih celic *in vitro*, saj njenih učinkov na človeške keratinocyte in kožne fibroblaste do sedaj še niso raziskali. Predpostavili smo, da ima ta termalna voda ugoden učinek na rast obeh vrst celic v celičnih kulturah.

3 MATERIALI IN METODE

Raziskavo smo izvedli v skladu z uveljavljenimi etičnimi načeli, ki veljajo pri delu s celičnimi kulturami. Eksperimentalni del raziskave je potekal na Medicinski fakulteti v Mariboru, v laboratoriju za delo s celičnimi kulturami Inštituta za biomedicinske vede.

3.1 GOJENJE KERATINOCITOV IN FIBROBLASTOV

Celice celičnih linij človeških keratinocitov HaCaT (keratinociti) in kožnih fibroblastov Detroit 551 (ATCC CCL-110), smo kupili pri organizaciji ATCC (American Type Culture Collection, ZDA). Celične kulture smo vzpostavili in jih vzdrževali po priporočilih ATCC. Keratinocyte HaCaT smo gojili v mediju Advanced DMEM/F12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA) s 5 % FBS (serum govejega zarodka; Thermo Fisher Scientific, ZDA), 100 E/ml penicilina (Merck, Nemčija), 0,1 mg/mL streptomicina (Merck, Nemčija) in 2 mM L-glutamina (Merck, Nemčija), fibroblaste pa v mediju Advanced DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, ZDA) s 5 % FBS (Thermo Fisher Scientific, ZDA), 100 E/ml penicilina (Merck, Nemčija), 0,1 mg/mL streptomicina (Merck, Nemčija) in 2 mM L-glutamina (Merck, Nemčija).

3.2 TESTNI IN KONTROLNI VZORCI VOD

Preiskovali smo termalno vodo iz izvira v Termah Dobrna, kjer smo jo odvzeli v sterilno 500-mililitrsko steklenico in jo takoj prenesli v celični laboratorij. Testirali smo naslednje vzorce: I) naravno termalno vodo, II) termalno vodo, ki smo jo predhodno 30 minut sterilizirali z UV-svetlobo, in III) termalno vodo, ki smo jo sterilizirali s filtracijo skozi filter z ve-



likostjo por 0,22 μm (MF-Millipore, Merck, Nemčija). Za kontrolna vzorca smo uporabili z aparatom MilliQ (Millipore, Merck, Nemčija) prečiščeno vodo (ultračisto vodo) in vodovodno vodo. Vse omenjene vzorce smo razredčili v razmerjih 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16 v ustreznem mediju, ki smo ga uporabili za gojenje posamezne vrste celic.

3.3 VZPOSTAVITEV CELIČNIH KULTUR IN UGOTAVLJANJE ŽIVOSTI GOJENIH CELIC

Keratinocyte in kožne fibroblaste smo naselili na mikrotitrsko ploščico P96 (Falcon, Merck, Nemčija), in sicer po 10.000 celic na vdolbinico. Po 24 urah inkubacije v inkubatorju pri 37 °C, 5 % CO_2 v zraku ter 95-odstotni vlagi smo v kvadruplikatih k obema vrstama celic dodali različne redčitve posameznega vzorca termalne in kontrolnih vod. Dodatno (pozitivno) kontrolo so predstavljali keratinociti in fibroblasti, ki smo jih gojili izključno v prisotnosti ustreznega medija. Živost kožnih celic v kulturah smo nato po dodatnih 24 urah inkubacije določali s kolorimetričnim testom MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid) (Sigma-Aldrich, Merck, Nemčija). Žive celice s pomočjo mitohondrijskega NADPH reducirajo tetrazolijevo sol v modro-vijolično obarvan formazan, katerega intenziteto, ki je sorazmerna količini metabolno aktivnih celic, izmerimo s spektrofotometrom pri valovni dolžini 570 nm. Meritve smo opravili s pomočjo spektrofotometra Varioskan Flash (Thermo Fisher Scientific, ZDA) in izračunali in podali rezultate živosti celic relativno na kontrolne celice, ki so bile gojene samo v ustreznem celičnem mediju.

Z invertnim optičnim mikroskopom Axiovert 40 (Zeiss, Nemčija) smo spremljali učinke dodatkov različnih vzorcev in koncentracij termalnih in kontrolnih vod na morfologijo celic v kulturah, posneli mikrofotografije z digitalno kamero AxioCam (Zeiss, Nemčija) ter rezultate kvalitativno ovrednotili in jih primerjali z izsledki meritev testa MTT.

3.4 STATISTIČNA ANALIZA

Vse numerične vrednosti so podane kot aritmetična srednja vrednost $\pm$ standardni odklon. Normalno porazdelitev podatkov smo preverili z uporabo testa Shapiro-Wilk, na podlagi testa Lavene pa smo ocenili enakost varianc med skupinami. Na podlagi tega smo opravili enosmerno analizo variance (ANOVA), ki ji je sledil post-hoc test Bonferroni. P-vrednosti, manjše kot 0,05 ($p < 0,05$), smo obravnavali kot statistično značilne. Statistično analizo podatkov smo opravi-

vili s programsko opremo SPSS Statistics 25 (IBM Corp. Armonk, NY, USA). Za izris grafov smo uporabili programsko opremo Excel (Microsoft Corp. Redmon, WA, USA).

4 REZULTATI

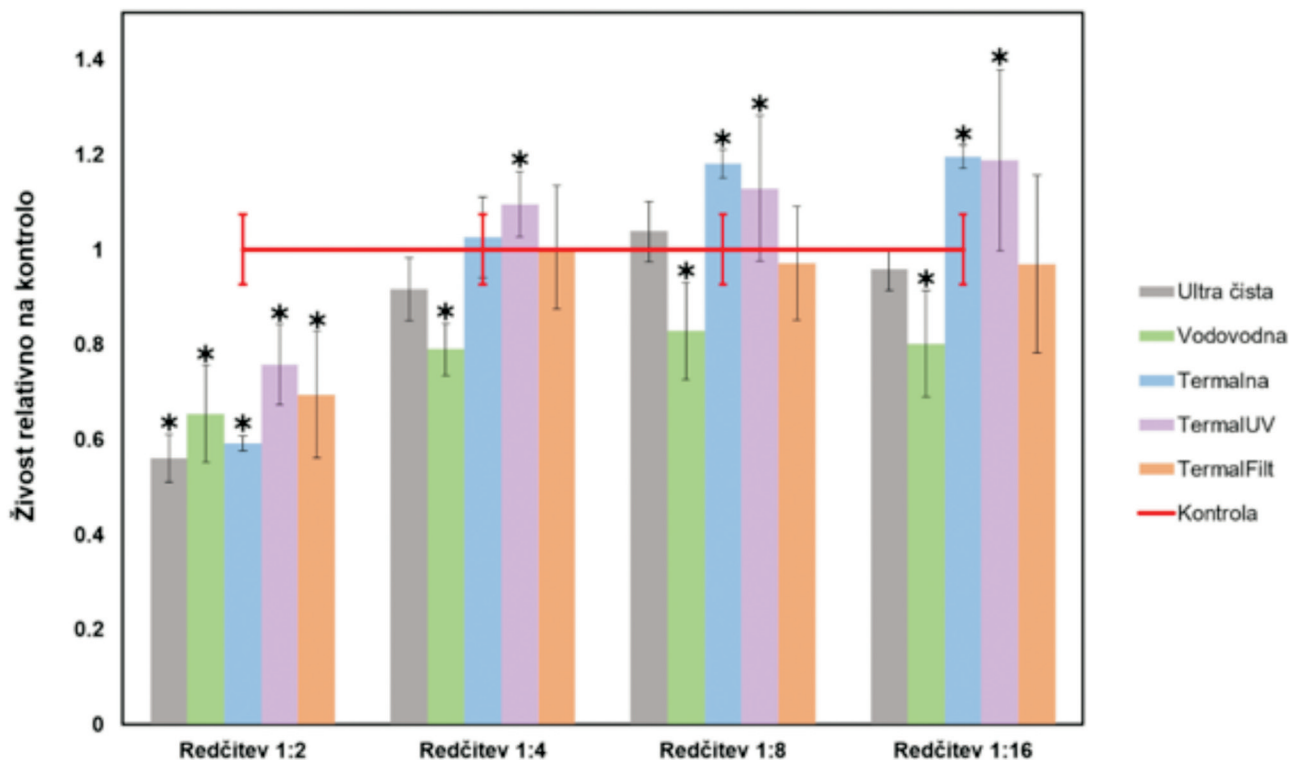
4.1 VPLIV TERMALNE VODE NA ŽIVOST GOJENIH KERATINOCITOV

Rast keratinocitov je naravna termalna voda v mediju Advanced DMEM/F12 statistično značilno najbolj spodbudila pri redčitvi 1 : 16, nekoliko manj (vendar še vedno statistično značilno bolj kot v primerjavi s kontrolnimi celicami) pa pri redčitvah 1 : 8 in 1 : 4. Od treh testiranih vzorcev termalnih vod (naravna, sterilizirana z UV-svetlobo in sterilizirana s filtracijo) sta imeli na rast keratinocitov intaktna naravna termalna voda in voda, sterilizirana z UV-svetlobo, pri redčitvah 1 : 16 in 1 : 8 statistično značilno najboljši učinek med vsemi testiranimi vzorci. To kaže tudi na dejstvo, da sterilizacija z UV-svetlobo ne vpliva na pozitivne učinke termalnih vod. Rezultati nakazujejo, da je filtracija manj primerna metoda za sterilizacijo termalnih vod, saj pri redčitvah 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16 filtrirana termalna voda ni izkazovala statistično značilno boljšega vpliva na rast keratinocitov v primerjavi s kontrolo. Vodovodna voda je ne glede na redčitev statistično značilno negativno vplivala na živost keratinocitov, medtem ko ultračista voda ni imela značilnega vpliva na živost celic pri redčitvah 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16. Vse vode so značilno znižale rast celic pri redčitvi 1 : 2, kar je najverjetneje posledica prevelike redčitve rastnega medija. Analiza vpliva termalnih vod na živost keratinocitov je prikazana na sliki 1.

4.2 VPLIV TERMALNE VODE NA ŽIVOST GOJENIH KOŽNIH FIBROBLASTOV

Čeprav rezultati niso dosegli statistično značilne vrednosti, zaznan pozitiven trend nakazuje, da naravna termalna voda in termalna voda, sterilizirana z UV-svetlobo, spodbujata rast fibroblastov. Rezultati, pridobljeni na kožnih fibroblastih, se skladajo z rezultati, pridobljenimi na keratinocitih. Za manj primerno metodo sterilizacije se je ponovno izkazala filtracija termalne vode. Tudi vodovodna voda je negativno vplivala na rast kožnih fibroblastov ne glede na redčitev. Vse vode, razen naravne in z UV-svetlobo sterilizirane ter-

Citotoksičnost termalne vode na keratinocitih



Slika 1: Rezultati testa MTT v keratinocitnih kulturah. Prikazane so povprečne vrednosti štirih meritev za vsak vzorec in kontrolo, s pripadajočimi standardnimi odkloni. Živost keratinocitov je podana relativno na kontrolne celice keratinocitov (rdeča črta s pripadajočimi standardnimi odkloni), ki so bile gojene samo v rastnem mediju Advanced DMEM/F12. Zvezdica označuje vzorce, kjer je bila celična živost bodisi statistično značilno ($p < 0.05$) višja oziroma nižja v primerjavi s kontrolnimi celicami.

Figure 1: MTT test results in keratinocyte cell cultures. The mean values of the four measurements for each sample and the control are shown with the corresponding standard deviations. Keratinocyte viability was given relative to the keratinocyte control cells (the red line with the corresponding standard deviations) grown only in the Advanced DMEM/F12 medium. Asterisk indicates samples in which cell viability was either significantly ($p < 0.05$) higher or lower than that of the control cells.

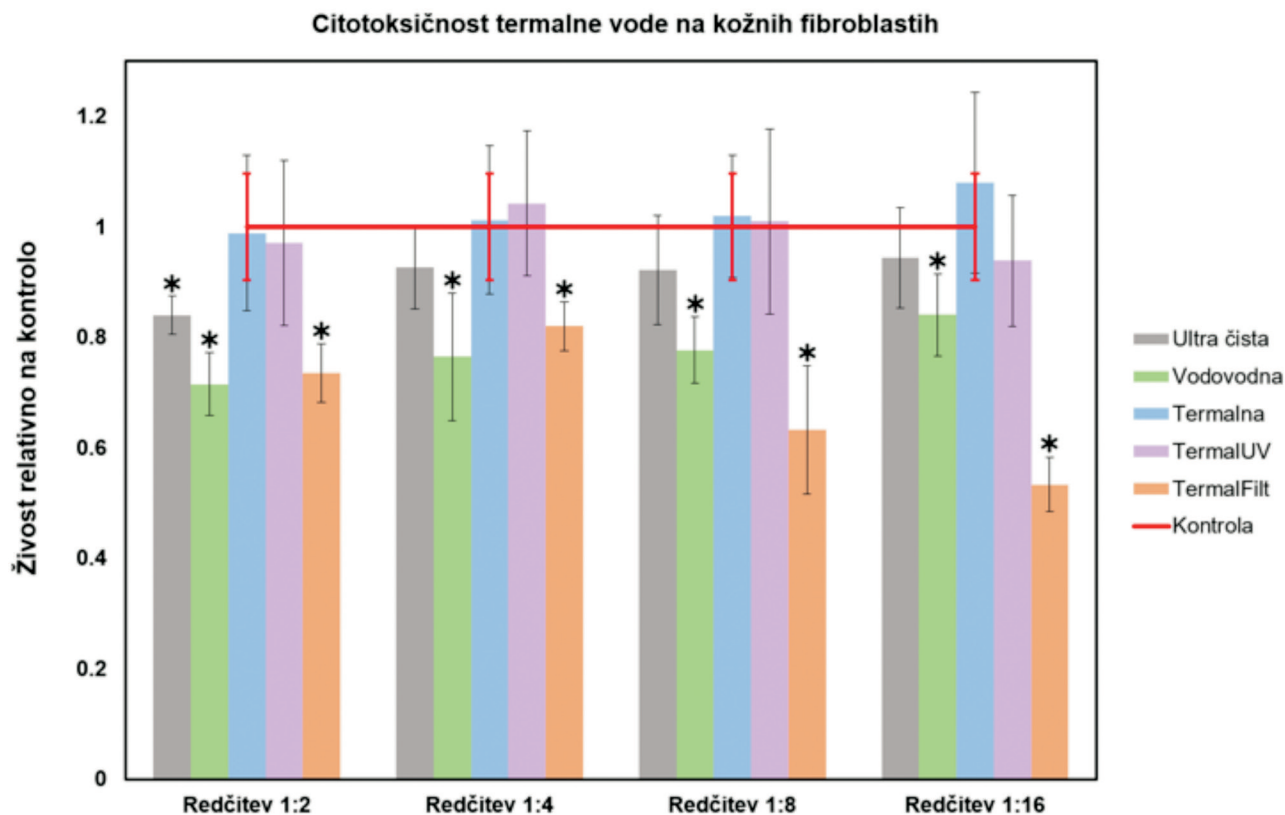
malne vode, so zavrle rast kožnih fibroblastov pri redčitvi 1 : 2, vendar je bil učinek manjši kot pri keratinocitih. Prav tako so na kožnih fibroblastih manj izraziti pozitivni učinki termalnih vod, kar kaže na dejstvo, da je ta celična kultura manj občutljiva na dodatek termalnih vod celičnemu mediju. Analiza vpliva termalnih vod na živost kožnih fibroblastov je prikazana na sliki 2.

4.3 MORFOLOŠKE ZNAČILNOSTI KERATINOCITOV IN KOŽNIH FIBROBLASTOV V CELIČNIH KULTURAH

Z invertnim optičnim mikroskopom smo pri 50-kratni povečavi opazovali in posneli keratinocyte in kožne fibroblaste

po 24-urni inkubaciji s preiskovanimi vzorci vod, ki so bili dodani celičnim kulturam v redčitvi 1 : 16 v ustreznem mediju za gojenje posamezne vrste celic (sliki 3 in 4).

Na mikrofotografijah vidimo, da je bila kultura človeške keratinocitne linije HACAT v vdolbinici mikrotitrne plošče po dodatku neobdelane naravne termalne vode v redčitvi 1 : 16 (slika 3D) po 24 urah inkubacije povsem konfluentna (preraščena). Rast celic je bila torej boljše kot pri pozitivni kontroli, kjer so celice rasle samo v gojitvenem mediju (slika 3A). Tudi dodatek vzorcev termalne vode, predhodno sterilizirane z UV-svetlobo (slika 3E) in sterilizirane s filtracijo (slika 3F), v redčitvi 1 : 16 v gojitvenem mediju, je spodbujal rast keratinocitov v večji meri kot sam medij (pozitivna kontrola). Nasprotno pa je bila rast celic HaCaT po dodatku ultračiste vode (slika 3B) in vodovodne vode (slika 3C) v redčitvi 1 : 16 slabša kot v kontrolni kulturi (slika 3A).



Slika 2: Rezultati testa MTT v kulturah kožnih fibroblastov. Prikazane so povprečne vrednosti štirih meritev za vsak vzorec in kontrolo, s pripadajočimi standardnimi odkloni. Živost kožnih fibroblastov je podana relativno na kontrolne celice kožnih fibroblastov (rdeča črta s pripadajočimi standardnimi odkloni), ki so bile gojene samo v rastnem mediju Advanced DMEM. Zvezdica označuje vzorce, kjer je bila celična živost bodisi statistično značilno ($p < 0.05$) višja oziroma nižja v primerjavi s kontrolnimi celicami.

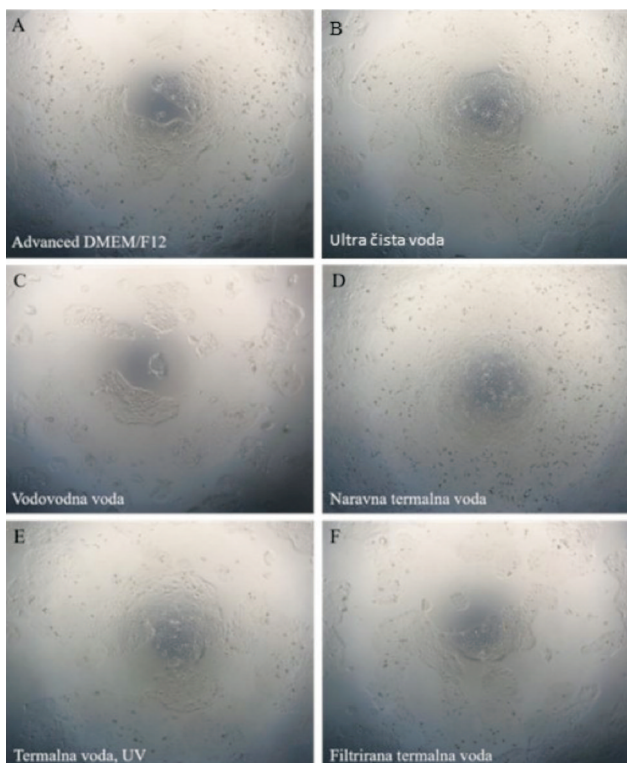
Figure 2: MTT test results in skin fibroblast cultures. The mean values of the four measurements for each sample and the control are shown with the corresponding standard deviations. The viability of skin fibroblasts is given relative to the skin fibroblast control cells (the red line with the corresponding standard deviations) grown only in the Advanced DMEM growth medium. Asterisk indicates samples where cell viability was either significantly ($p < 0.05$) higher or lower compared to the control cells.

Izsledki, ki smo jih razbrali iz mikrofotografij kultur kožnih fibroblastov celične linije Detroit 551, so sovpadali z rezultati meritev živosti celic. Po dodatku neobdelane naravne termalne vode v redčitvi 1 : 16 v gojitvenem mediju so celice v kulturi po 24 urah inkubacije dosegle 100-odstotno konfluenco (slika 4D), kar je bil boljši rezultat od tistega, ki smo ga opazili pri pozitivni kontroli, kjer smo fibroblaste gojili izključno v mediju (slika 4A). Dodatek ultračiste vode v redčitvi 1 : 16 (slika 4B) je izzval celično rast, ki je bila primerljiva s pozitivno kontrolo (slika 4B). Nekoliko slabšo rast fibroblastov kot v pozitivni kontroli smo opazili po dodatku termalne vode v redčitvi 1 : 16, ki smo jo predhodno sterilizirali z UV-svetlobo (slika 4E). Dodatka vodovodne vode (slika 4C) in filtrirane termalne vode (slika 4F) v redčitvi 1 : 16 v gojitvenem mediju sta celično rast v primerjavi s pozitivno kontrolo (slika 4A) zmanjšala.

4.4 POVZETEK EKSPERIMENTALNIH REZULTATOV

Z merjenjem živosti gojenih keratinocitov in kožnih fibroblastov s testom MTT smo pokazali, da ima termalna voda iz Term Dobrna statistično značilno pozitiven učinek na rast keratinocitov in kožnih fibroblastov *in vitro*. Ugotovili smo, da sta imeli intaktna naravna termalna voda in voda, sterilizirana z UV-svetlobo, statistično značilno največji pozitiven učinek na rast obeh vrst kožnih celic glede na ustrezno kontrolo, pri čemer je bil učinek odvisen od koncentracije vode v gojitvenem mediju in od vrste celic.

Rast keratinocitov v kulturi je intaktna termalna voda, ki smo jo dodali gojitvenemu mediju, statistično značilno najbolj spodbudila pri redčitvah 1 : 8 in 1 : 16, nekoliko manj, vendar še vedno statistično značilno, pa pri redčitvi 1 : 4 v

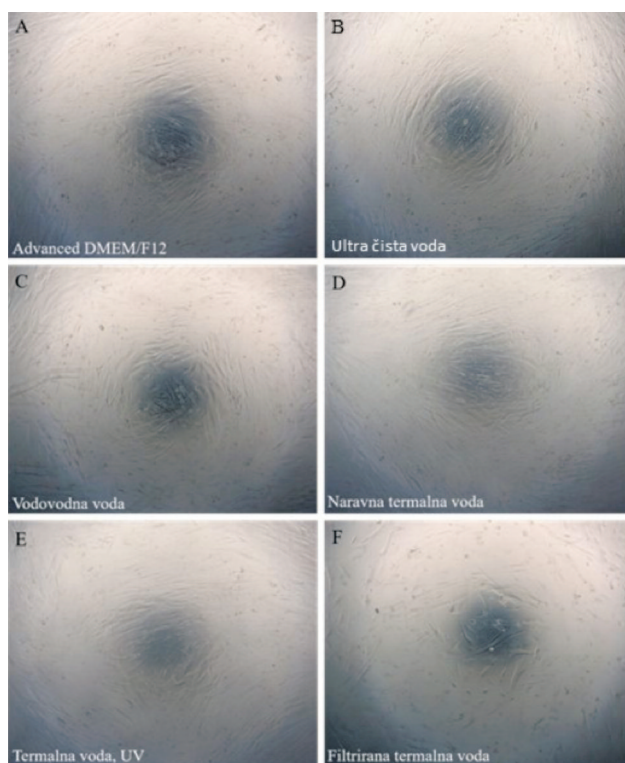


Slika 3: Digitalne mikrofotografije kultur kožnih keratinocitov HaCaT po 24-urni inkubaciji z različnimi vzorci vod, dodanih k mediju v redčitvi 1 : 16; invertni optični mikroskop Axiovert 40 Zeiss, opremljen z digitalno kamero Axiocam Zeiss. Vse slike so bile posnete pri 50-kratni povečavi.

Figure 3: Micrographs of the HaCaT skin keratinocyte cultures after 24 hours of incubation with various water samples added to the medium at a dilution of 1:16; Axiovert 40 Zeiss invert optical microscope equipped with the Axiocam Zeiss digital camera. All images were taken at a 50x magnification.

primerjavi s kontrolnimi celicami, gojenimi samo v ustreznem rastnem mediju. V kulturah kožnih fibroblastov je imela največji spodbujevalni učinek na celično rast, glede na kontrolne fibroblaste, redčitev naravne termalne vode v gojitvenem mediju v razmerju 1 : 16, vendar rezultat ni dosegel statistično značilne vrednosti. Tudi pri ostalih redčitvah (1 : 2, 1 : 4 in 1 : 8) je zaznaven trend pozitivnega vpliva intaktno termalne vode na rast fibroblastov, vendar rezultati niso presegli meje statistične značilnosti v primerjavi s kontrolnimi celicami, gojenimi v ustreznem mediju brez dodatka vod.

Vzorec termalne vode, ki smo ga predhodno sterilizirali z UV-svetlobo, je izkazoval statistično značilne pozitivne učinke na rast keratinocitov, medtem ko trend pozitivnega učinka na živost kožnih fibroblastov ni dosegel meje stati-



Slika 4: Digitalne mikrofotografije kultur kožnih fibroblastov po 24-urni inkubaciji z različnimi vzorci vod, dodanih k mediju v redčitvi 1 : 16; invertni optični mikroskop Axiovert 40 Zeiss, opremljen z digitalno kamero Axiocam Zeiss. Vse slike so bile posnete pri 50-kratni povečavi.

Figure 4: The micrographs of the skin fibroblast cultures after 24-hours of incubation with various water samples added to the medium at a dilution of 1:16; Axiovert 40 Zeiss invert optical microscope equipped with the Axiocam Zeiss digital camera. All images were taken at a 50x magnification.

stične značilnosti. Med vzorcema naravne termalne vode in vode, obdelane z UV-svetlobo, glede na redčitev in vrsto celic ni bilo značilnih razlik. Oba vzorca sta na živost celic najboljše vplivala pri večjih redčitvah (1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16). Za manj primerne se je izkazal vzorec termalne vode, ki je bil filtriran skozi filter z velikostjo por 0,22 µm, saj je značilno negativno vplival na rast kožnih fibroblastov pri vseh redčitvah. Statistična primerjava obeh obdelanih vzorcev vode je pokazala, da je bila rast keratinocitov in kožnih fibroblastov značilno boljša po dodatku termalne vode, obsevane z UV-svetlobo. Vodovodna voda je značilno negativno vplivala na živost obeh celičnih kultur ne glede na redčitev. Ultračista voda ni izkazovala značilnega vpliva na rast keratinocitov in fibroblastov v primerjavi s kontrolnimi celicami, razen pri redčitvi 1 : 2. Rast obeh vrst celic je bila

tako v prisotnosti ultračiste vode in vodovodne vode slabša v primerjavi z dodatkom naravne in z UV-svetlobo sterilizirane termalne vode. Značilnih razlik med filtrirano termalno vodo in ultračisto vodo pri keratinocitih ni bilo, medtem ko je imela filtrirana termalna voda značilno slabši vpliv na rast kožnih fibroblastov kot ultračista voda.

5 RAZPRAVA

Zaradi številnih blagodejnih učinkov na organizem je voda že od nekdaj neločljivo povezana s človekovim življenjem (3). S številnimi raziskavami so potrdili koristne učinke različnih mineralnih in termalnih vod na izboljšanje delovanja posameznih organskih sistemov pri ljudeh (16, 26). Med objavljenimi rezultati raziskav pa je takih, ki bi vsebovali podatke o neposrednem delovanju termalnih in mineralnih vod na celične modele *in vitro*, razmeroma malo, in to kljub dejstvu, da so zdraviliške vode zelo pomembne za zdravljenje različnih kožnih bolezni (2, 4). Predpostavili smo, da ima termalna voda iz Term Dobrna ugoden učinek na rast celic človeških celičnih linij HaCaT (keratinociti) in Detroit 551 (dermalni fibroblasti), gojenih *in vitro*, s čimer bi potrdili njene ugodne vplive na regeneracijo kože in podprli priporočila za njeno uporabo pri podpornem zdravljenju kožnih bolezni (14–16). Poleg tega pa je izraba koristnih učinkov posameznih zdraviliških mineralnih in termalnih vod eden od načinov, s katerimi lahko ugodno vplivamo na zaviranje starostnih sprememb v koži, ki so poleg samega procesa staranja organizma tudi posledica številnih škodljivih vlivov okolja in sprememb oz. okvar genetskega materiala v kožnih celicah (27–29).

5.1 IZBIRA TERMALNE VODE ZA TESTIRANJE

Termalnih izvirov je na geografskem območju Slovenije veliko, vode iz njih pa se med seboj razlikujejo glede na svoje značilnosti (30). Te so odvisne od zemeljskih plasti, kjer se voda nahaja, njihove globine in sestave. Pomembni dejavniki, ki vplivajo na lastnosti tovrstnih vod, so temperatura in vrste raztopljenih snovi, ki opredeljujejo njihove fizikalne in kemijske značilnosti (16, 31). Termalno vodo iz Term Dobrna smo izbrali iz več razlogov, med katerimi je najpomembnejši ta, da ima specifično sestavo. Je alkalna in vsebuje primerne količine kalcija, magnezija in hidrogenkarbo-

nata. Deluje protivnetno ter proti alergijam (30, 31). Glede na to, da jo uporabljamo v balneoterapiji, se nam je zdelo smiselno proučiti njeno delovanje na epidermalne in dermalne kožne celice. Poleg tega so Terme Dobrna najstarejše zdravilišče na Slovenskem, kjer do sedaj še ni bilo opravljenih nobenih raziskav termalne vode v pogojih *in vitro* na način, kot smo ga načrtovali (30). V prihodnostibi bilo smiselno raziskati tudi ostale termalne vode v naši državi in rezultate primerjati med seboj.

5.2 UPORABA FUNKCIONALNIH KULTUR ČLOVEŠKIH KERATINOCITOV IN KOŽNIH FIBROBLASTOV ZA PROUČEVANJE UČINKOV TERMALNE VODE *IN VITRO*

Celične kulture smo izbrali skladno z naravo načrtovanih eksperimentov in fiziološkim pomenom uporabljenih kožnih celic. Za testiranje smo pripravili štiri zaporedne dvakratne razredčitve vzorcev izbranih vod, ki smo jih nato dodajali ustreznemu gojitvenemu mediju, ki je nujno potreben za normalno rast celic v kulturi. Redčitve vzorcev testiranih vod smo pripravili tako, da smo jih dodajali ustreznemu mediju za gojenje celic v naslednjih razmerjih: 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8 in 1 : 16. Opažena slabša rast obeh vrst kožnih celic pri visokih začetnih koncentracijah testiranih vzorcev vod je bila najverjetneje posledica pomanjkanja potrebnih hranilnih substanc zaradi manjšega deleža gojitvenega medija v kulturah ter vplivov neustrezne osmolarnosti.

Z določanjem živosti celic, gojenih v prisotnosti in odsotnosti različnih koncentracij testiranih vzorcev vod, smo potrdili naše raziskovalne hipoteze, kjer smo predpostavili, da ima termalna voda ugoden učinek na rast obeh izbranih vrst kožnih celic. Termalna voda iz Term Dobrna je značilno pospešila rast keratinocitov in pozitivno vplivala na viabilnost kožnih fibroblastov v kulturah, pri čemer je bil ta učinek koncentracijsko odvisen. Tudi izsledki drugih raziskav potrjujejo, da termalne vode različno učinkujejo na različne vrste celic, kar je najverjetneje posledica občutljivosti posameznih celičnih vrst in njihovih osnovnih fizioloških značilnosti (14, 16, 32). Keratinociti in fibroblasti potrebujejo za rast v kulturah *in vitro* poleg hranil tudi določene mikroelemente, katerih koncentracija se ob dodatku termalnih vod v gojitveni medij zviša (9, 10, 11). Mehanizmi pozitivnih učinkov termalnih vod na celice so kompleksni in potekajo preko spreminjanja transmembranske propustnosti, uravnavanja delovanja celičnih kanalčkov in signalnih molekul ter vplivov na celični cikel z izražanjem genov, ki so vključeni v zaščito in dolgoživost celic (8, 12, 16).

Zanimiva je bila tudi ugotovitev, da je od vseh testiranih vzorcev vod na gojene kožne celice najbolj delovala nara-vna, neobdelana termalna voda. Statistično značilno pri-merljiv učinek izkazuje tudi voda, predhodno sterilizirana z UV-svetlobo, medtem ko voda, filtrirana skozi 0,22 µm mi-krobiološki filter, na celično rast ni imela dobrega učinka. Uporaba termalne vode, obsevane z UV-svetlobo, je za rast keratinocitov in fibroblastov značilno boljša kot dodatek filtrirane termalne vode, pri čemer je bila ta razlika največja pri največji redčitvi 1 : 16. Tudi vzorca vodovodne in ultrači-ste vode, v primerjavi z neobdelano in obdelano (sterilizirano z UV-svetlobo) termalno vodo, nista pokazala tako ugod-nega učinka na rast celic. Sestavo vode lahko namreč spre-menimo z različnimi kemijskimi in fizikalnimi postopki (2). Na ta način vplivamo tudi na vsebnost snovi, kot so različni ioni, ki jih celice potrebujejo za normalne fiziološke procese, to pa se negativno odraža tudi v celičnih kulturah *in vitro* (9, 20). Podobno je tudi v pogojih *in vivo*, kjer se koža ob po-vršinski uporabi neobdelane termalne vode hitreje obnavlja, tudi celjenje ran je boljše, poleg tega pa se opazno upo-časni procesi staranja v povezavi z genskimi okvarami in različnimi bolezenskimi spremembami (7, 33). Makroskop-sko je to vidno kot zmanjševanje ali zaviranje določenih zu-nanjih škodljivih učinkov na kožo, hitrejše celjenje ran in ugodni kozmetični učinki (12, 13, 20, 22). Glede na rezultate naših eksperimentov lahko zaključimo podobno: delovanje termalne vode iz Term Dobrna na keratinocite in kožne fi-broblaste, gojene *in vitro*, je bilo pozitivno, saj je ta pospešila njihovo rast pri vseh testiranih redčitvah, še posebej pa pri največji (1 : 16). Vpliv termalne vode je na živost in rast ke-ratinocitov statistično značilno pozitiven, medtem ko opa-žen pozitiven trend ni dosegel statistično značilne vrednosti pri kožnih fibroblastih. Z izsledki naše raziskave se tako pri-družujemo ugotovitvam do sedaj sicer redkih raziskav, ki so v celičnih kulturah *in vivo* podobno potrdili ugodne učinke različnih termalnih vod (23, 24).

Uporaba celičnih kultur v laboratorijskih pogojih je eden iz-med najuporabnejših, najzanesljivejših in ekonomičnih na-činov testiranja različnih snovi *in vitro* (34, 35). Celične kulture, ki smo jih vzpostavili, so dobro uspevale, poleg tega pa smo z njihovo uporabo nadzorovali eksperimen-talne pogoje. Pri nadaljnjih raziskavah *in vitro* na področju uporabnosti termalnih vod bi lahko uporabili tudi druge vrste celic ali tkiv, različne vrste celičnih modelov, drugačne eksperimentalne pogoje in dodajanje znanih rastnih dejav-nikov. Poleg tega pa bi lahko v prihodnje na gojenih celicah primerjalno preizkusili učinke delovanja različnih termalnih in mineralnih vod, morske vode in tudi vodnih ekstraktov zdravilnega blata.

6 SKLEP

V raziskavi smo potrdili, da je delovanje termalne vode iz Term Dobrna na keratinocite in kožne fibroblaste v pogojih *in vitro* ugodno, saj pospešuje rast obeh vrst celic. Na os-novi teh ugotovitev sklepamo, da ima pozitiven učinek na rast in regeneracijo poglavitnih tipov kožnih celic, zato me-nimo, da je njena uporaba priporočljiva tudi za preventivno in terapevtsko uporabo pri kožnih boleznih.

7 LITERATURA

1. Hubbard RE, Lang IA, Llewellyn DJ, Rockwood K. Frailty, body mass index, and abdominal obesity in older people. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2010 Apr;65(4):377-81.
2. Morer C, Roques CF, Françon A, Forestier R, Maraver F. The role of mineral elements and other chemical compounds used in balneology: data from double-blind randomized clinical trials. *Int J Biometeorol*. 2017 Dec;61(12):2159-73.
3. Riyaz N, Arakkal FR. Spa therapy in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2011 Mar-Apr;77(2):128-34.
4. Zöller N, Valesky E, Hofmann M, Bereiter-Hahn J, Bernd A1, Kaufmann R, et al. Impact of Different Spa Waters on Inflammation Parameters in Human Keratinocyte HaCaT Cells. *Ann Dermatol*. 2015 Dec;27(6):709-14.
5. Burns E, Nair S. New horizons in care home medicine. *Age Ageing*. 2014 Jan;43(1):2-7.
6. Messinger-Rapport B. What's new in treating older adults? *Cleve Clin J Med*. 2010 Nov;77(11):770-90.
7. Lee HP, Choi YJ, Cho KA, Woo SY, Yun ST, Lee JT, et al. Effect of Spa Spring Water on Cytokine Expression in Human Keratinocyte HaCaT Cells and on Differentiation of CD4(+) T Cells. *Ann Dermatol*. 2012 Aug;24(3):324-36.
8. Carbajo JM, Maraver F. Salt water and skin interactions: new lines of evidence. *Int J Biometeorol*. 2018 Aug;62(8):1345-60.
9. Chebassier N, Oulija el H, Viegas I, Dreno B. Stimulatory effect of boron and manganese salts on keratinocyte migration. *Acta Derm Venereol*. 2004;84(3):191-4.
10. Tenaud I, Leroy S, Chebassier N, Dreno B. Zinc, copper and manganese enhanced keratinocyte migration through a functional modulation of keratinocyte integrins. *Exp Dermatol*. 2000 Dec;9(6):407-16.
11. Tenaud I, Saiaigh I, Dreno B. Addition of zinc and manganese to a biological dressing. *J Dermatolog Treat*. 2009;20(2):90-3.
12. Grinnell F. Wound repair, keratinocyte activation and integrin modulation. *J Cell Sci*. 1992 Jan;101 (Pt 1):1-5.
13. Tenaud I, Leroy S, Chebassier N, Dreno B. Modulation in vitro of keratinocyte integrins by interferon-alpha and interferon-gamma. *Int J Dermatol*. 2002 Dec;41(12):836-40.
14. Tacheau C, Weisgerber F, Fagot D, Bastien P, Verdier MP, Liboutet M, et al. Vichy Thermal Spring Water (VTSW), a cosmetic ingredient of potential interest in the frame of skin



- ageing exposome: an in vitro study. *Int J Cosmet Sci.* 2018 Aug;40(4):377-87.
15. Karagülle MZ, Karagülle M, Kılıç S, Sevinç H, Dündar C, Türkoğlu M. In vitro evaluation of natural thermal mineral waters in human keratinocyte cells: a preliminary study. *Int J Biometeorol.* 2018 Sep;62(9):1657-61.
16. Spilioti E, Vargiami M, Letsiou S, Gardikis K, Sygouni V, Koutsoukos P, et al. Biological properties of mud extracts derived from various spa resorts. *Environ Geochem Health.* 2017 Aug;39(4):821-33.
17. Birch-Machin MA, Bowman A. Oxidative stress and ageing. *Br J Dermatol.* 2016 Oct;175 Suppl 2:26-9.
18. Krutmann J, Bouloc A, Sore G, Bernard BA, Passeron T. The skin aging exposome. *J Dermatol Sci.* 2017 Mar;85(3):152-61.
19. Labarrade F, Bergeron L, Serre C, Lebleu A, Busuttill V, Botto JM, et al. Modulating the expression of survivin and other basal epidermal proteins protects human skin from UVB damage and oxidative stress. *J Cosmet Dermatol.* 2015 Sep;14(3):191-203.
20. Collober I, Noel-Hudson MS, Wepierre J, Montastier C. Activity of Vittel water on proliferation of human fibroblasts, proliferation and differentiation of human keratinocytes. *Int J Cosmet Sci.* 1994 Aug;16(4):149-60.
21. Bikle DD, Pillai S. Vitamin D, calcium, and epidermal differentiation. *Endocr Rev.* 1993 Feb;14(1):3-19.
22. Sasaki H, Itoh T, Akamatsu H, Okamoto H, Horio T. Effects of calcium concentration on the SOD activity and UVB-induced cytotoxicity in cultured human keratinocytes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2005 Feb;21(1):9-14.
23. Elkhyat A, Courderot-Masuyer C, Mac-Mary S, Courau S, Gharbi T, Humbert P. Assessment of spray application of Saint GERVAIS water effects on skin wettability by contact angle measurement comparison with bidistilled water. *Skin Res Technol.* 2004 Nov;10(4):283-6.
24. Ghersetich I, Brazzini B, Hercogova J, Lotti TM. Mineral waters: instead of cosmetics or better than cosmetics? *Clin Dermatol.* 2001 Jul-Aug;19(4):478-82.
25. Gin H, Demeaux JL, Grelaud A, Grolleau A, Droz-Perroteau C, Robinson P, et al. Observation of the long-term effects of lifestyle intervention during balneotherapy in metabolic syndrome. *Therapie.* 2013 May-Jun;68(3):163-7.
26. Maeda T, Kudo Y, Horiuchi T, Makino N. Clinical and anti-aging effect of mud-bathing therapy for patients with fibromyalgia. *Mol Cell Biochem.* 2018 Jul;444(1-2):87-92.
27. Hanson MA, Cooper C, Aihie Sayer A, Eendebak RJ, Clough GF, Beard JR. Developmental aspects of a life course approach to healthy ageing. *J Physiol.* 2016 Apr 15;594(8):2147-60.
28. McLeod RP, Horowitz P, Fowler JF Jr, Eichenfield LF, Elias PM. The basics of skin care: cleanse, moisturize, protect. *Semin Cutan Med Surg.* 2013 Jun;32(2 Suppl 2):30-2.
29. Ramos-e-Silva M, Carneiro SC. Cosmetics for the elderly. *Clin Dermatol.* 2001 Jul-Aug;19(4):413-23.
30. Terme Dobrna: Zdravilna termalna voda. 2019. Dostopno na: <http://www.terme-dobrna.si/wellness-zdravje/zdravilna-termalna-voda> (14. marec 2019).
31. Matheson-Shedrick K. Spas unwrapped. *J Med Pract Manage.* 2008 Nov-Dec;24(3):166-9.
32. Tagami H. Location-related differences in structure and function of the stratum corneum with special emphasis on those of the facial skin. *Int J Cosmet Sci.* 2008 Dec;30(6):413-34.
33. Huang A, Seité S, Adar T. The use of balneotherapy in dermatology. *Clin Dermatol.* 2018 May - Jun;36(3):363-8.
34. Soo JY, Jansen J, Masereeuw R, Little MH. Advances in predictive in vitro models of drug-induced nephrotoxicity. *Nat Rev Nephrol.* 2018 Jun;14(6):378-93.
35. Truskey GA. Human Microphysiological Systems and Organoids as in Vitro Models for Toxicological Studies. *Front Public Health.* 2018 Jul 10;6:185.