

## ГЕРОНТОЛОГИЯ

УДК 576.35:57.017.6

### ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ГЕРОПРОТЕКТОРА “QUINTON MARINE PLASMA” В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ

А.Н. Хохлов, Г.В. Моргунова, Т.С. Рындина, Ф. Колл\*

(сектор эволюционной цитогеронтологии; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru)

Изучили влияние изотонического раствора “Quinton Marine Plasma” (QMP) на размножение и “стационарное старение” (накопление “возрастных” изменений клеток при замедлении скорости размножения в пределах одного пассажа и дальнейшем их пребывании в стационарной фазе роста) трансформированных культивируемых клеток китайского хомячка. Ни в одном из экспериментов не обнаружили выраженного положительного действия QMP на исследованные показатели жизнеспособности клеточной культуры. Предположили, что QMP, как и многие другие исследованные авторами в последнее время потенциальные геропротекторы (2,4-динитрофенол в концентрациях, обеспечивающих мягкое разобщение, эфирное масло орегано, гидратированный C<sub>60</sub>-фуллерен и др.), может проявлять свое благотворное действие только на уровне целого организма, задействуя нейрогуморальные механизмы, отсутствующие в цитологических модельных системах.

**Ключевые слова:** *Quinton Marine Plasma, цитогеронтология, геропротекторы, культивируемые клетки, клеточная пролиферация, “стационарное старение”.*

Известно, что морская вода и препараты на ее основе благотвенно влияют на живые организмы [1–7]. Один из наиболее известных таких препаратов, “Quinton Marine Plasma” (QMP), представляет собой морскую воду, полученную из мест интенсивного (“вихревого”) размножения планктона в Атлантическом океане [8, 9]. QMP обогащен различными минеральными соединениями, микроэлементами и биологически активными веществами. Выпускающая препаратор испанская компания “Quinton Laboratories” подвергает QMP процедурам очистки и холодной стерилизации, исключающим потерю им лечебных свойств. QMP успешно применяется для профилактики инфекционных заболеваний, стимуляции иммунитета и умственных способностей, улучшения антиоксидантного статуса организма, нормализации кишечной флоры, лечения аллергии, простудных заболеваний, легочных патологий, кожных болезней (например, экземы и псориаза), мышечной атрофии, синуситов, гипертонической болезни, заболеваний желудочно-кишечного тракта и др. [8–10]. Однако до сих пор остаются неясными конкретные механизмы благотворного влияния QMP на живые организмы. В настоящей работе мы попытались выяснить, как QMP может действовать на размножение и “стационарное старение” [11–19] культивируемых клеток, которые, находясь вне организма, не подвергаются вли-

янию нейрогуморальных факторов [11, 14, 20–22]. При этом мы выбрали трансформированные клетки, так как они не изменяются от пересева к пересеву [23] в отличие от нормальных клеток, которые размножаются, подчиняясь “феномену Хейфлика” (“нельзя дважды войти в одну реку”). Такой выбор обеспечил возможность многократного корректного повторения исследований на идентичных культурах.

#### Материалы и методы

В работе использовали препарат “Isotonic Quinton Marine Plasma”, предоставленный компанией “Laboratories Quinton International, S.L.”.

Эксперименты проводили на трансформированных клетках китайского хомячка перевиваемой линии B11-dii FAF28 (клон 237), полученной из Медико-генетического научного центра РАМН (Москва). Клетки культивировали при 37°C в стеклянных флаconах Карреля, используя среду Игла в модификации Дульбекко (ДМСИ, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва) с добавлением 5–10% сыворотки крови крупного рогатого скота (СКРС; “РАА”, Австрия или “Биолот”, Санкт-Петербург), пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Поддерживая культуру, клетки пересевали в соотношении 1:10–1:3 через каждые 3–4 сут. Снимали клетки

\*“Квинтон Лабораториз, С.Л.”, пров. Аликанте, г. Кош, кв. Вирхен дель Кармен, ул. Аснар 6, 033350 Испания (Laboratories Quinton, S.L., Aznar Street 6, PI Virgen del Carmen, 033350 Cox, Alicante, Spain).

с поверхности роста с помощью смеси (1:1) 0,02%-го версена и 0,25%-го трипсина (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН, Москва).

В первой серии экспериментов, направленных на определение цитотоксических или митогенных свойств QMP, клетки 2–3-дневного “возраста” (т.е. выращиваемые без пересева в течение 2–3 сут) засевали в герметично закрывающиеся пеницилловые флаконы площадью 2,83 см<sup>2</sup> с плотностью около 40 тыс. кл./см<sup>2</sup> (сусpenзия в 1 мл ростовой среды). Среда состояла из следующих ингредиентов в различных комбинациях: 1) ДМСИ; 2) СКРС; 3) физиологический раствор (ФР); 4) изотонический QMP. В среде всегда присутствовали пенициллин и стрептомицин в указанных выше концентрациях. Через 5 сут культивирования при 37°C клетки снимали с поверхности роста с помощью смеси растворов версена и трипсина, а затем подсчитывали их количество в камере Горяева (4 камеры на флакон), оценивая, как изменилась плотность клеток по сравнению с плотностью посева.

Изучая влияние QMP на кинетику роста клеток и их последующей гибели в стационарной фазе роста, клетки 3-дневного “возраста” сняли с поверхности флакона Карреля смесью растворов версена и трипсина, суспендировали в ростовой среде (90% ДМСИ и 10% СКРС), развели средой до необходимой концентрации клеток и посеяли по 1 мл сусpenзии в 125 герметично закрывающихся пеницилловых флаконов площадью 4,15 см<sup>2</sup> (плотность посева — около 40 тыс. кл./см<sup>2</sup>). Все флаконы поместили в термостат (37°C). Через сутки после посева с помощью смеси растворов версена и трипсина сняли клетки со дна 4 флаконов и подсчитали их количество в камере Горяева, чтобы определить плотность прикрепившихся клеток. Оставшиеся флаконы разделили на три группы (“контроль”, “QMP” и “ФР”) и добавили в них по 1 мл среды, содержащей ДМСИ, СКРС, ФР и QMP в различных комбинациях. В результате конечные концентрации ингредиентов в группах стали следующими: “контроль” — 90% ДМСИ, 10% СКРС; “QMP” — 50% ДМСИ, 10% СКРС, 40% QMP; “ФР” — 50% ДМСИ, 10% СКРС, 40% ФР. После этого через определенные промежутки времени извлекали из термостата по три флакона каждой группы, клетки снимали с поверхности роста смесью версена и трипсина, суспендировали в ростовой среде без СКРС и оценивали

количество клеток в каждом флаконе с помощью 4 камер Горяева. Перед подсчетом все флаконы шифровали.

Математические расчеты и статистическую обработку результатов производили с помощью программ Microsoft Excel 2007 и SigmaPlot 12.

## Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены результаты эксперимента по оценке влияния замены в ростовой среде ДМСИ на QMP или ФР, а также культивирования в QMP без СКРС на скорость размножения трансформированных клеток китайского хомячка. Оказалось, что, в противоположность данным, полученным другими авторами на мононуклеарных клетках периферической крови человека [9, 10], наши клетки практически неспособны выживать и тем более размножаться в QMP как без СКРС, так и с ней. Это позволяет полагать, что известная идея [24, 25] о возможности полной замены культуральной среды на QMP применима далеко не ко всем клеткам, т.е. в QMP, по-видимому, нет всего необходимого спектра как питательных веществ, так и ростовых факторов, необ-

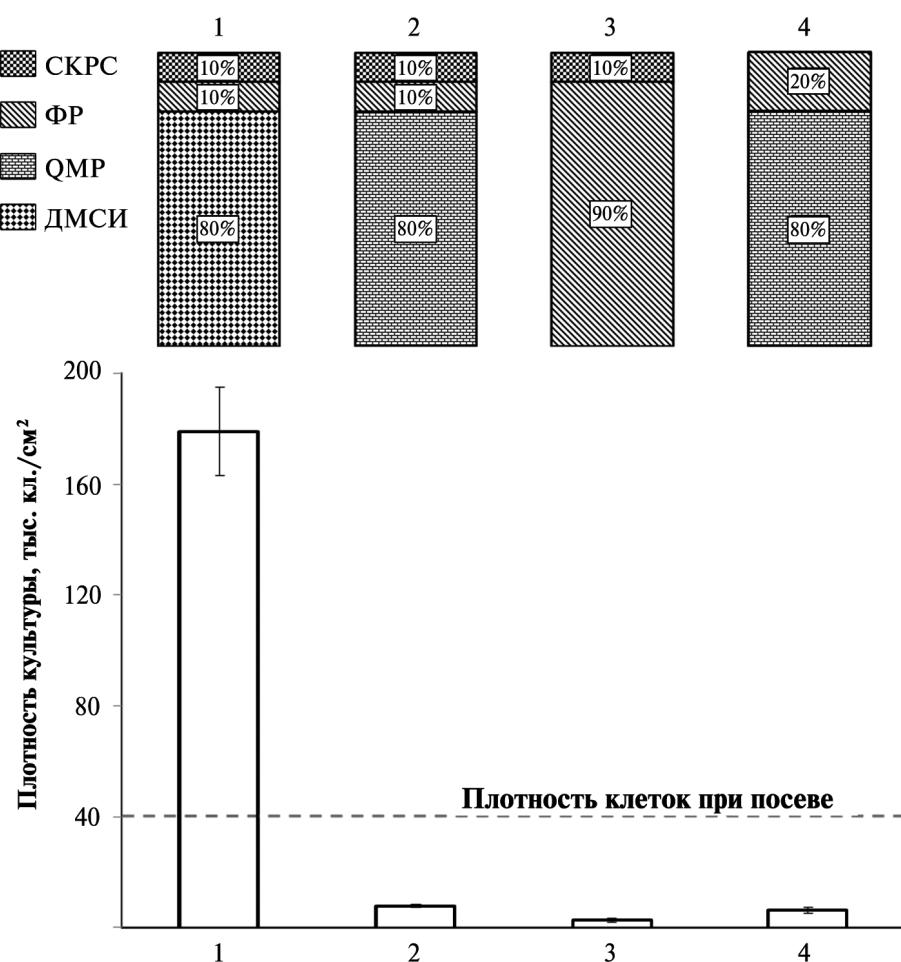


Рис. 1. Влияние замены в ростовой среде ДМСИ на QMP или ФР, а также культивирования в QMP без СКРС на скорость размножения трансформированных клеток китайского хомячка (изменение плотности клеточной культуры через 5 сут после посева). Приведены стандартные ошибки среднего

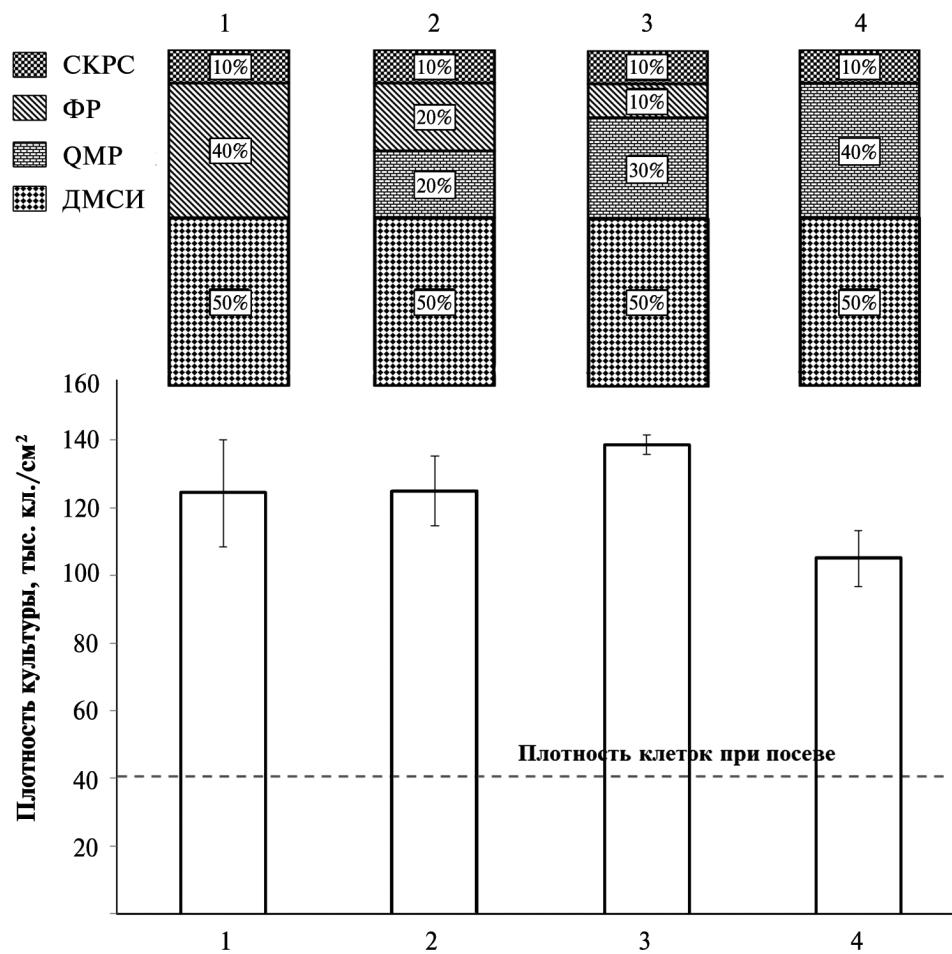


Рис. 2. Влияние различных комбинаций ФР и QMP на скорость размножения трансформированных клеток китайского хомячка (изменение плотности клеточной культуры через 5 сут после посева) в ростовой среде с 50% ДМСИ и 10% СКРС. Приведены стандартные ошибки среднего

ходимых для полноценного размножения культуры животных клеток.

Как видно из данных, приведенных на рис. 2, при замене 40% стандартной ростовой среды на различные комбинации QMP и ФР интенсивность размножения культуры во всех параллелях оказалась практически одинаковой. Это позволило нам сделать вывод о том, что QMP даже в присутствии ДМСИ и СКРС не влияет на жизнеспособность изученных культивируемых клеток.

Интересно заметить, что клетки в среде, разбавленной ФР или QMP, росли не хуже, чем в контроле, что позволило думать о значительной “избыточности” используемой нами культуральной среды (90% ДМСИ и 10% СКРС). Однако этот эксперимент проводился

лишь на протяжении 5 сут, так что нельзя было исключить, что в дальнейшем, при “стационарном старении” культуры, различия между контролем и опытом проявятся.

На рис. 3 представлены данные заключительного эксперимента, в котором мы как раз изучали возможное влияние QMP (40% в ростовой среде) на кинетику роста и “стационарного старения” культуры трансформированных клеток китайского хомячка на протяжении почти полутора месяцев. Надо сказать, что клетки в таком длительном эксперименте действительно стареют (без кавычек) в том смысле, который вкладывается в этот термин в рамках классического определения старения как увеличения вероятности смерти со временем [26, 27]. Поэтому, кстати, кривая выживания клеток очень хорошо аппроксимируется уравнением Гомпертца [19]. В этой модельной системе мы опять-таки не обнаружили влияния QMP на показатели жизнеспособности клеток — на этот раз те показатели, которые определяют скорость их “стационарного старения”. Видно, что все три кри-

евые на рис. 3 практически идентичны. Лишь на 5-е сут культивирования насыщающая плотность культуры

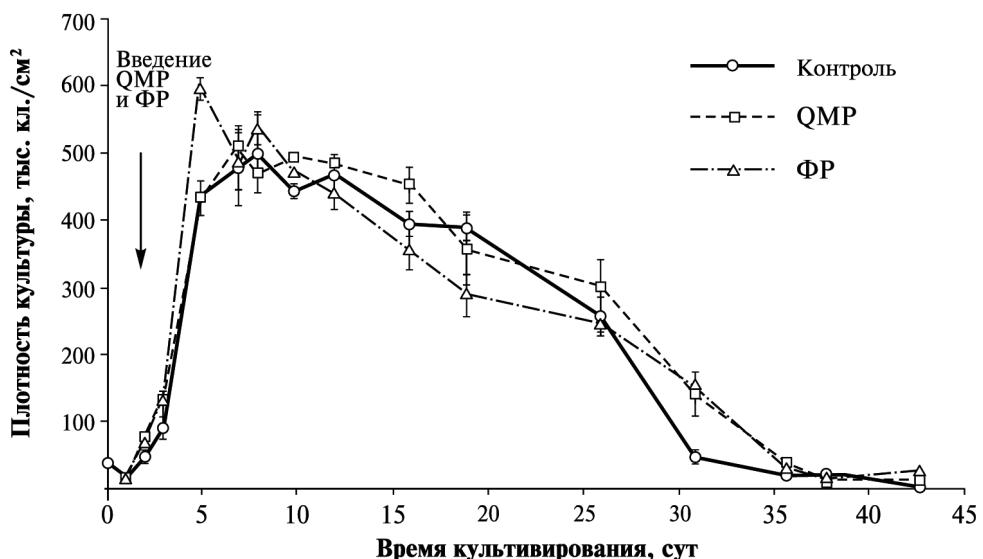


Рис. 3. Влияние на кинетику роста и “стационарного старения” культуры трансформированных клеток китайского хомячка замены в ростовой среде 40% ДМСИ на QMP или ФР (методические подробности — в тексте). Приведены стандартные ошибки среднего

с 40% ФР оказалась достоверно более высокой, чем этот показатель для двух других культур. Известно, что данный параметр обратно коррелирует с “возрастом” клеток в цитогеронтологических экспериментах [28]. Конечно, было бы заманчиво предположить, что ФР ненадолго “омолаживает” наши клетки, однако более приемлемой представляется идея Е.Е. Егорова с соавт. о значительном влиянии на пролиферативные характеристики культивируемых клеток, изменяющихся при разбавлении культуральной среды ее ионной силы и редокс-потенциала [29, 30].

Таким образом, нам ни в одном эксперименте не удалось обнаружить положительного влияния QMP на жизнеспособность использованных культивируемых клеток. Возможно, препарат проявляет себя таким образом только в отношении трансформированных клеток, поэтому представляется целесообразным в даль-

нейшем повторить эти эксперименты на нормальных фибробластах, обладающих ограниченным митотическим потенциалом, а также на нормальных “иммортализованных” клетках с активированной теломеразой. Кроме того, не исключено, что QMP, как и многие другие исследованные нами в последнее время потенциальные геропротекторы (2,4-динитрофенол в концентрациях, обеспечивающих мягкое разобщение, эфирное масло орегано, гидратированный C<sub>60</sub>-фуллерен и др.), может проявлять свое благотворное действие только на уровне целого организма, задействуя нейрогуморальные механизмы, отсутствующие в цитологических модельных системах.

Авторы благодарны А.Д. Гладневой за помощь в работе с рукописью статьи.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoshizawa Y., Tanojo H., Kim S.J., Maibach H.I. Sea water or its components alter experimental irritant dermatitis in man // Skin Res. Technol. 2001. Vol. 7. P. 36–39.
2. Kimata H., Tai H., Nakagawa K., Yokoyama Y., Nakajima H., Ikegami Y. Improvement of skin symptoms and mineral imbalance by drinking deep sea water in patients with atopic eczema/dermatitis syndrome (AEDS) // Acta Medica (Hradec Králové). 2002. Vol. 45. N 2. P. 83–84.
3. Yoshioka S., Hamada A., Cui T., Yokota J., Yamamoto S., Kusunose M., Miyamura M., Kyotani S., Kaneda R., Tsutsui Y., Odani K., Odani I., Nishioka Y. Pharmacological activity of deep-sea water: examination of hyperlipidemia prevention and medical treatment effect // Biol. Pharm. Bull. 2003. Vol. 26. N 11. P. 1552–1559.
4. Tabary O., Muselet C., Miesch M.C., Yvin J.C., Clément A., Jacquot J. Reduction of chemokine IL-8 and RANTES expression in human bronchial epithelial cells by a sea-water derived saline through inhibited nuclear factor-κB activation // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. Vol. 309. N 2. P. 310–316.
5. Miyamura M., Yoshioka S., Hamada A., Takuma D., Yokota J., Kusunose M., Kyotani S., Kawakita H., Odani K., Tsutsui Y., Nishioka Y. Difference between deep seawater and surface seawater in the preventive effect of atherosclerosis // Biol. Pharm. Bull. 2004. Vol. 27. N 11. P. 1784–1787.
6. Hataguchi Y., Tai H., Nakajima H., Kimata H. Drinking deep-sea water restores mineral imbalance in atopic eczema/dermatitis syndrome // Eur. J. Clin. Nutr. 2005. Vol. 59. P. 1093–1096.
7. Slapak I., Skoupá J., Strnad P., Horník P. Efficacy of isotonic nasal wash (seawater) in the treatment and prevention of rhinitis in children // Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg. 2008. Vol. 134. N 1. P. 67–74.
8. Original Quinton [Электронный ресурс]. 2010. (URL: <http://www.originalquinton.com/> (дата обращения: 04.09.2014).
9. Alberola J., Coll F. Marine therapy and its healing properties // Curr. Aging Sci. 2013. Vol. 6. N 1. P. 63–75.
10. Martínez-Peinado P., Maseres-Javaloy P., Martínez-López J.E., García-Irles M., Sempere-Ortells J.M. In vitro and in vivo studies to evaluate a potential activity of Quinton Solution on the immune system // International Immunology
- Meeting Abstracts (Suppl. 1. Pt. 3). Oxford: Oxford University Press, 2010. P. iii93.
11. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // Итоги науки и техники ВИНИТИ АН СССР. Сер. Общие проблемы физико-химической биологии. Т. 9. М.: ВИНИТИ, 1988. 176 с.
12. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992. Vol. 663. P. 475–476.
13. Khokhlov A.N. Cell proliferation restriction: is it the primary cause of aging? // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 519.
14. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // Curr. Aging Sci. 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.
15. Khokhlov A.N. Decline in regeneration during aging: appropriateness or stochastics? // Russ. J. Dev. Biol. 2013. Vol. 44. N 6. P. 336–341.
16. Khokhlov A.N. Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochastics? // Biogerontology. 2013. Vol. 14. N 6. P. 703–708.
17. Khokhlov A.N. Evolution of the term “cellular senescence” and its impact on the current cytogerontological research // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 4. P. 158–161.
18. Khokhlov A.N. What will happen to molecular and cellular biomarkers of aging in case its program is canceled (provided such a program does exist)? // Adv. Gerontol. 2014. Vol. 4. N 2. P. 150–154.
19. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 1. P. 10–14.
20. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cytogerontological studies // Biophysics. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.
21. Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A., Fatkullina L.D., Burlakova E.B., Khokhlov A.N. Cytogerontological studies of biological activity of oregano essential oil // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 2. P. 52–57.

22. Yablonskaya O.I., Ryndina T.S., Voeikov V.L., Khokhlov A.N. A paradoxical effect of hydrated C<sub>60</sub>-fullerene at an ultralow concentration on the viability and aging of cultured Chinese hamster cells // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 2. P. 63–68.
23. Khokhlov A.N. Can cancer cells age? Stationary cell culture approach to the problem solution // Visualizing of senescent cells in vitro and in vivo. Programme and abstracts (Warsaw, Poland, 15–16 December 2012). Warsaw, 2012. P. 48–49.
24. Lewis M.R. Sea water as a medium for tissue cultures // Anat. Rec. 1916. Vol. 10. N 4. P. 287–299.
25. Berge J.A., Franklin D.J., Harrison P.J. Evolution of an artificial seawater medium: improvements in enriched seawater, artificial water over the last two decades // J. Phycol. 2001. Vol. 37. N 6. P. 1138–1145.
26. Khokhlov A.N., Wei L., Li Y., He J. Teaching cytogerontology in Russia and China // Adv. Gerontol. 2012. Vol. 25. N 3. P. 513–516.
27. Wei L., Li Y., He J., Khokhlov A.N. Teaching the cell biology of aging at the Harbin Institute of Technology and Moscow State University // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 1. P. 13–16.
28. Khokhlov A.N. The cell kinetics model for determination of organism biological age and for geroprotectors or geropromoters studies // Biomarkers of aging: expression and regulation. Proceeding / Eds. F. Licastro, C.M. Caldarera. Bologna: CLUEB, 1992. P. 209–216.
29. Moldaver M.V., Yegorov Y.E. Sparse plating increases the heterogeneity of proliferative potential of fibroblasts // Mech. Ageing Dev. 2009. Vol. 130. N 5. P. 337–342.
30. Бурнаевский Н.С., Вишнякова Х.С., Сафенина А.В., Рыбалко Д.В., Попов К.В., Егоров Е.Е. Влияние парциального давления кислорода на эффективность колониообразования и дифференцировки мезенхимальных стromальных клеток человека, полученных из различных источников // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2010. Т. 5. № 4. С. 24–30.

Поступила в редакцию  
15.09.14

## PILOT STUDY OF A POTENTIAL GEROPROTECTOR, “QUINTON MARINE PLASMA”, IN EXPERIMENTS ON CULTURED CELLS

*A.N. Khokhlov, G.V. Morgunova, T.S. Ryndina, F. Coll*

Effect of isotonic “Quinton Marine Plasma” (QMP) solution on the growth and “stationary phase aging” (accumulation of “age” changes in cultured cells during cell proliferation slowing down within a single passage and subsequent “aging” in the stationary phase of growth) of transformed Chinese hamster cells was studied. No positive effects of QMP on the studied viability indexes of the cultured cells were found in all the experiments. It is assumed that QMP, like many other potential anti-aging agents the authors studied recently (2,4-dinitrophenol in concentrations that provide mild uncoupling, the essential oil of oregano, hydrated C<sub>60</sub>-fullerene, etc.), can demonstrate its beneficial effect only at the level of the whole organism, triggering neurohumoral mechanisms that are not present in cytological model systems.

**Key words:** Quinton Marine Plasma, cytogerontology, geroprotectors, cultured cells, cell proliferation, “stationary phase aging”.

### Сведения об авторах

*Хохлов Александр Николаевич* — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

*Моргунова Галина Васильевна* — аспирант сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: morgunova@mail.bio.msu.ru

*Рындина Татьяна Сергеевна* — магистрант сектора эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90; e-mail: ryndina.tatyana@gmail.com

*Колл Франциско (Coll Francisco)* — генеральный директор “Квинтон Лабораториз”. Тел.: +34 965-702511; e-mail: direccion@quinton.es