



Лаборатория антивозрастных технологий ГАУЗ СО  
«Институт медицинских клеточных технологий»

*Мещанинов Виктор Николаевич*

Заведующий лабораторией,  
заведующий кафедрой биохимии ФГБОУ ВО «Уральский  
государственный медицинский университет» Минздрава  
РФ, д.м.н., профессор

---

*Мещанинов В.Н., Гаврилов И.В., Лукаш В.А.,  
Вержбицкая Т.Ю., Сентябрева Д.А.,  
Щербаков Д.Л., Жиборкин Г.В.*

## **ПРИМЕНЕНИЕ ОЛИГОПЕПТИДОВ КАК ЦИТОПРОТЕКТОРОВ ПРИ УСКОРЕННОМ СТАРЕНИИ КЛЕТОК КРОВИ *IN VITRO***

Институт медицинских клеточных технологий,  
Екатеринбург, Россия  
Уральский государственный медицинский университет,  
Екатеринбург, Россия

**Резюме.** В статье изложены данные влияния олигопептидов пинеалона (глу-асп-арг), везугена (лиз-глу-асп) и кристагена (про-глу-асп) на клеточный и биохимический состав донорской крови при ее хранении. Установлено ингибирующее гликолиз в стареющих клетках крови при гипоксической инкубации *in vitro* действие олигопептидов пинеалона (глу-асп-арг), везугена (лиз-глу-асп) и кристагена (про-глу-асп), а также тенденция к снижению хемилюминесценции при выраженном увеличении их (перекисной) резистентности к окислительному стрессу. Исследованные вещества при этом предположительно ускоряют в условиях гипоксии созревание стволовых клеток крови. Содержание CD34<sup>+</sup> клеток при хранении крови подвержено сложной динамике, в которой, по-видимому, доминирует превращение стволовых клеток в прогениторные. Сделан вывод об эффективности их применения в качестве антиоксидантов, мембранопротекторов, цитогеропротекторов.

**Ключевые слова:** олигопептиды, кровь, метаболизм, консервация.

### **Введение**

Переливание крови или ее компонентов является незаменимым методом при некоторых острых состояниях. Для обеспечения максимальной эффективности и безопасности необходимо соблюдение технического регламента, в частности — сохранение биологической полноценности донорской крови и ее компонентов, которое может быть осложнено высокой восприимчивостью крови к воздействию факторов внешней и внутренней среды. В процессе заготовки, переработки, хранения и транспортировки функциональные свойства крови снижаются [6, 8, 10].

Исследования, позволяющие затормозить процессы старения клеток после ее заготовки, влияющие на эффективное функционирование крови, имеют значение для прикладной медицины, гемотрансфузиологии, реаниматологии, травматологии и др.

В качестве потенциального метода замедления процессов старения заготовленной для гемотрансфузий крови возможно применение регуляторных олигопептидов, обладающих свойством протекторной активности [2], которая основана на глубоких перестройках клеточного метаболизма [7, 9] (рисунок 1). Ранее нами был установлен геропротилактический характер их воздействия (по снижению показателя биологического возраста) у пациентов с ускоренным старением в условиях полиморбидной патологии: положительное влияние на состояние клеточных мембран эритроцитов, углеводный и липидный метаболизм, стимуляция деятельности центральной нервной системы, сердца, сосудов и других органов и функций организма [2, 3, 4, 5].

Исследования с использованием переживающих в определенных условиях органов животных и человека являются классическими высокоинформативными моделями для изучения процессов ускоренного (патологического) старения клеток, тканей и органов, а также разработки способов его коррекции [4].

**Цель исследования** — выявить влияние олигопептидов пинеалона (глу-асп-арг), везугена (лиз-глу-асп) и кристагена (про-глу-асп) на клеточный и биохимический состав донорской крови при ускоренном старении клеток крови в условиях ее хранения *in vitro*.

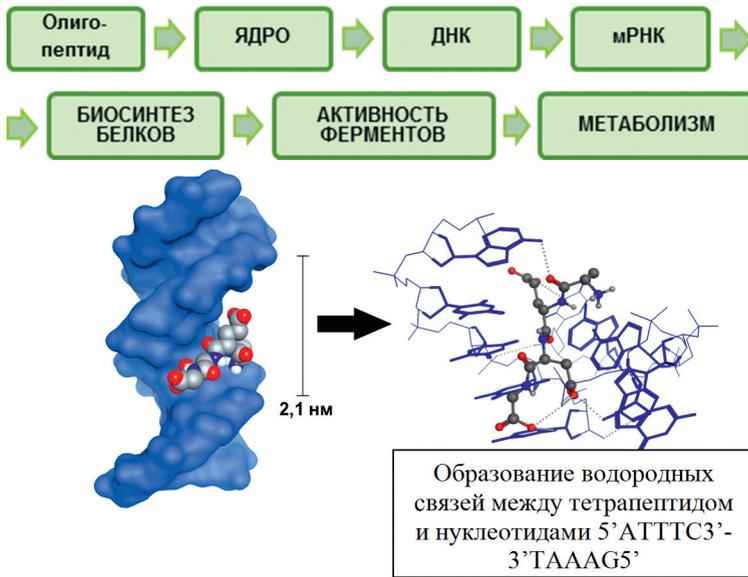


Рисунок 1. Схема эпигенетического механизма действия олигопептидов [7, 9]

### Материалы и методы исследования

Для оценки показателей были исследованы образцы из смеси цельной крови и плазмы крови от 47 практически здоровых доноров в возрасте 30–59 лет обоего пола, стабилизированной ЭДТА, с конечной концентрацией пинеалона, везугена и кристагена 20 мкг/мл (химико-биологическое объединение при РАН «Фирма Вита», Санкт-Петербург, Россия), а также в качестве контроля — образцы смеси донорской цельной крови и плазмы крови стабилизированные ЭДТА без добавки олигопептидов. Пробы выдерживались в холодильнике при 4°C в условиях стерильности при относительной влажности 70% без доступа воздуха. Пробы для исследования отбирались сразу после добавления в донорскую кровь пинеалона, везугена или кристагена до начала инкубации, затем через 24 часа инкубации (ранний срок), 48–72 часа инкубации (поздний срок).

Плазма крови использовалась для исследования основных показателей углеводного, липидного и белкового обменов, хемилюминесценции, цельная кровь — для исследования резистентности эритро-

цитов, форменных элементов, стволовых клеток. Для количественной оценки состояния форменных элементов был использован 18-параметровый гематологический анализатор «PCE – 90Vet» HTI (США). Для оценки метаболизма проводилось исследование на содержание биохимических маркеров на анализаторе «Chem Well 2910 Combi» Awareness Technology (США) с использованием реактивов «Sentinel Diagnostics» (Италия). Оценка изменения свойств мембран эритроцитов производилось методикой исследования осмотической и перекисной резистентности эритроцитов [1] — при помощи сканирующего спектрофотометра «Unico – 2802» United Products & Instruments (США). Индуцированная 3% пероксидом водорода хемилюминесценция плазмы крови [5] исследовалась на люминометре «Lucy 3» Anthos Labtec Instruments (Австрия) для оценки уровня перекисного окисления липидов. Определение суммарного содержания стволовых гемопоэтических клеток и прогениторных клеток по маркеру CD34+ производилось после обработки лизирующим эритроциты раствором «BD FACS» (США), выделения кариоцитов центрифугированием и их промывки «BD CellWash» (США) на проточном цитофлуориметре «BD FACS Canto II» Becton & Dickinson (США) с использованием моноклональных антител [9]. Результаты обрабатывались методами непараметрической статистики.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

В пробах с добавлением олигопептидов по сравнению с контролем наблюдалась тенденция к снижению уровня потребляемой клетками крови глюкозы, особенно на раннем сроке, таким образом уменьшая их энергетические затраты, что гипотетически должно позволить эритроцитам дольше находиться в жизнеспособном состоянии. Механизм ингибирующего действия в кариоцитах, по-видимому, может быть объяснен исходя из уже известных механизмов их действия через рецепторы на ДНК ядер клеток, а в эритроидных элементах на сегодняшний день остается непонятным [1, 2, 7]. Обнаруживалась корреляция между уменьшением потребления клетками крови глюкозы и увеличением перекисной резистентности эритроцитов в пробах с пинеалоном, везугеном и кристагеном по сравнению с контрольными образцами крови, что указывает косвенно на возможность снижения повреждающего действия молочной кислоты — продукта гликолиза — на биомембраны эритроцитов. Можно предположить, что благодаря торможению гликолиза и снижения степени ацидоза в крови мем-

браны эритроцитов дольше сохраняли резистентность к влиянию веществ, способных вызвать их повреждение с последующим гемолизом (рисунок 2).

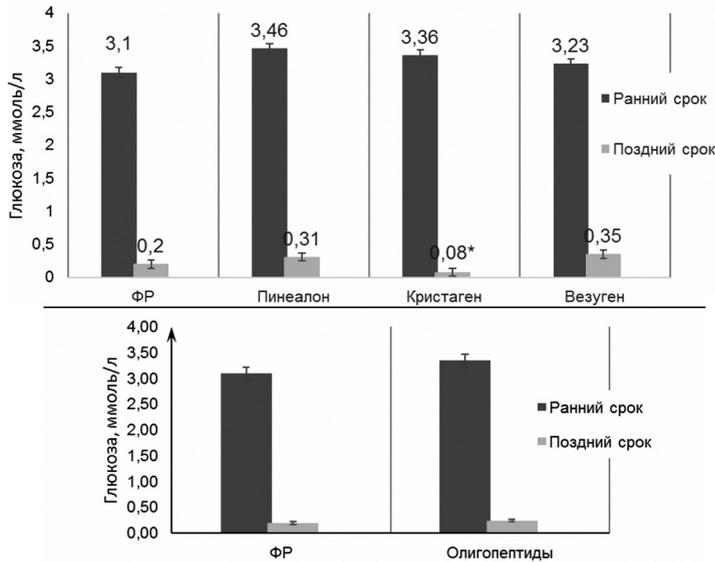


Рисунок 2. Влияние олигопептидов на концентрацию глюкозы в крови в разные сроки инкубации *in vitro* (\*  $p < 0,05$ ).

В контрольных и исследуемых пробах наблюдалась тенденция к увеличению количества стволовых и прогениторных клеток (по маркеру CD34+). Гипоксические условия инкубации по данным [8, 11, 12,] приводят к сдвигу в популяции стволовые-прогениторные клетки в сторону прогениторных с уменьшением на позднем сроке в конечном итоге цифрового значения маркера CD34+ за счет ускорения созревания (аналог «старения») стволовых клеток и превращения их в более зрелые прогениторные (рисунок 3).

Олигопептиды существенно повышали перекисную резистентность эритроцитов при проведении фактически нагрузочной пробы пероксидом водорода, что в сочетании с относительно стабильным уровнем хемилюминесценции (сначала тенденция к повышению на ранний срок, затем снижение на позднем сроке) свидетельствует о высоких антиокислительных резервных возможностях олигопептидов (рисунок 4).

В процессе хранения крови существенного влияния олигопептидов на другие стандартные гематологические и биохимические параметры не обнаружено. Существенных различий зависимости стабилизирующих клетки крови эффектов от химической структуры используемых веществ также получено не было, что позволяет на данном этапе исследования считать механизмы их протекторного влияния принципиально сходными.

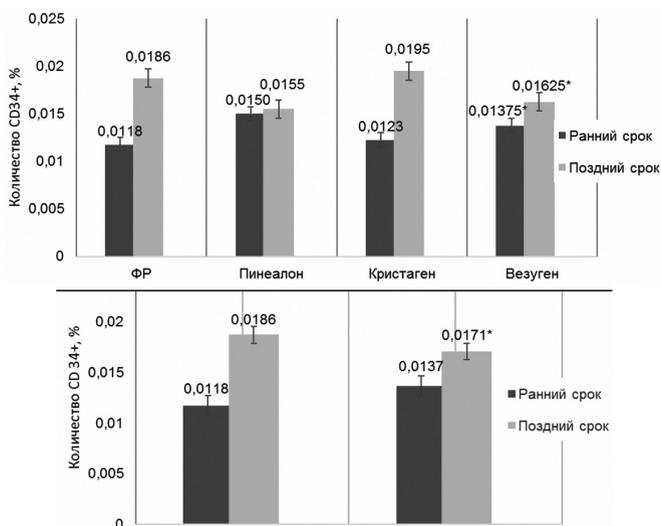


Рисунок 3. Влияние олигопептидов на количество CD34+ клеток крови в разные сроки инкубации *in vitro* (\*  $p < 0,05$ ).

## Выводы

Установлено ингибирующее гликолиз действие олигопептидов пинеалона (глу-асп-арг), везугена (лиз-глу-асп) и кристагена (про-глу-асп) в стареющих клетках крови при гипоксической инкубации *in vitro*, а также тенденция к снижению хемилюминесценции при выраженном увеличении их (перекисной) резистентности к окислительному стрессу. Исследованные вещества при этом предположительно в условиях гипоксии ускоряют созревание стволовых клеток крови. Содержание CD34+ клеток при хранении крови подвергается динамическим изменениям, по-видимому, в котором преобладает превращение имеющихся стволовых клеток в прогениторные (рисунок 5).

Таким образом, изученные регуляторные олигопептиды эффективны и перспективны для применения в качестве стабилизаторов форменных эле-

ментов крови при ее консервации и хранении, протекции состояния клеток в условиях их ускоренного старения под влиянием воздействия экстремальных факторов и пролонгирования времени их жизнеспособности.

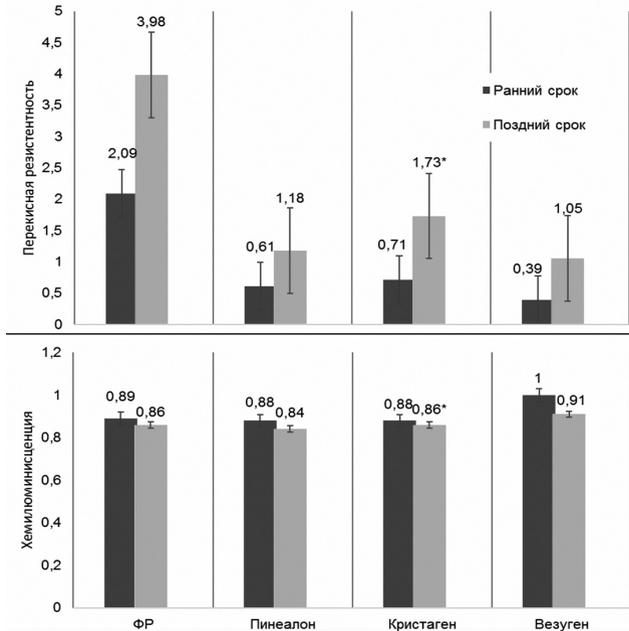


Рисунок 4. Влияние олигопептидов на изменения величины хемилюминисценции крови и интенсивности перекисной резистенции эритроцитов в разные сроки инкубации *in vitro* (\*  $p < 0,05$ ).

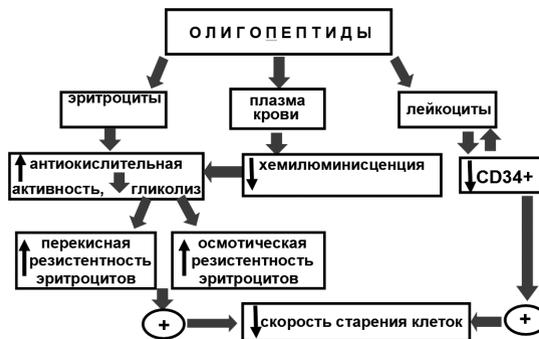


Рисунок 5. Механизмы геропротекторного антиоксидантного мембраностабилизирующего влияния регуляторных олигопептидов на процесс старения клеток донорской крови при ее хранении.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Борисов Ю.А., Спиридонов В.Н., Суглобова Е.Д. Резистентность эритроцитарных мембран: механизмы, тесты, оценка (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2007; 12: 36-40.

2. Козина Л.С., Арутюнян А.В., Стволинский С.Л. и др. Оценка биологической активности регуляторных пептидов в модельных экспериментах *in vitro*. Успехи геронтологии. 2008; 1 (21): 116-122.

3. Мещанинов В.Н., Ткаченко Е.Л., Гаврилов И.В. и др. Влияние синтетических пептидов на темпы старения пациентов с хроническими полиморбидными и психоорганическими нарушениями центральной нервной системы в стадии ремиссии. Успехи геронтологии. 2015; 1 (28): 62 – 67.

4. Мещанинов В.Н., Ткаченко Е.Л., Щербаков Д.Л. и др. Медицинские диагностические и лечебные клеточно-метаболические технологии в превентивной геронтологии и гериатрии — итоги работы за 10 лет. Вестник уральской медицинской академической науки. 2016; 4: 76-86.

5. Мещанинов В.Н., Хавинсон В.Х., Ткаченко Е.Л. и др. Использование олигопептидов в клеточно-ориентированных технологиях превентивной медицины. Вестник уральской медицинской академической науки. 2015; 4: 116-122.

6. О техническом регулировании: постановление Правительства РФ от 26 января 2010 г. N 29 «Об утверждении технического регламента о требованиях безопасности крови, ее продуктов, кровезамещающих растворов и технических средств, используемых в трансфузионно-инфузионной терапии» (с изменениями от 12 октября 2010 г.) // Собрание законодательства РФ. 2010; 5: 536.

7. Федореева Л.И., Киреев И.И., Хавинсон В.Х. и др. Проникновение коротких флуоресцентно-меченных пептидов в ядро в клетках HeLa и специфическое взаимодействие пептидов с дезоксирибополинуклеотидами и ДНК *in vitro*. Биохимия. 2011; 11 (76): 1505 – 1516.

8. Bourdieu A., Avalon M., Ivanovic Z1., Steady state peripheral blood provides cells with functional and metabolic characteristics of real hematopoietic stem cells. J Cell Physiol. 2018 Jan; 233(1): 338-349. doi: 10.1002/jcp.25881. Epub 2017 Mar 28.

9. Dauber K., Becker D., Odendahl M. et al. Enumeration of viable CD34(+) cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: results of a study of the novel BD™ stem cell enumeration kit. Cytotherapy. 2011; 2: 449-458.

10. Duchez P., Rodriguez L., Ivanovic Z. Clinical-scale validation of a new efficient procedure for cryopreservation of ex vivo expanded cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. *Cytotherapy*. 2016 Dec; 18 (12): 1543-1547. doi: 10.1016/j.jcyt.2016.08.004. Epub 2016 Aug 31.
11. Ivanovic Z. Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *J. Cell. Physiol.* 2009; 2 (219): 271–275.
12. Loncaric D., Duchez P., Ivanovic Z. To harness stem cells by manipulation of energetic metabolism. *Transfus Clin Biol.* 2017 Jun 8. pii: S1246-7820(17)30068-X. doi: 10.1016/j.tracli.2017.05.006.