

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ.О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

ЗАПОРОЖЕЦЬ Тетяна Миколаївна

УДК 612.111.11/.13

**КОМПЛЕКС ПЕПТИДНИХ ФРАГМЕНТІВ ГЕМОГЛОБІНУ:
РОЛЬ В РЕГУЛЯЦІЇ СИСТЕМИ КРОВІ**

14.03.03 - нормальна фізіологія

Автореферат

дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора медичних наук

Київ-2002

Дисертацією є рукопис

Робота виконана на кафедрі нормальної фізіології та Центральній науково-дослідній лабораторії Української медичної стоматологічної академії Міністерства охорони здоров'я України

Науковий консультант: Заслужений діяч науки України,
доктор медичних наук, професор
Мищенко Віталій Петрович
Українська медична стоматологічна академія,
завідувач кафедри нормальної фізіології

Офіційні опоненти: член-кор. АПН України, доктор медичних наук, професор
Шевчук Віктор Григорович,
Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця,
завідувач кафедри нормальної фізіології

доктор медичних наук, професор
Третяк Наталія Миколаївна
Інститут гематології і трансфузіології АМН України,
завідувачка відділення захворювань системи крові

доктор медичних наук, професор
Чаяло Петро Петрович
Інститут експериментальної радіології Наукового центру
радіаційної медицини АМН України, завідувач лабораторії
радіаційної біохімії

Провідна установа: Інститут геронтології АМН України, лабораторія регуляції
метаболізму

Захист відбудеться “14” січня 2003 року о 10-й годині на засіданні Спеціалізованої
Вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України за
адресою: 01204, м.Київ, вул. Богомольця,4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології
ім.О.О.Богомольця НАН України за адресою: 01204, м. Київ, вул. Богомольця,4.

Автореферат розісланий “28” листопада 2002 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
доктор біологічних наук

Сорокіна-Маріна З.О.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Серед важливих задач сучасної біології та медицини, найважливіше місце займає вивчення механізмів регуляції фізіологічних функцій за участю пептидних біорегуляторів, дослідження їх фармакологічної дії, з'ясування ролі у підтримці клітинного гомеостазу, координації процесів біосинтезу, відновлення генетичної інформації (Кузник Б.И., 1999, 2001; Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., 1996-2001; Шатаева Л.К., 2002). З дією білків та пептидів пов'язують сприйняття клітинами еферентних сигналів і шляхи їх реалізації, а також регуляцію механізмів загибелі клітин (Владимирская Е.Б., 2000; Козинец Г.И., 2001]. У зв'язку з цим, особливого значення набувають наукові дослідження, спрямовані на поглиблене вивчення молекулярних аспектів біосинтезу регуляторних пептидів, особливостей фізіологічної дії та кооперативності окремих субстанцій.

В останній час велика увага приділяється коротким (менше 30 амінокислотних залишків) біологічно активним пептидам, які утворюються внаслідок фрагментації гемоглобіну (Blishchenko E.Y., 1997; Пивнык А.В., 2000). До сьогодні з екстрактів різноманітних біологічних тканин вилучено близько 200 ендogenous фрагментів гемоглобіну (Ivanov V.T. et al., 1997). Незважаючи на те, що гемоглобін, головним чином, локалізований в еритроцитах і тому як компонент крові повинен бути присутній в усіх тканинах, його ендogenous фрагментація носить виражений тканинносцифічний характер. В залежності від вихідної тканини фрагменти цього білка складають від 30 до 90% від загального числа пептидів, які ідентифікуються в екстракті. Вміст цих сполук у тканинах досягає десятків нмоль/г, що робить вірогідним можливість реалізації біологічних ефектів, які зареєстровані у модельних тестах. Таким чином, можливо припустити, що роль гемоглобіну як джерела ендogenous біологічно активних пептидів порівнюється по важливості з його загальновідомою функцією переносника кисню, що являє собою безперечний інтерес.

На важливість біологічних функцій фрагментів гемоглобіну вказують і результати ряду робіт, в котрих зазначається, що при деяких патологіях, наприклад, при хворобі Альцгеймера, ішемії мозку щурів, карциномі легень людини спостерігається зміна вмісту окремих фрагментів гемоглобіну в екстрактах відповідних тканин (Пивнык А.В., 2000). Причинно-наслідкові відносини, що обумовлюють цей феномен поки що не встановлені, але припускається, що вони можуть бути пов'язані або з порушенням біохімічних процесів в організмі, або з його захисною реакцією. У будь-якому випадку, вивчення цього явища потребує додаткових досліджень.

В літературі майже не висвітлені питання про утворення біологічно активних пептидів в організмі шляхом обмеженого протеолізу гемоглобіну. Не було спроби виявити біологічну активність цих пептидів в умовах цілісного організму. Залишається нез'ясованим, яку роль відіграють пептидні фрагменти гемоглобіну в перенесенні інформації, необхідної для нормального функціонування, розвитку і взаємодії клітинних популяцій. Тому дослідження впливу пептидних фрагментів гемоглобіну на процеси проліферації, диференціювання та фізіологічної загибелі клітин перспективним для розуміння морфофункціональних змін в системі крові.

Дослідження молекулярних механізмів програмованої загибелі клітин є однією з актуальних проблем сучасної біології (Луцьянова Н.Ю., 2000; Белушкіна Н.Н., 2001; Рябенко В.В., 2002). Складність цієї проблеми вочевидь: не дивлячись на велику кількість експериментальних даних, до теперішнього часу залишаються до кінця не

виявлені механізми регулювання апоптозу окремими клітинами у багатоклітинному організмі. Актуальність цієї проблеми визначається взаємозв'язком порушень регуляції процесу програмованої загибелі клітин з більшістю захворювань. Подальше поглиблення знань про механізми гуморальної регуляції програмованої клітинної загибелі дозволить розробити принципово нові біотехнологічні підходи при лікуванні різноманітних захворювань, пов'язаних з порушенням загибелі клітинних клонів.

На жаль, в Україні у галузі розробки методів корекції процесів апоптозу пептидними біорегуляторами широкомасштабних розробок не проводиться. Тому розуміння відмінностей в механізмах апоптозу та інших клітинних процесів (проліферації та диференціювання) дозволить створити препарати, які мають високу і універсальну ефективність для лікування захворювань системи крові.

Водночас, регуляція функцій клітин залежить від інтенсивності генерації активних форм кисню і потужності антиоксидантного захисту (Середенко М.М., 1998; Тимочко М.Ф., 1999), які чинять вплив на системи гемостазу, імунітету та неспецифічної резистентності організму (Лобань Г.А., 1992; Катрушов О.В., 1995). Вивчення ролі пептидних фрагментів, які утворюються внаслідок протеолітичного процесінгу гемоглобіну у взаємодії між зсіданням крові, перекисним окисленням ліпідів, неспецифічною резистентністю організму, може стати головною передумовою сучасної діагностики і успішного лікування гематологічних захворювань.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом конкурсної теми МОЗ України “Роль дисбалансу пептидергічної системи регуляції в розвитку типових патологічних процесів та шляхи її відновлення інформаційними молекулами поліпептидної природи”, номер держреєстрації 4A01001570P і планової науково-дослідної роботи Центральної науково-дослідної лабораторії (ЦНДЛ) УМСА “Пептидна регуляція процесів апоптозу за участю органних пептидних комплексів, номер держреєстрації 01980002719. Автор є безпосереднім виконавцем фрагмента зазначених досліджень.

Мета дослідження.

Довести участь комплексу пептидних фрагментів, які утворюються внаслідок протеолізу білкових структур гемоглобіну, у підтримці балансу життєвого циклу клітин системи крові (проліферації, диференціюванні та апоптозі) і регуляції процесів перекисного окислення ліпідів, гемостазу, неспецифічної резистентності організму за фізіологічних умов та дії чинників, які впливають на стан системи крові.

Задачі дослідження:

1. Розробити спосіб отримання пептидного комплексу гемоглобіну шляхом ферментативного гідролізу і дати його характеристику за фізико-хімічними властивостями.
2. Вивчити дію комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на гематологічні показники периферичної крові і кісткового мозку, перекисне окислення ліпідів, гемостаз, процеси імунітету за фізіологічних умов.
3. Визначити дію комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на систему крові за умов хронічної свинцевої інтоксикації, отруєнні гемолітичним токсином фенілгідразином, при дії іонізуючої радіації та депресії кровотворення, викликаній введенням цитостатика.
4. Дослідити участь комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну в процесах апоптозу клітин кісткового мозку при станах, викликаних інтоксикацією важкими металами, радіаційним ураженням, мієлодепресією після введення вінбластину.

Об'єкт дослідження - комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну.

Предмет дослідження - фізіологічна активність комплексу пептидних фрагментів

гемоглобіну, яка спрямована на регуляцію гематологічних показників, стану кісткового мозку, перекисного окислення ліпідів, гемостазу та імунітету при дії чинників, що впливають на систему крові.

Методи дослідження. Висунуті завдання вирішувались шляхом проведення хроматографічних методів аналізу для отримання (за власною методикою) та характеристики фізико-хімічних властивостей комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну, дослідження гематологічних, біохімічних, коагулологічних, імунологічних, імуногістохімічних методів з метою оцінки біологічної активності та впливу комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на систему крові при відтворенні експериментальних моделей патології крові.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено спосіб отримання пептидних фрагментів гемоглобіну шляхом ферментативного гідролізу, охарактеризовано його фізико-хімічні властивості.

Вперше проведено комплексне дослідження регуляторної дії комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на гематологічні показники крові і кісткового мозку, перекисне окислення ліпідів, гемостаз, імунітет за фізіологічних умов та під час дії чинників, що моделюють стан системи крові.

Вперше показано, що комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну стимулює процеси проліферації і диференціювання клітин-попередників мієлоїдного та еритроїдного ростків, знижує експресію манозовміщуючих мембранних структур лейкоцитів, стабілізує антиоксидантний гомеостаз та процеси гемокоагуляції, модулює клітинний і гуморальний імунітет при хронічній свинцевій інтоксикації, дії гемолітичної отрути (сірчанокислий фенілгідразин), променевому ураженні та депресії кровотворення. Вперше виявлено механізм підвищення фагоцитарної активності нейтрофілів внаслідок дії комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну за фізіологічних умов та при відтворенні внутрішньосудинного гемолізу.

Вперше в Україні вивчені механізми апоптозу клітин кісткового мозку в умовах експериментальної патології системи крові. Доведено, що комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну гальмує процес апоптозу в клітинах кісткового мозку, впливаючи позитивно на експресію онкопротейну bcl-2 та негативно на експресію ядерного білку p53.

За матеріалами роботи є деклараційний патент України: "Спосіб отримання комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну" № 48685А, від 15.08.2002 р.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані дозволяють теоретично зрозуміти складні процеси розвитку клітин, обміну, реалізації генетичної інформації, управління гомеостазом та метаболізмом, а також використовувати ці знання для розробки принципово нових підходів до профілактики і лікування захворювань системи крові.

Винайдений спосіб екстракції біологічно активних пептидів може бути використаний для створення нових лікарських препаратів. Виявлені системні ефекти комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на організм, зокрема, імуномодулюючі, гіпокоагулюючі, антиоксидантні, дозволяють рекомендувати його для подальшого вивчення з метою створення нових лікарських засобів для лікування розладів системи кровотворення.

Отримані в роботі дані, які доводять позитивний вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на підсилення проліферації клітин кісткового мозку, гальмування апоптозу, можуть бути використані при подальшій розробці лікувальних засобів, зокрема, при апластичній анемії, яка супроводжується активацією загибелі клітин.

Впровадження результатів дослідження. Матеріали дисертації використовуються в навчальному процесі, в методичних розробках і лекційному матеріалі на кафедрах нормальної фізіології Харківського, Львівського, Дніпропетровського медичних

університетів, кафедрах патологічної фізіології, біохімії, мікробіології, вірусології та імунології Української медичної стоматологічної академії.

Особистий внесок здобувача. Дисертація є самостійним дослідженням автора, яким вибрана мета наукового дослідження, обґрунтовані його завдання, проаналізована література з досліджуваної проблеми та проведений патентно-інформаційний пошук. Автор розробив план та програму досліджень, ним особисто проведені експериментальні дослідження, їх статистична обробка, інтерпретація одержаних результатів, обґрунтовані та сформульовані висновки роботи, підготовані наукові праці. Проведення лабораторних аналізів матеріалу здійснені автором на базі кафедри нормальної фізіології та ЦНДЛ Української медичної стоматологічної академії. Розробка та одержання природного поліпептидного біорегулятора здійснювалась спільно з завідуючим ЦНДЛ УМСА д.м.н. Кайдашевим І.П., що відображено в спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації представлені на Міжнародному симпозиумі “Системно-антисистемная регуляція в живій і неживій природі” (Київ, 1993); Міжнародному симпозиумі “Фізіологія і патологія гемостазу” (Симферополь, 1994); науково-практичній конференції “Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини на сучасному рівні” (Полтава, 1996); Міжнародній міжвузівській конференції молодих вчених “Фізіологія і патологія перекисного окислення ліпідів, гемостазу та імуногенезу” (Полтава 1997, 1999); XV з’їзді Українського фізіологічного товариства (Донецьк, 1998); IV Українській науково-практичній конференції з актуальних питань алергології та клінічної імунології (Київ, 1999); науково-практичній конференції “Вчені України - вітчизняній фармації” (Харків, 2000); Міжнародній науково-практичній конференції молодих учених “Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины” (Минск, 2000); Науково-практичній конференції “Історія та сучасні досягнення фізіології в Україні” (Київ, 2001); 1-з’їзді токсикологів України (Київ, 2001), 2-й Міжнародній конференції “Мікроциркуляція та її вікові зміни” (Київ, 2002); Всеукраїнській науковій конференції, присвяченій 160-річчю кафедри фізіології людини і тварин Київського національного університету ім.Тараса Шевченка (Київ, 2002).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 31 наукова праця, а саме, 20 статей у фахових виданнях, затверджених ВАК України, деклараційний патент, 10 тез доповідей на наукових конференціях і з’їздах.

Структура та обсяг дисертаційної роботи. Дисертація викладена на 257 сторінках машинописного тексту та складається з вступу, аналітичного огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, чотирьох розділів власних досліджень, обговорення отриманих результатів, висновків, показника літератури, що включає 348 джерел (з них 186 зарубіжних) та додатку. Робота ілюстрована таблицями (48), рисунками (16) та мікрофотографіями (19).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Для вирішення поставлених задач були проведені експериментальні дослідження на 120 білих статевозрілих щурах лінії Wistar масою 180-200 г. обох статей, 140 мурчаках самцях масою 350-450 г, 30 мишах лінії С 57В1 різної статі масою 20-25 г, крові 30 здорових донорів. Лабораторних тварин утримували в умовах віварію на стандартному раціоні харчування у відповідності з “Санитарними правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)”.

Об’єктами досліджень були кров, плазма, сироватка крові, пунктат кісткового мозку, сеча експериментальних тварин, а також кров здорових донорів.

При проведенні дослідів *in vitro* кров здорових донорів і здорових тварин інкубували з комплексом пептидних фрагментів гемоглобіну в дозах 10; 25; 50 мкг на 1 мл крові при 37° С

на протязі 60 хвилин. Для вивчення дії комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на організм здорових тварин пептидні комплекси вводили в дозах 0,1; 1; 10 мг/кг розчиненими у 0,2 мл фізіологічного розчину, внутрішньом'язово на протязі 7 днів.

Для вирішення поставлених задач були відтворені наступні експериментальні моделі.

Гостру форму фенілгідазинової анемії (Дударев В.П., 1988) у щурів викликали трикратним, через добу, підшкірним введенням 2% водного розчину сірчанокислого фенілгідазину (0,25/100 г). Тварини контрольних груп в усіх серіях отримували ін'єкції 0,2 мл 0,9% апірогенного розчину натрію хлориду. Дослідним тваринам в цій серії вводили внутрішньом'язово комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну в дозі 1 мг/кг маси тіла на добу протягом 7 діб з протективною метою і потім ще 7 діб, паралельно з підшкірним введенням 2% водного розчину сірчаного фенілгідазину.

Хронічну інтоксикацію свинцем відтворювали у мурчаків щоденним (27 днів) введенням per os 4% розчину оцтовокислого свинцю з розрахунку 60 мг/кг маси тіла на добу (Архипова О.Г., 1961). За тиждень до останнього введення розчину оцтовокислого свинцю починали експериментальну терапію комплексом пептидних фрагментів гемоглобіну у дозі 1 мг/кг маси тіла на добу.

Гостру гіпоплазію кровотворення викликали у щурів введенням вінбластину внутрішньочеревинно в дозі 0,1 мг на 100 г маси тіла одноразово (Торубарова Н.А., 1977). Експериментальну терапію комплексом пептидних фрагментів гемоглобіну проводили протягом 7 діб внутрішньом'язовим введенням в дозі 1 мг/кг маси тіла.

При відтворенні патології променевого ураження в експерименті було використане екстракорпоральне опромінення мурчаків жорсткими гама-променями. Джерелом радіоактивного опромінення був ^{60}Co . Опромінення проводилось на устаткуванні "Агат-Р". Тварин цієї серії піддавали одноразовому тотальному опроміненню в дозі 4,5 Гр (ЛД 50/30). Дослідження проводили на 8-у добу, в розпал променевої хвороби (Жербин Е.А., 1989). Контрольній групі тварин після одноразового тотального опромінення в дозі 4,5 Гр внутрішньом'язово вводили 0,2 мл 0,9% апірогенного розчину натрію хлориду. Дослідній групі тварин після одноразового тотального опромінення в дозі 4,5 Гр вводили пептидний комплекс, добутий з гемоглобіну, в дозі 1 мг/кг маси тіла на добу у 0,2 мл фізіологічного розчину на протязі 7 днів після опромінення.

Молекулярну масу пептидів, що входять до складу комплексу, аналізували методом колончатої *гель-фільтрації* (Остерман Л.А., 1985) на акрилексі П-10 (Угорщина), вища межа молекулярної маси молекул, які фільтруються, 10 кД. Вміст білку в пробах визначали за методом Лоурі (Lowry et al., 1951), або за допомогою біуретової реакції (Меньшиков В.В., 1975). Методом *іонної хроматографії* було досліджено спектр природного комплексу, вилученого з гемоглобіну (Остерман Л.А., 1985).

Загальний аналіз крові проводили за стандартними методиками (Козинец Г.И., 1998). Концентрацію *метгемоглобіну* в крові визначали спектрофотометричним методом (по Evelyn et Malloy в модифікації М.С.Кушаковского). *Гемолітичну резистентність еритроцитів* вивчали за допомогою метода Гительсона И.И. і Терскова И.А. (1959). Глюкозо-6-фосфатдегідрогеназу визначали якісним методом (Меньшиков В.В., 1975).

Морфологічне дослідження клітинних елементів крові проводили після забарвлювання мазків периферійної крові за Романовським-Гімзою. Мазки з пунктату кісткового мозку забарвлювали по Папенгейму.

Враховуючи функціональну єдність основних систем резистентності крові було необхідним дослідити показники перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), гемостазу та імунітету.

Вміст первинних продуктів *ПОЛ* (дієнових кон'югатів) визначали у сироватці крові тварин за методом (Воскресенский О.Н., Туманов В.А., 1982), кінцевих продуктів *ПОЛ* (ТБК-активних продуктів) в мембранах еритроцитів із використанням спектрофотометра СФ-46 та спонтанний гемоліз еритроцитів за методом (Владимиров Ю.А., Арчаков А.И., 1972). Супероксиддисмутазну активність (СОД; супероксид: супероксидоксидоредуктаза, КФ1.15.1.1.) еритроцитів за методом (Брусков О.С. и др.1976) в модифікації (Моисеев Н.И., 1989). Каталазну активність (перекис водню: перекис водню оксидоредуктаза, КФ 1.11.1.6.) еритроцитів за методом (Архипова О.Г., 1988). Вміст ліпопротеїнів низької щільності, ліпопротеїнів дуже низької щільності, загальні ліпіди та холестерин сироватки визначали методом (Климова А.Н. и Никульчевой Л.Г., 1984).

Стан системи *гемостазу* та *фібринолізу* оцінювали за часом рекальцифікації, тромбіновим, каоліновим та кефаліновим часом (Балуда В.П., 1980), протромбіновим часом за методом Quick A.J. модифікація (Баркаган Л.З., 1993), активованим частково тромбопластиновим часом за метод Biggs R.M. модифікація (Момот А.П. и др.1997). Антикоагуляційну властивість плазми оцінювали за активністю антитромбіну 111 (АТ111) за методом Hensen A. модифікація (Момот А.П., 1995). Вміст фібриногену в плазмі визначали з використанням стандартних наборів реактивів фірми "Simko" (Львів) за методом (Шелепова Т.М.,1989). Фібриноліз еуглобулінів плазми визначали методом (Андреев В.Г. и др. 1981), етаноловий тест та продукти деградації фібриногену і фібрину оцінювали за методом Breen F.F. в модифікації (Макарова В.А.,1990).

Імунологічні методи досліджень включали підрахунок Т- і В-лімфоцитів, Т-хелперів, Т-супресорів, О-клітин в крові людей за методикою (Лебедева К.А., Понякина И.Д.,1990), визначення імуноглобулінів А, М, G за методикою (Фримель Г.,1987), НСТ-тесту (Нагоев В.С.,1983) та фагоцитарної активності нейтрофілів за методом (Herscowitz H.V.,1981).

Поверхневі глікопротеїди лейкоцитів визначали по методиці лектин-пероксидазного забарвлення в модифікації І.П.Кайдашева і Н.О.Бобрової (1998). Кров тварин стабілізували гепарином, потім інкубували у вологій камері на протязі 2 годин. Після відмивання в забуференому ізотонічному розчині на фіксовані препарати з клітинами наносили конканавалін А (Кон-А) в дозі 30 мг/мл, який мав вуглеводну специфічність до моносахариду - манози, та продовжували інкубацію 30 хвилин. В якості маркера Кон-А використовували пероксидазу хріна ("Reanal", Угорщина). Після інкубації активність пероксидази виявляли за допомогою реакції з 3,3-діамінобензидіна тетрагідрохлоридом ("Chemapol", Чехія). Ядра дофарбовували в розчині сафраніну. Ступінь експресії манозовміщуючих мембранних структур (МВМС) оцінювали за допомогою середнього цитохімічного коефіцієнту для лімфоцитів та нейтрофілів окремо.

Імуногістохімічне дослідження антигенів bcl-2 та p 53 проводили з використанням моноклональних антитіл (Глузман Д.Ф., 1993). Імуногістохімічний метод дозволяє зберегти клітинну структуру і вивчити тонку локалізацію продукту в апоптозних клітинах. Дослідження проводили на парафінових зрізах авідін-біотинним методом з попереднім видаленням парафіну. Метод заснований на спорідненості вітаміну Н (біотину) до глікопротеїну з молекулярною масою 68 кД - авідіну. В якості перших антитіл використовували моноклональні антитіла до bcl-2 та p 53 ("Dako" N-Series Mouse ANTI-HUMAN bcl-2 oncoprotein,124) відповідно. В якості других антитіл використовували біотилізовані антитіла козла до імуноглобулінів миші ("Sigma" Anti-Mouse Immunoglobulins Biotin Conjugate). Для зв'язування біотину використовували треті антитіла ExtrAvidin Peroxidase Conjugate "Sigma". Для цитохімічного визначення активності пероксидази, зрізи відмивали та інкубували в розчині хромогену діамінобензидіну, дофарбовували ядра 2% розчином метилового

зеленого та заключали в бальзам. В контрольних реакціях на зрізи замість перших антитіл наносили Negative Control "Dako". Результати реакцій оцінювали якісним методом.

Фрагментацію ДНК виявляли шляхом електрофорезу в агаровому гелі. ДНК вилучали за методом Мах Е.Е. (1992). Відмиті клітини кісткового мозку ресуспензували в 1,58 мл ТЕ-буферу 10mM тріс-НСl (рН 8,0/10mM ЕДТА). Зразки заморожували при -20°C, потім розморожували і додавали 20 мкл протеїнкінази К (10 мг/мл), інкубували 5 годин при 37°C. Для екстракції зразків додавали 2 мл забуференого фенола, потім центрифугували 5 хвилин при 4000 об/хв. при кімнатній температурі, додавали 5 мл 95% етанолу, перемішували, залишали на 10 хвилин при кімнатній температурі, знову центрифугували 10 хвилин при кімнатній температурі. Ресуспензію проводили в 70% етанолі, центрифугували 5 хвилин, осад висушували сухим повітрям. Для розчинення ДНК додавали 50 мкл ТЕ-буферу і інкубували ніч при 40°C. ДНК розділяли в 1,8% агарозі упродовж 2,5 год при $U=5$ В/см. Після пофарбування етідіумом бромідом гель фотографували в ультрафіолеті.

Матеріали, отримані під час дослідження, аналізувалися за допомогою персонального комп'ютера IBM Pentium з використанням системи керування базами даних і статистичною програмою Microsoft Excel для Windows 95. Проводили обчислення середньої арифметичної, середньоквадратичного відхилення, помилки середньої арифметичної, вірогідність отриманих результатів за коефіцієнтом Ст'юдента, коефіцієнтів кореляції. Зміни показників вважали вірогідними при $p<0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У відповідності з задачами роботи нами було розроблено метод отримання біологічно-активних речовин шляхом протеолітичного гідролізу гемоглобіну. Екстракцію гідролізату проводили органічною галогенвміщуючою кислотою в присутності двовалентних катіонів з наступною преципітацією пептидних речовин та їх очищенням.

Отриманий екстракт давав позитивну біуретову реакцію, мав спектр поглинання в УФ-області з максимумом 210-220 нм, характерний для пептидного зв'язку. Під час гель-хроматографії виявлено чотири основні фракції від 4 до 10 кДа. Аналіз іонообмінної хроматограми виявив шість основних фракцій. Таким чином, розроблений нами метод дає можливість отримати природні пептидні комплекси, достатньо простий, не потребує великих фінансів.

Дослідження *in vitro* біологічної активності комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну виявило, що він не впливав на процеси перекисного окислення ліпідів, активність фізіологічної антиоксидантної системи, але мав здатність впливати на процеси обмеженого протеолізу в системі зсідання крові. Виявлена нами активація зовнішнього шляху зсідання крові може бути пов'язана з підсиленням дії факторів Ха, Х11а, Х1а, калікреїну, плазміну. Посилення фібринолітичних властивостей плазми після 60 хвилин інкубації крові з комплексом пептидних фрагментів гемоглобіну, можливо, пов'язано з активацією проактиваторів і активаторів плазміногену, які являють собою серинові протеази (Гарська Н.А. і співавт., 2000). Звертає на себе увагу, що пептидний комплекс гемоглобіну володів імуномодулюючими властивостями. Додавання в донорську кров комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну викликало підвищення відсотку В-лімфоцитів (на 37,0 %, $p<0,01$), збільшувало кількість теофілін-резистентних клітин (на 27,0%, $p<0,05$), а також знижувало ступінь експресії МВМС лімфоцитів та поліморфноядерних лейкоцитів. Відомо, що Кон-А специфічно взаємодіє з вуглеводними залишками (D-манозою)

рецепторних білків клітинної поверхні (Луцик А.Д.,1989). Мабуть, пептидний комплекс гемоглобіну конкурентно взаємодіє з лектинами при зв'язуванні з мембраною лімфоцитів та нейтрофілів. Можливо, активні центри пептидного комплексу гемоглобіну блокують частину рецепторів, з якими взаємодіє конканавалін-А.

Надалі нами була досліджена біологічна активність комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну під час введення здоровим тваринам. Внутрішньом'язове введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну збільшувало час перебігу процесів деполаризації і реполаризації по шлуночках міокарду та швидкість проведення імпульсів зорової модальності по аферентних системах підкоркових та коркових відділів зорового аналізатора, що свідчило про активацію неспецифічних лімбікоретикулярних аферентних систем.

Введення препарату тваринам не викликало розвитку реакцій гіперчутливості негайного типу, введення разом з повним ад'ювантом Фрейда також практично не викликало сенсibilізації. Отже, пептидний комплекс гемоглобіну виявляв слабкі антигенні властивості.

В периферичній крові найбільші зміни нами відмічено у тварин, яким вводили комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну в дозі 1 мг/кг: підвищення кількості гемоглобіну на 30,0% ($p < 0,01$), поліморфноядерних лейкоцитів на 37,0% ($p < 0,05$), фагоцитарної активності нейтрофілів на 48,0% ($p < 0,01$), зниження експресії манозовміщуючих мембранних структур в лімфоцитах і нейтрофілах у 2,6 рази ($p < 0,05$) та 1,7 рази ($p < 0,05$) відповідно. В мієлограмі відмічено посилення розвитку еритробластних елементів на стадії пронормобластів, базофільних та поліхроматофільних нормобластів, стимуляція процесів проліферації клітин гранулоцитарного ряду, переважно мієлобластів та промієлоцитів, гальмування мітозу на стадії мієлоцитів з послідуєчим пригніченням процесів дозрівання паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів (рис.1).

Звертає на себе увагу стан вільнорадикального окислення у тварин, яким вводили комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну. Нами відмічено зростання концентрації головного антиоксиданту плазми церулоплазміну у 1,4 рази ($p < 0,01$). Аналіз показників коагуляційної ланки плазми крові показав розвиток гіпокоагуляції при введенні пептиду в дозі 1 мг/кг.

Наведені вище спостереження спонукали нас змодельовати процес пошкодження кісткового мозку та системи крові взагалі і дослідити вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну під час патологічних станів.

Відповідно з загальнобіологічним законом регенерації тканин, який був відкритий акад.О.О.Богомольцем, стереотипною реакцією адаптації системи крові у відповідь на дію екстремальних факторів є посилення руйнування еритроцитів напередодні активації анаболічних процесів не тільки еритроїдної ланки кісткового мозку, а й інших тканин (Козинец Г.И. и соавт., 1997). Нами була відтворена гемолітична анемія внаслідок інтоксикації сірчаноокислим фенілгідразином, яка супроводжувалась внутрішньосудинним гемолізом.

Дія хімічного окислювача фенілгідразину приводила до руйнування зрілих еритроцитів, анізо-пойкілоцитозу, мікроцитозу та порушення гемоглобінсинтетичних процесів в еритроні. В кровотік надходили якісно неповноцінні еритроцити, які характеризувалися зниженим енергетичним потенціалом (зменшення вмісту глюкозо-6-фосфатдегідрогенази в еритроцитах). Відомо, що дефіцит глюкозо-6-фосфатдегідрогенази приводить до недостатності утворення НАДФН₂, який потрібен

для відновлення глутатіону (Мещинен І.Ф. і співавт., 1994), внаслідок чого еритроцити втрачають здатність протистояти токсичній дії фенілгідразину.

Підвищення в сироватці крові контрольних тварин вмісту загального білірубіну (за рахунок концентрації непрямого білірубіну) свідчило на користь посиленого гемолізу еритроцитів (Давыдов А.А. и соавт., 1998). Спостерігався прямий кореляційний зв'язок концентрації загального білірубіну та концентрації церулоплазміну ($r=0,87$; $p<0,05$), концентрації непрямого білірубіну і приросту малонового діальдегіду під час інкубації еритроцитів ($r=0,89$; $p<0,05$). Підтвердженням стимулюючого впливу продуктів розпаду еритроцитів на еритропоез є посилення еритронормобластної реакції з підвищенням числа поліхроматофільних нормобластів у 2,8 рази ($p<0,01$) у контрольній групі тварин. В мієлоїдному ростку зменшувався відсоток мієлобластів у 2,7 рази ($p<0,05$), паличкоядерних нейтрофілів у 1,3 рази ($p<0,05$), тоді як відсоток мієлоцитів вірогідно зростав у 1,2 рази ($p<0,05$). Тобто гальмування мітозу йшло на стадії переходу мієлоцитів у метамієлоцити, з послідовним інгібуванням дозрівання паличкоядерних нейтрофілів і наступним зниженням фагоцитарної активності нейтрофілів в периферичній крові у 1,2 рази ($p<0,05$). Встановлені кореляції між здатністю поліморфноядерних лейкоцитів відновлювати нітросиній тетразолій і початковою концентрацією продуктів, які реагують з тіобарбітуровою кислотою ($r=0,95$; $p<0,05$).

Отруєння сірчанокислим фенілгідразинном приводило до активації перекисного окислення ліпідів, в тому числі і ліпідів мембран еритроцитів з накопиченням МДА та зниженням активності супероксиддисмутази у 1,5 рази ($p<0,01$).

Використання Кон-А, лектину, реагуючого з моносахаридним кінцевим залишком D-манози, виявило вірогідне зниження кількості місць його зв'язування у лімфоцитах та нейтрофілах контрольної групи тварин. Привертає увагу той факт, що лімфоцити і нейтрофіли відповідали на стимули ідентично. Тобто введення гемолітичного токсину приводило до зменшення кількості рецепторів до лектину на поверхні лімфоцитів та нейтрофілів.

В системі зсідання крові виявлені зміни, які вказували на наявність процесу гіперкоагуляції (скорочення часу рекальцифікації у 1,2 рази ($p<0,05$), тромбінового часу у 1,3 рази ($p<0,05$)). Посилення процесів зсідання крові можливо і при активації прокоагулянтних властивостей еритроцитів (Мищенко В.П., 1998). І.Я.Ашкіназі (1977) показано залежність включення тромбопластинового фактору еритроцитів у процес гемокоагуляції від змін динамічних властивостей мембрани. Розглянуті вище дослідження показали, що зміни еритроцитів при дії сірчанокислого фенілгідразину зачіпають структурну перебудову мембрани клітин, відбуваються конформаційні зміни мембранних молекул, порушення роботи ферментних систем еритроцитів, що вказує на причетність еритроцитів до процесів зсідання крові.

Для корекції змін системи крові, викликані отруєнням сірчанокислим фенілгідразинном, дослідним тваринам вводили внутрішньом'язово комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну. Процеси синтезу гемоглобіну у дослідних тварин залишались на рівні контрольної групи тварин, але відновлення вмісту глюкозо-6-фосфатдегідрогенази вказувало на нормалізацію енергетичного потенціалу еритроцитів.

Введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну приводило до зменшення кількості мікросфероцитів, зростання відсотку нормохромних еритроцитів, зниження кількості ретикулоцитів у периферичній крові у 1,5 рази ($p<0,05$).

В мієлоїдному ряді червоного кісткового мозку під впливом комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну зменшувався відсоток промієлоцитів (на 41,7% $p<0,05$), мієлоцитів (на 39,7% $p<0,05$), тоді як відсоток метамієлоцитів зростав у 1,6 рази

($p < 0,05$). У крові кількість паличкоядерних нейтрофілів зменшувалась на 50,0% ($p < 0,05$), а кількість лімфоцитів зростала на 17,0% ($p < 0,05$). Таким чином, гальмування мітозу проходило на стадії метамієлоцитів з наступним порушенням спеціалізації та диференціювання нейтрофілів.

Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну знижував значення НСТ-тесту і нормалізував величини фагоцитарного індексу нейтрофілів ($62,6 \pm 1,54\%$ у дослідних тварин, проти $55,8 \pm 2,69\%$ у контрольних тварин, $p < 0,05$). Дослідження взаємодії регуляторного комплексу з рецепторними білками клітинної поверхні лейкоцитів показало, що його застосування приводило до зниження експресії манозовміщуючих мембранних структур лімфоцитів на 57,4% ($p < 0,05$) і поліморфноядерних лейкоцитів на 24,8 % ($p < 0,01$) (рис.2).

Пептидний комплекс гемоглобіну гальмував розвиток гіперкоагуляції. Про це свідчило подовження часу рекальцифікації в 1,2 рази ($p < 0,05$), тромбінового часу в 1,5 рази ($p < 0,05$). Можливо, пептидні фрагменти гемоглобіну блокують реакції обмеженого протеолізу та запобігають перетворенню проензимів в ензими і тим самим гальмують зовнішній шлях зсідання крові.

Враховуючи стимулюючу дію комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на репарацію крові і його вплив на процеси проліферації і диференціювання клітин кісткового мозку, нам було цікаво відтворити експериментальну модель, при якій відбувалось пошкодження синтезу порфіринів і гему. Нами була обрана модель хронічної інтоксикації солями свинцю. Солі свинцю, як і деяких інших металів, відносяться до канцерогенних і токсичних речовин. Зі стрес-індукованою дією свинцю пов'язують експресію генів металотіонеїнів, які можуть запобігати як некрозу, так і апоптозу (Кудрин А.В., 1998).

Проведені нами імуноцитохімічні дослідження дали змогу встановити особливості експресії і локалізації в тканинах кісткового мозку біомолекулярних маркерів апоптозу. Рівень експресії *vc1-2* в клітинах кісткового мозку тварин, що отримували розчин свинцю, був нижче на 16,4% ($p < 0,05$), а експресія білка *p53* зростала на 61,4% ($p < 0,05$) відносно інтактної групи тварин. Відомо, що продукція клітинами організму природного типу білка *p53* є стимулятором "програмованої смерті" (Белушкина Н.Н. і соавт., 2001). За даними А.В.Лихтенштейн (1998), пошкодження ДНК призводить до збільшення вмісту *p53* (головним чином, за рахунок посттранскрипційної регуляції) і індукції апоптозу. За умов ушкодження солями свинцю нами були визначені зміни в структурі ДНК, нуклеосомній організації хроматину. Виявлене методом електрофорезу збільшення фрагментації ДНК може свідчити про те, що іони свинцю сприяють міжнуклеосомному розщепленню ДНК клітин кісткового мозку.

Наші дослідження підтвердили, що серед патогенетичних механізмів свинцевої інтоксикації провідне місце належить порушенням біосинтезу порфіринів та гема (нами виявлено збільшення вмісту копропорфірину в сечі тварин в 3,7 рази ($p < 0,05$), рівня метгемоглобіну в еритроцитах в 1,6 рази ($p < 0,05$). Порушення утилізації заліза приводило до появи сидероцитів та еритроцитів з базофільною зернистістю. Імовірно, при дефіциті заліза в результаті зниження активності залізо залежних ферментів, які забезпечують антиоксидантний захист гемоглобіну, гем виявляється недостатньо захищеним, з'являються умови для впливу ряду окислювачів на гемове залізо та його перетворення з двох у тривалентний стан. Поряд зі збільшенням вмісту метгемоглобіну нами відмічено зниження кількості гемоглобіну в еритроцитах тварин після хронічного впливу свинцю. Певно, дефект синтезу гема йде на етапі приєднання заліза до протопорфірину, наслідком чого є накопичення невикористаного заліза в цитоплазмі еритробластів (Мошинська О.В., 1997). В кістковому мозку ми відмітили гальмування мітозу базофільних та поліхроматофільних нормобластів. В мієлоїдному

ростку відмічено порушення процесів спеціалізації та диференціювання паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів з наступним гальмуванням дозрівання паличкоядерних форм у сегментоядерні.

Дослідження останніх років у галузі біохімічної токсикології дозволили зробити висновок, що в основі розвитку молекулярної патології клітини при дії ксенобіотиків і важких металів, зокрема свинцю, лежить утворення вільних радикалів різної хімічної природи (Губський Ю.І., 1993, 1999). Вільно-радикальні продукти біотрансформації ксенобіотика викликають мутагенні та інші генотоксичні ефекти та суттєво впливають на процеси експресії регуляторних генів, що було нами підтверджено збільшенням деградації ядерної ДНК клітин кісткового мозку.

Свинцева інтоксикація сприяє пошкодженню ліпідного матриксу біомембран за рахунок утворення перекисних молекулярних продуктів поліненасичених ацилів (нами відмічено підвищення приросту МДА у 3,8 рази, $p < 0,01$ за час інкубації еритроцитів в залізо-аскорбатному буфері.). Позитивна кореляційна залежність встановлена між рівнем накопичення МДА за час інкубації еритроцитів та кількістю сидероцитів у крові ($r=0,96$; $p < 0,05$). Крім того, встановлені кореляції між кількістю лімфоцитів у кістковому мозку ($r=0,93$; $p < 0,05$) та накопиченням МДА, перекисною резистентністю еритроцитів та швидкістю їх осідання ($r=0,89$; $p < 0,05$). Наступним джерелом активних форм кисню в еритроцитах є продукція перекису водню супероксиддисмутазою в умовах підвищення активності цього субстратіндуцибельного ферменту (Цебржинский О.И., 1992) при зниженні у 1,4 рази ($p < 0,05$) активності гемвісткої каталази.

При свинцевій інтоксикації нами виявлено зниження фагоцитарної активності у 1,5 рази ($p < 0,01$), що вказує на функціональну недостатність нейтрофілів. Послаблення прояву дихального вибуху нейтрофілів можливо пов'язати з недостатністю активності цитохрому b 245 (НАДФН-оксидази) внаслідок гальмування іоном двохвалентного свинцю синтезу гема. Таким чином, при свинцевій інтоксикації оксидативна активність нейтрофілів не є джерелом активних форм кисню, що ініціює пероксидацію у крові.

Порушення початкової асиметрії фосфоліпідного складу клітинних мембран, придбання ними гетерофазної структури перетворює їх в матриці для активації факторів зсідання крові. Нами відмічена гіперкоагулемічна реакція після хронічного введення солей свинцю. Скорочення часу рекальціфікації у 1,2 рази, ($p < 0,05$), протромбінового часу у 1,3 рази, ($p < 0,05$), що можливо, пов'язано з посиленням активності VII-го плазменного фактору.

Внутрішньом'язове введення тваринам комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну за умов розвитку експериментальної свинцевої інтоксикації прискорювало відновлення морфологічної картини крові: були відсутні еритроцити з базофільною зернистістю, нормалізувалась кількість сидероцитів ($0,36 \pm 0,07\%$ у дослідних тварин проти $3,90 \pm 0,07\%$ у контрольних тварин, $p < 0,01$). Застосування комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну сприяло збільшенню швидкості оновлення еритроїдних елементів кісткового мозку з посиленням виходом в кровоток більш стійких еритроцитів, на що вказували дані еритрограми (рис.3).

Збільшення молодих клітин еритроїдного ряду може свідчити про наявність сильної стимуляції процесів проліферації клітин і вказувати на посилення еритропоезу. Так, у червоному кістковому мозку у 8,4 рази ($p < 0,01$) зростав відсоток базофільних та у 32,2 рази ($p < 0,01$) поліхроматофільних нормобластів, на 40,0% ($p < 0,01$) знижувався відсоток паличкоядерних нейтрофілів. Тобто затримка лейкопоезу проходила на рівні паличкоядерних форм, тоді як вихід сегментоядерних форм нейтрофілів у кров

збільшувався.

Застосування комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну приводило до помітного зниження числа апоптозних клітин та зменшення олігонуклеосомної фрагментації ДНК клітин кісткового мозку, наслідком чого може бути покращення гематологічних показників, так як гемопоетичні клітини мають змогу зберігати нормальну тривалість життя. У тварин, яким поряд з розчином оцтовокислого свинцю вводили комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну, відносно контролю збільшився відсоток клітин з маркером апоптозу bcl-2 на 11,88% ($p < 0,01$), а вміст онкопротеїну p53 в ядрах клітин кісткового мозку зменшився на 20,6% ($p < 0,01$). Посилена експресія bcl-2 здатна усувати загибель клітин шляхом апоптозу і модулювати p53-індукований апоптоз (Ревской С.Ю., 2001). Можливо, пептидний комплекс гемоглобіну є сигналом, який супресує апоптотичні зміни в клітинах кісткового мозку. Ці зміни можуть проходити за допомогою протеїнів-посередників, які передають сигнал на цитоплазматичний каспазний каскад. Не виключено, що комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну, блокує протеазний каскад, гальмує активацію мітохондрій та підвищення концентрації Ca^{++} в клітині (підвищена експресія bcl-2 приводить до усунення градуальної втрати Ca^{++} з ретикулума і накопичення його в мітохондріях), накопичення супероксид-аніонів та ферментів, які приймають участь в процесі апоптозу. В свою чергу, комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну, можливо, запобігав активації ендонуклеаз, які відповідальні за розщеплення ядерної ДНК.

Подальші дослідження продемонстрували, що пептидний комплекс, отриманий шляхом ферментативного гідролізу гемоглобіну, сприяв нормалізації фагоцитарної активності нейтрофілів ($39,5 \pm 2,02$ % у дослідних тварин проти $26,25 \pm 0,76$ % у контрольних тварин, $p < 0,01$) та активності супероксиддисмутази еритроцитів. Зниження активності продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою, до інкубації крові вказують на ослаблення пероксидації, мабуть за рахунок молодих та стабільних еритроцитів. Спостерігався зворотний взаємозв'язок між кількістю еритробластів та початковою концентрацією продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою ($r = -0,95$; $p < 0,05$), активністю каталази еритроцитів та кількістю сидероцитів в периферичній крові ($r = -0,93$; $p < 0,05$). В свою чергу, запобігання пошкодження ліпідних компонентів мембран може бути пов'язано з підвищенням експресії bcl-2 у тварин, які одержували комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну. Sandau K.B. (2000) показано, що надекспресія гену bcl-2 повністю гальмує пероксидацію ліпідів та процеси фрагментації ДНК. Отже, комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну під час введення тваринам за умов свинцевої інтоксикації прискорював розвиток компенсаційно-приспосувальних реакцій в периферичній крові, регенерацію еритроїдних елементів кісткового мозку, сприяв терапевтичному пригніченню апоптозу.

Враховуючи здатність комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну впливати на процеси проліферації, диференціювання, механізми клітинної смерті, нормалізацію фагоцитарної активності нейтрофілів, ми вирішили оцінити його радіопротекторний ефект на систему крові в умовах екстракорпорального гама-опромінення тварин.

Нами показано, що кістковий мозок тварин після гострого сублетального опромінення на 8-му добу знаходився в стані аплазії. Клітинний склад був представлений, головним чином, стромальними елементами, плазматичними клітинами і поодинокими полінуклеарними лейкоцитами. Спустошення кісткового мозку супроводжувалось некробіозом кровотворних елементів, який, як дозволили встановити використані нами методи, протікав шляхом апоптозу. Важливим патологічним феноменом в

картині променевого ураження кісткового мозку є пригнічення мітотичної активності мієлокаріоцитів за рахунок майже повного зникнення мієлобластів, мієлоцитів ($1,8 \pm 0,58\%$ у контрольних тварин проти $11,2 \pm 0,86\%$ у інтактних тварин, $p < 0,01$) та метамієлоцитів ($3,33 \pm 0,56\%$ у контрольних тварин проти $12,2 \pm 0,97\%$ у інтактних тварин, $p < 0,01$). Затримка клітинного поділу проліферуючих форм на строк від декілька годин до декількох діб, з послідуєчим поступовим відновленням до субнормальних показників відмічена Журбіним Є.О. із співавт. (1989). Радіаційна блокада мітотичної активності, можливо, пов'язана з пошкодженням генетичного апарату клітин, про що свідчила виявлена нами фрагментація ДНК у вигляді “драбини”. В свою чергу, Шмаров Д.А. і співавт. (1995) показали, що при дії іонізуючого випромінювання проліферуючі клітини не розпочинають синтез ДНК і не переходять до мітозу. Вони блокуються в G₁ фазі в R-точці чи у G₂-фазі, в точці, яка готує мітоз до ініціації. Затримка проходження до мітозу в присутності пошкодженої ДНК дає можливість репаративним ферментам відновити структуру гнома (Шмаров Д.А. і соавт., 1996).

В останній час встановлено, що поряд із системою контролю клітинної проліферації, що діє за фізіологічних умов, є механізми, які забезпечують реакцію клітин на дію іонізуючої радіації, що викликає пошкодження ДНК (Погорелов В.М. і соавт., 1995). При цьому виявилось, що процеси затримки у G₁ і G₂ фазах клітинного циклу пов'язані з ініціацією клітинного апоптозу. Вважають, що ключова роль в контролі проліферації клітин і їх реакції на пошкодження ДНК належить білку p53 (Романенко А.М., 1999).

Проведені нами імуноцитохімічні дослідження протеїну p53 у опромінених тварин виявили посилення експресії цього білка в клітинах кісткового мозку в 1,6 рази ($p < 0,05$). Наявність пошкоджень ДНК в цих клітинах позитивно корелювала з експресією білка p53. Відомо, що протеїн p53 інгібує процеси проліферації при наявності пошкоджень ДНК шляхом блокування комплексів “циклін-циклінзалежних кіназ” (Лукьянова Н.Ю. і соавт., 2000). Клітини з незначним пошкодженням ДНК після затримки у R-точці (G₁-блок) і після завершення репарації потрапляють у S-фазу. Якщо пошкодження геному значні, клітини підлягають p53-залежному апоптозу. Проведений аналіз дозволив констатувати зв'язок між апоптозом і експресією онкобілка *bcl-2*, який заважає старінню і смерті клітин (Perillo V. et al., 2000). В гемопоетичних клітинах тварин, які підлягали опроміненню в сублетальній дозі, нами відмічено зменшення кількості *bcl-2*-позитивних клітин на 45,2% ($p < 0,05$). Пригнічення активності цього гену після іонізуючого опромінення відмічена і іншими авторами (Гарькавцева Р.Ф. і соавт., 1999).

За сучасними уявленнями, дія іонізуючого опромінення супроводжується утворенням вільних радикалів (Григлевски Р.Е., 1997).

При променевому пошкодженні в сублетальній дозі нами відмічено зростання первинних та вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) в крові у 1,3 рази ($p < 0,05$) і у 5,0 разів ($p < 0,01$) відповідно, зниження перекисної резистентності еритроцитів на 58,0% ($p < 0,05$). Зростання інтенсивності ПОЛ в крові сублетально опромінених тварин слід розглядати як природний результат появи в опромінену організм, головним чином, у водній фазі великої кількості окислювальних радикалів і перекисей, які володіють каталітичною активністю і стимулюють процес ПОЛ (Барабой В.А., 1991). В свою чергу, збільшення вмісту активних форм кисню (АФК) в клітині призводить до зміни фосфорилування по тирозину цілого спектру білків, що може опосередковувати дію АФК на різні сигналопередаючі системи, які приймають

участь в активації апоптозу (Giatromalaki A. et al., 1998). Поява надлишку АФК призводить також до формування окислених ліпідів (поліненасичених жирних кислот та холестерину), клітинних мембран, які здатні посилювати апоптоз (Forrest V.J. et al., 1994). За даними кореляційного аналізу встановлена роль вільнорадикального окислення ліпідів у розвитку гематологічного синдрому променевої хвороби. Виявлено зворотний кореляційний зв'язок між кількістю лімфоцитів в крові та концентрацією продуктів, які реагують з тіобарбітуровою кислотою ($r=-0,95$; $p<0,05$), прямий кореляційний зв'язок між кількістю моноцитів в крові та рівнем дієнових кон'югатів у сироватці крові ($r=0,98$; $p<0,01$), сегментоядерними нейтрофілами кісткового мозку та активністю СОД еритроцитів ($r=0,90$; $p<0,05$).

У опромінених тварин відмічалось зниження фагоцитарних функцій нейтрофілів на 13,7%, ($p<0,01$) на фоні нейтропенії та появи у кістковому мозку і периферичній крові так званих гігантських нейтрофілів. За даними Жербина Є.О. і співавт. (1989), цей феномен є дозозалежним і пов'язаним з аномаліями процесів поділу зріючих мієлоїдних елементів гемопоетичних тканин. Відомо, що гранулоцити дуже чутливі до дії продуктів тканинної деструкції та хемотаксичних речовин, які утворюються в тканинах при дії іонізуючого опромінення (Тимочко М.Ф. і співавт., 1999).

В коагуляційній ланці гемостазу при гострому гама-опроміненні в сублетальній дозі ми відмічали подовженням часу рекальцифікації на 41,3% ($p<0,01$), тромбінового часу на 24,2% ($p<0,01$). Виявлене збільшення тромбінового часу вказувало на наявність порушень кінцевої фази зсідання крові і може бути пов'язано з підвищенням антитромбінової активності плазми у 1,5 рази ($p<0,01$).

Важливим показником радіопротекторного ефекту пептидного комплексу гемоглобіну стала здатність тварин виживати після опромінення жорсткими гама-променями в сублетальній дозі. Смертність в дослідній групі тварин складала 12%, тоді як в контрольній групі тварин загинуло 25% тварин.

Кістковий мозок тварин, які отримували пептидний комплекс гемоглобіну, після гострого сублетального опромінення виявляв деякі ознаки відновлення мієлоїдного ряду. Морфологічно зростала клітинність кісткового мозку з осередками клітин гранулоцитарного ряду, при цьому в клітинах кісткового мозку знижувалася ступінь фрагментації ДНК і відсоток клітин з маркерами апоптозу. Можливо, ендонуклеазна активність, яка каталізує початкову стадію деградації ДНК, інгібувалася дією пептидних фрагментів гемоглобіну. Підвищення експресії *vc1-2* на 83,0 % ($p<0,05$) в клітинах кісткового мозку після введення тваринам пептидних фрагментів гемоглобіну збільшувало резистентність клітин до багатьох ініціаторів апоптозу, що може мати терапевтичну дію. Так, ряд гемопоетичних ростових факторів в теперішній час використовуються в клінічній практиці після застосування променевої терапії для збільшення кількості клітин крові і запобігання розвитку анемії (Казначеев К.С., 1999). Відомо, що розвиток апластичної анемії може бути пов'язаний з дією іонізуючого опромінення. При цьому встановлено, що іонізуюче опромінення є потенціальним апоптогеном, а *vc1-2*, блокуючи деградацію ДНК, запобігає посиленню апоптозу (Hsu V. et al., 1994).

Застосування комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну у опромінених тварин в сублетальній дозі зменшувало кількість клітин з маркером протеїна *p53* у 2,3 рази ($p<0,05$). Можливо, пептидний комплекс впливає на активність протеаз в ядрі і протеоліз ядерних білків. Суттєве зниження кількості апоптозних клітин покращувало гемопоетичні показники і надавало можливість зберігати нормальну тривалість життя клітинам.

Таким чином, пептидний комплекс гемоглобіну можна віднести до препаратів, які

збільшують кількість клітин гранулоцитарного ряду не тільки за рахунок проліферації, а й за рахунок блоку апоптозу.

В мієлограмі тварин, які отримували комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну, зростала у 2,2 рази ($p < 0,05$) кількість мієлоцитів, у 1,6 рази ($p < 0,05$) моноцитів та знижувалась кількість паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів на 37,5% ($p < 0,05$) і 50,0% ($p < 0,05$) відповідно. Тобто посилювалися процеси проліферації мієлоїдних клітин та відмічалася затримка дозрівання метамієлоцитарного ряду у паличкоядерні і сегментоядерні форми. Також, введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну опроміненим тваринам посилювало фагоцитарні властивості нейтрофілів у 1,6 рази ($p < 0,01$) та нормалізувало їх здатність відновлювати нітросиній тетразолій. У периферичній крові в порівнянні з контролем у 8,0 разів ($p < 0,01$) зростала кількість сегментоядерних нейтрофілів та у 1,3 рази ($p < 0,01$) вміст лімфоцитів. Таким чином, пептидні фрагменти гемоглобіну впливали на спеціалізацію та вихід клітин гранулоцитарного ряду з депо кісткового мозку, прискорювали процеси проліферації.

В еритроїдному ряді червоного кісткового мозку під впливом комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну знизився відсоток базофільних нормобластів у 3,3 рази ($p < 0,05$) та підвищився відсоток поліхроматофільних нормобластів у 1,9 рази ($p < 0,05$). Тобто затримка еритропоезу проходила на рівні базофільних нормобластів з посиленням дозрівання поліхроматофільних нормобластів. У периферичній крові при постійній кількості еритроцитів збільшувався в порівнянні з нормою та контролем кольоровий показник еритроцитів. При введенні препарату в кровотоці відмічалась наявність більш стійких до дії солянокислого і перекисного гемолітика молодих форм еритроцитів. Встановлені кореляції між часом руйнування найбільш стійких еритроцитів при дії соляної кислоти та фагоцитарної активності нейтрофільних лейкоцитів ($r = 0,93$; $p < 0,05$) вказували на відповідну роль процесів перекисного окислення ліпідів при променевому пошкодженні організму.

Пептидний комплекс гемоглобіну зменшував рівень накопичення ТБК-активних продуктів в процесі 1,5 годинної інкубації еритроцитів в умовах залізо-аскорбатного буфера у 1,5 рази ($p < 0,05$), можливо, за рахунок зниження кисеньутворюючої функції нейтрофілів. За фізіологічних умов відмічена значна позитивна кореляція активності нейтрофілів і накопичення ацилгідроперекисей в мембранах еритроцитів (Мищенко В.П. и соавт., 1990). Тобто введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну гальмувало розвиток вільнорадикальних реакцій в крові опромінених тварин, нормалізувало коагуляційний потенціал крові. Виявлено кореляцію між рівнем СОД еритроцитів та тромбіновим часом ($r = 0,89$; $p < 0,05$), рівнем накопичення МДА за час інкубації еритроцитів та вмістом антитромбіну-III у плазмі ($r = 0,85$; $p < 0,05$). В коагуляційній ланці гемостазу ми відмічали скорочення часу рекальціфікації у 1,2 рази ($p < 0,05$), тромбінового часу у 1,6 рази ($p < 0,01$) з деяким зниженням вмісту антитромбіну III. Виходячи з того, що процес зсідання крові являє собою складний багатокомпонентний захисний механізм, в якому приймають участь клітинні та гуморальні фактори (Бышевский А.Ш., 1993), зміни, які ми спостерігали, можливо, пов'язані з активацією процесів фагоцитозу. Відомо, що в період активного фагоцитозу, моноцити продукують фактор прокоагулянтної активності значно сильніший, ніж у інтактних клітин (Jaffe E.A. et al., 1985). Продукція моноцитів у кістковому мозку під впливом комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну зростала на 65,7% ($p < 0,05$). В свою чергу, ці клітини здатні виробляти вітамін-К-залежні фактори, активатор фактору X (Кузник Б.И. и соавт., 2001), що також сприяє посиленню процесів зсідання крові.

Таким чином, комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну відновлював адекватність реакцій системи гемостазу при дії іонізуючого опромінення. Звертають увагу дані про вплив іншого поліпептидного фактора, вилученого з кісткового мозку – гемаліну (Морозов В.Г. и соавт., 1998): як і у випадку пептидного комплексу гемоглобіну, він прискорював процеси зсідання крові і стимулював фібриноліз.

Наступним кроком наших досліджень стало вивчення дії природного пептидного комплексу гемоглобіну за умов гемодепресії, яка була викликана введенням цитостатичного препарату вінбластину.

На 7-му добу після одноразового введення вінбластину в нашому досліді загинуло 70% тварин, причому відмічені чисельні спайки та перфорації стінок кишечника, некротичний стан шкіри та слизових оболонок ротової порожнини, гіпоплазія кісткового мозку.

В умовах гемодепресії після введення вінбластину нами виявлена активація загибелі клітин кісткового мозку шляхом апоптозу за рахунок посилення експресії ядерного білка p53 та зменшення експресії білка bcl-2 (таблиця) що, можливо, призводить до блоку в точці рестрикції при проходженні клітиною G1-фази, тому клітина не вступає в S-фазу клітинного циклу і підлягає самознищенню (Булкіна З.П., 1991).

Таблиця

Вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на експресію онкопротеїнів bcl-2 та p53 у клітинах кісткового мозку щурів при депресії кровотворення, викликаний введенням вінбластину

Маркери апоптозу, що вивчалися Групи тварин

	інтактні тварини, n=10	контрольні тварини, вінбластин + 0,9% розчин натрію хлориду, n=4	дослідні тварини, вінбластин + пептид, n=7	
Bcl-2	% клітин з мар-кером апоптозу	29,80±3,02	15,40±1,21*	37,80±4,16**
	СЦК	0,54±0,07	0,31±0,04*	0,91±0,11**
p53	% клітин з мар-кером апоптозу	14,0±6,82	21,20±8,42*	15,40±1,36
	СЦК	0,28±0,04	0,72±0,13*	0,47±0,13**

Примітка: * - p<0,05 у порівнянні з інтактними тваринами;

** - p<0,05 у порівнянні з контрольними тваринами.

Поділ клітин у контрольних тварин був найбільш порушений в ряді еритробластів та мієлобластів. Нами виявлено зменшення числа мієлобластів на 73,0% (p<0,01), мієлоцитів на 76,0% (p<0,05), метамієлоцитів на 73,4% (p<0,05), паличкоядерних нейтрофілів на 90,0% (p<0,05), еозинофілів на 61,2% (p<0,05), пронормобластів та поліхроматофільних нормабластів у 2,1 рази (p<0,05) та 3,4 рази (p<0,05), відповідно. Таким чином, гальмування мітозу йшло на стадії промієлоцитів з послідуочим порушенням дозрівання метамієлоцитів, паличкоядерних нейтрофілів, тобто спеціалізації та диференціювання, можливо, гальмувався вихід деяких клітин з мозку у кров, де посилювалося дозрівання паличкоядерних у сегментоядерні нейтрофіли. Збіднення червоного кісткового мозку мієлоїдними елементами призвело до зменшення у периферичній крові кількості паличкоядерних нейтрофілів у 2,6 рази (p<0,05), моноцитів у 1,6 рази (p<0,05), Т-лімфоцитів і О-клітин у 1,3 рази (p<0,01) та 1,6 рази (p<0,01) відповідно. Зменшення кількості нейтрофілів супроводжувалось зниженням рівня фагоцитозу. В сироватці крові знижувався рівень Ig G у 2,0 рази (p<0,05). Зменшення кількості поліхроматофільних нормабластів вказувало на порушення еритропоезу, що у периферичній крові виражалось у модифікації структурно-функціональних особливостей еритроцитів та їх мембран: зменшення

вмісту гемоглобіну в 1,3 рази ($p < 0,1$), подовженні ШОЕ у 2,7 рази ($p < 0,01$), зниженні стійкості до кислотного гемолізу. що, можливо, зумовлено зростанням кількості старих еритроцитів і одночасно пригніченням еритропоезу.

Згідно приросту МДА за час інкубації крові у прооксидантному залізо-аскорбінатному буферному розчині, антиоксидантний потенціал крові виявився зниженим, що вказує на ослаблення антиоксидантного захисту у самих еритроцитах. Встановлені кореляції між початковою концентрацією продуктів, які реагують з тіобарбітуровою кислотою та перекисною резистентністю еритроцитів ($r = 0,86$; $p < 0,05$), загальною тривалістю процесу гемолізу еритроцитів при дії соляної кислоти та накопиченням МДА за час інкубації еритроцитів ($r = -0,95$; $p < 0,05$), часом наступу максимуму гемолізу еритроцитів та накопиченням МДА за час інкубації еритроцитів ($r = -0,88$; $p < 0,05$). Зниження значень НСТ-тесту на 74,3% ($p < 0,05$) відповідає послабленню функціональної активності нейтрофілів та ставить питання про джерела активних форм кисню. Активація субстратіндуцибельної СОД у 1,3 рази ($p < 0,05$) вказує на посилення продукції супероксиду, а зниження активності каталази сприяє дії перекису водню – продукту СОД (Борисюк М.В. и соавт., 1998). Ці процеси перебігали на фоні зрушення коагуляційної ланки гемостазу до гіперкоагуляції, зі зниженням антитромбінового потенціалу плазми на фоні гіперфібриногенемії. Спостерігався кореляційний зв'язок між концентрацією фібриногену та накопиченням МДА за час інкубації еритроцитів ($r = 0,91$; $p < 0,05$), зворотний взаємозв'язок між вмістом антитромбіну-111 та активністю каталази крові ($r = -0,95$; $p < 0,05$).

Таким чином, вінбластин сприяє дисбалансу клітин-попередників у кістковому мозку, порушенню у крові клітинного складу та імунологічного статусу, опосередковано-посиленню пероксидації та ослабленню антиоксидантного захисту, розвитку гіперкоагуляції крові. Тобто, отруєння вінбластином по параметрах порушень клітинного складу кісткового мозку та крові, гемокоагуляції, антиоксидантного і імунологічного статусів, фагоцитозу можливо вважати моделлю комплексного пошкодження червоного кісткового мозку.

В останні роки значний прогрес при лікуванні хіміотерапевтичних мієлосупресій пов'язаний із застосуванням рекомбінантних гемопоетичних колонієстимулюючих факторів (КСФ) людини, особливо гранулоцитарного КСФ і гранулоцитарно-макрофагального КСФ (Cacciola E. et al., 1994). У цих пацієнтів використання гемопоетичних ростових факторів зменшувало тривалість нейтрофілоцитопенії.

Попередніми дослідженнями було показано, що комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну, як і вище названі цитокіни, здатен стимулювати процеси проліферації і диференціювання клітин-попередників мієлоїдного та еритроїдного ростків, збільшувати кількість поліморфноядерних лейкоцитів у периферичній крові та посилювати реакцію респіраторного вибуху нейтрофілів.

Застосування комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну щурам, що отримували вінбластин, приводило до зниження летальності на 20% у порівнянні з контрольною групою. У дослідних тварин зберігалися вага та координація рухів, відмічалось незначне випадіння шерсті. Отже, візуальні симптоми отруєння вінбластином були виражені у меншому ступені. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну гальмував процеси апоптозу за рахунок зниження експресії ядерного протеїну p53 і збільшення експресії онкопротеїну vcl-2, зменшував фрагментацію ДНК клітин кісткового мозку. Зниження експресії онкопротеїну p53 сприяло проходженню клітиною S-фази та здійсненню процесів реплікації і репарації ДНК. Можливо, комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну інгібує активність ендонуклеаз в ядрі, які каталізують початкову стадію деградації ДНК. Ці дані дозволяють розглядати комплекс пептидних

фрагментів гемоглобіну, як препарат, який підвищує резистентність клітин до ініціаторів апоптозу та відновлює вміст клітин крові після хіміотерапії, зменшуючи побічні властивості цитостатиків.

У червоному кістковому мозку після введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну майже до норми знизився відсоток моноцитів ($4,8 \pm 0,86\%$ проти $26,4 \pm 2,64\%$; $p < 0,01$), підвищився вміст паличкоядерних нейтрофілів у 3,0 рази ($p < 0,01$), сегментоядерних нейтрофілів у 2,5 рази ($p < 0,01$) (рис.4).

В еритроїдному ряду залишався зниженим відсоток пронормобластів, базофільних нормобластів, збільшився відсоток поліхроматофільних нормобластів (з $1,0 \pm 0,1\%$ до $4,2 \pm 0,51\%$; $p < 0,05$).

У периферичній крові, в порівнянні з контролем, нормалізувалась загальна кількість лейкоцитів, причому відсотки паличкоядерних нейтрофілів та моноцитів зросли відповідно у 5,6 рази ($p < 0,01$) та у 2,0 рази ($p < 0,01$), підвищився до норми фагоцитарний індекс.

Кількість еритроцитів у крові незначно збільшилась в порівнянні з контролем, вміст гемоглобіну підвищився відносно контролю. Таким чином, не дивлячись на гальмування мітозів попередників пронормобластів, різко зростала швидкість дозрівання поліхроматофільних нормобластів та ретикулоцитів, що майже нормалізувало кількість еритроцитів та гемоглобіну крові. Найбільш виражений нормалізуючий ефект виявився для показників кислотного гемолізу еритроцитів (кількість зруйнованих еритроцитів зменшилась до $10,6 \pm 1,21\%$ проти $30,2 \pm 1,24\%$, $p < 0,01$). Зростання високостійких молодих клітин в еритроїдному ряді може свідчити про наявність сильної стимуляції процесів диференціювання, прискореного виходу клітин з кісткового мозку.

У крові кількість Т-лімфоцитів підвищувалась у 1,4 рази ($p < 0,05$), кількість О-клітин зростала відносно контролю у 2,9 рази, ($p < 0,01$). Тобто є затримка лімфоцитів у червоному кістковому мозку, нерівномірне дозрівання лімфоцитів у периферичних імунних органах. Нами були виявлені зміни клітинного імунітету: нормалізувалися відсотки В-лімфоцитів, теофілінчутливих клітин. Зміни гуморального імунітету були виражені у збільшенні вмісту IgA у 2,8 рази ($p < 0,01$) та IgG у 3,4 рази ($p < 0,01$) проти контролю.

Отже, затримка лейкопоезу зберігалася на рівні поділу попередників промієлоцитів, посилювалося дозрівання метамієлоцитарного ряду, накопичувалися у мозку сегментоядерні форми, але спеціалізація у еозинофіли гальмувалася. Вихід паличкоядерних та сегментоядерних форм нейтрофілів у кров різко збільшився. У червоному мозку починається відновлення продукції моноцитів, що відображається у лейкограмі. Внаслідок цього відновлювалася до норми фагоцитарна активність.

Під дією комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну у сироватці крові нормалізувався вміст дієнових кон'югатів, тобто, можливо, збільшилася їх продукція або знизилася їх поглинання клітинними мембранами. Концентрація МДА до інкубації та активність СОД залишилися в межі отруєння, але концентрації МДА після інкубації та її приріст за час інкубації значно знизилася у напрямку норми ($26,48 \pm 2,19$ мкмоль/л проти $50,82 \pm 3,51$ мкмоль/л), що вказує на збільшення антиоксидантного потенціалу. Концентрація церулоплазміну і активність каталази збільшувалися в 1,7 рази ($p < 0,01$) та 1,5 рази ($p < 0,05$), що свідчить про нормалізацію функції печінки та елімінацію перекису водню. Внаслідок цього нормалізувався рівень спонтанного гемолізу еритроцитів перекисної природи ($8,34 \pm 1,7\%$ проти $16,23 \pm 0,56\%$, $p < 0,01$). Встановлені кореляції між тривалістю процесу гемолізу еритроцитів та активністю каталази еритроцитів ($r = 0,95$; $p < 0,05$), часом руйнування найбільш стійких еритроцитів до дії соляної кислоти і перекисною резистентністю еритроцитів ($r = -0,94$; $p < 0,05$). Таким чином, комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну, підвищував стійкість мембран та антиоксидантний потенціал еритроцитів.

Зміни показників гемокоагуляції виразилися у нормалізації часу рекальцифікації ($99,0 \pm 13,08$ с проти $16,23 \pm 0,56$ с, $p < 0,01$), протромбінового часу, вмісту фібриногену та суттєвому збільшенню відсотку антитромбіну III. Це вказує на нормалізацію гемокоагуляції, що може бути пов'язано зі стабілізацією антиоксидантного статусу крові (Козинец Г.И. и соавт., 1998). Відмічено зворотній кореляційний зв'язок між часом рекальцифікації та рівнем накопичення МДА еритроцитами ($r = -0,98$; $p < 0,05$).

Отже, можна вважати, що комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну впливає на вихід клітин крові з депо червоного кісткового мозку, на диференціювання та спеціалізацію клітин. На наш погляд, існує взаємодія пептидних комплексів гемоглобіну з мембранними рецепторами клітин, їх вплив на активність внутрішньоклітинних посередників з відповідними протеїніназами, сигнали яких переносяться до ядра і змінюють експресію ядерних білків. Всі перелічені процеси приводять до вторинної зміни активності генома і синтезу іншого клану білків. Мабуть, під впливом комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну посилюється детоксикація вінбластину у печінці. Опосередковано комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну нормалізує вміст церулоплазміну, атерогенні ліпопротеїди, антиоксидантний статус та процеси гемокоагуляції. Ці зміни можуть бути пов'язані з дією на рецептори мембран клітин-попередників у гемопоезі, що сприяє елімінації пошкоджених вінбластином клітин.

Узагальнюючи матеріали нашого дослідження, вважаємо можливим констатувати, що комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну має широкий спектр біологічної дії на систему крові (рис.5). Він здатен дістантно діяти на клітини кісткового мозку, посилюючи проліферацію і диференціювання клітин-попередників еритроїдного ряду та проліферацію клітин гранулоцитарного ряду, що споріднює їх з гемопоетичними колонієстимулюючими факторами. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну можна віднести до медіаторної ланки біорегуляції системи крові, яка здійснює перенос специфічної інформації необхідної для нормального функціонування, розвитку і взаємодії клітинних популяцій шляхом зміни експресії ядерних білків (зокрема, р53). КПФГ притаманна нормалізуюча дія на систему вільнорадикального окислення, білки гострої фази запалення, неспецифічну резистентність і систему гемостазу, що супроводжується відновленням імунологічної регуляції фізіологічних функцій. Подальше вивчення фізіологічної ролі пептидних фрагментів гемоглобіну разом із вирішенням найважливіших теоретичних проблем біологічної регуляції дозволить накреслити нові підходи до лікування різних захворювань системи крові.

ВИСНОВКИ

В дисертації наведені теоретичні узагальнення і нове вирішення сучасної наукової проблеми в галузі фізіології по розкриттю ролі пептидних фрагментів гемоглобіну в регуляції системи крові. Результати дослідження впливу комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на гематологічні показники, стан кісткового мозку, перекисне окислення ліпідів, гемостаз, імунітет та апоптоз гемопоетичних клітин важливі для фундаментальної фізіології і можуть бути використані як підґрунтя для створення нових лікарських засобів.

1. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну має власну фізіологічну активність, яка спрямована на регуляцію гематологічних показників, стану кісткового мозку, перекисне окислення ліпідів, гемостаз, імунітет та апоптоз гемопоетичних клітин в умовах експериментальної патології, що підтверджує існування пептидної регуляції біологічно активними фрагментами гемоглобіну системи крові.
2. Комплекс пептидних фрагментів отримували за власною методикою шляхом ферментативного гідролізу гемоглобіну. Екстракцію гідролізату проводили за допомогою

органічних кислот в присутності катіонів двохвалентних металів, з очисткою шляхом гельфільтрації для вилучення пептидів з молекулярною масою менше 10 кД. Пептидний комплекс давав позитивну біуретову реакцію з максимумом спектра поглинання 200-210 нм. За даними іонообмінної хроматографії мав шість основних фракцій, час утримання: 3, 12, 18, 27, 35, 39 хвилин.

3. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну при внесенні у кров, отриману від здорових донорів, проявляв широкий спектр біологічної активності: стабілізував мембрану еритроцитів при дії солянокислого гемолітика, посилював фібринолітичну активність плазми, знижував ступінь експресії манозовміщуючих мембранних структур (МВМС) лімфоцитів та поліморфноядерних лейкоцитів.

4. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну має рецепторний тип дії, про що свідчило збільшення швидкості проведення імпульсів зорової модальності по специфічних аферентних системах підкоркових та коркових відділів зорового аналізатора, зниження експресії МВМС лімфоцитів та поліморфноядерних лейкоцитів після його введення здоровим тваринам.

5. Найбільша фізіологічна активність відмічається при застосуванні дози 1 мг/кг. У тварин відмічалось підвищення вмісту гемоглобіну, посилення розвитку еритробластних елементів, стимуляція процесів проліферації клітин гранулоцитарного ряду, підвищення фагоцитарної активності нейтрофілів.

6. Комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну в умовах експериментальної патології системи крові притаманна корегуюча дія на гематологічні показники периферичної крові і кісткового мозку, перекисне окислення ліпідів, гемостаз та неспецифічну резистентність організму.

7. При гемолітичній анемії, викликаній введенням сірчаноокислого фенілгідрозину комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну відновлює вміст глюкозо-6-фосфатдегідрогенази еритроцитів, нормалізує морфологічну картину крові та фагоцитарний індекс нейтрофілів, знижує значення НСТ-тесту нейтрофілів та гальмує розвиток гіперкоагуляції.

8. За умов хронічної свинцевої інтоксикації комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну прискорює розвиток компенсаційно-приспосувальних реакцій в периферичній крові та кістковому мозку, а саме: нормалізує кількість сидероцитів та активність супероксиддисмутази еритроцитів, фагоцитарну і кисеньактивує функцію нейтрофілів, збільшує швидкість оновлення еритроїдних елементів кісткового мозку.

9. При променевому пошкодженні комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну виявляє радіопротекторний ефект: прискорює процеси проліферації та вихід клітин гранулоцитарного ряду з депо кісткового мозку, посилює дозрівання поліхроматофільних нормобластів, зменшує рівень процесів пероксидації, відновлює фагоцитарну функцію нейтрофілів та показники гемостазу.

10. За умов гемодепресії, яка була викликана введенням цитостатичного препарату вінбластину, комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну зменшує побічні ефекти цитостатика, запобігає мієлосупресії стимулюючи грануло- і лімфопоез, зменшує нейтрофілопенію в периферичній крові, стимулює клітинний та гуморальний імунітет, відновлює до норми фагоцитарну активність нейтрофілів. Під впливом пептидних фрагментів гемоглобіну нормалізується стан прооксидантно-антиоксидантної системи і системи гемокоагуляції.

11. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну можна віднести до медіаторної ланки біорегуляції системи крові, яка здійснює перенос специфічної інформації змінюючи активність внутрішньоклітинних білків bcl-2 та експресію ядерних білків p53. В умовах експериментальної патології системи крові (хронічної свинцевої інтоксикації,

іонізуючому опроміненні організму, депресії кровотворення, яка була викликана введенням вінбластину) комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну гальмує процеси апоптозу за рахунок зниження експресії протеїну p53 і збільшення експресії онкопротеїну bcl-2, зменшує фрагментацію ДНК клітин кісткового мозку.

12. Подальше вивчення дії комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну, як потенційних лікарських речовин, дозволить накреслити нові підходи до лікування різних захворювань системи крові

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Враховуючи проведені дослідження, доцільно рекомендувати комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну для проведення доклінічних іспитів, як потенційних лікарських речовин.
2. Запропонований спосіб отримання комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну може бути використаний для створення нових лікарських препаратів.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ РОБІТ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Запорожець Т.М. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на стан показників імунітету та експресію манозовміщуючих мембранних структур лейкоцитів// Проблеми екології та медицини. -1997.- Т.1, №1-2.-С.38-40.
2. Запорожець Т.М., Боброва Н.О., Кайдашев І.П. Зміни експресії манозо- вміщуючих мембранних структур лейкоцитів під впливом пептидного комплексу гемоглобіну у здорових тварин та за умов гемолітичної анемії //Проблеми екології та медицини. -1999.- Т.3, №1-2.- С.132-134.
3. Запорожець Т.М. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на морфофункціональні показники периферійної крові за умов фенілгідразинової анемії //Вісник проблем біології і медицини.-1999.-№13.-С.128-132.
4. Запорожець Т.М., Міщенко В.П., Цебржинський О.І., Рябенко В.В., Ткаченко О.В. Ефекти вінбластину на систему крові, опосередковані станом кісткового мозку //Одеський медичний журнал.- 2000.-№5.-Т.61.-С.31-34.
5. Запорожець Т.М., Міщенко В.П., Саник О.В. Характеристика біологічної активності пептидних фрагментів гемоглобіну //Фізіологічний журнал.-2001.-Т.47.-№3.-С.42-46.
6. Запорожець Т.М. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на показники периферійної крові і кісткового мозку за умов свинцевої інтоксикації// Вісник проблем біології та медицини.- 2001.-№ 3.- С.8-12.
7. Запорожець Т.М., Ерошенко Г.А.Імуногістохімічне дослідження апоптозу клітин кісткового мозку при хронічному отруєнні свинцем //Буковинський медичний вісник.-2001.-Т.5.-№1-2.-С.61-63.
8. Запорожець Т.М.Корекція процесів пероксидації в крові комплексом пептидних фрагментів гемоглобіну в умовах дії іонізуючого випромінювання// Медицина сьогодні і завтра.-2001.-№ 2.-С.25-27.
9. Запорожець Т.М. Корекція процесів апоптозу в кістковому мозку комплексом пептидних фрагментів гемоглобіну при хронічному отруєнні свинцем //Вісник морфології.-2001.-№1.- С.76-77.
10. Запорожець Т.М. Модифікація постпроменевої реакції системи крові комплексом пептидних фрагментів гемоглобіну//Наукові записки НаУКМА. Спец.вип.-2001.-Т.19, ч.2.- С.385-387.
11. Запорожець Т.М. Вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на перебіг гемолітичної анемії// Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія.-2001.-Т.19.-С.97-101.
12. Запорожець Т.М. Ефекти комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну та можливі механізми впливу на процеси перекисного окислення ліпідів та гемостаз// Проблемы

достижения и перспективы развития медико-биологических наук.-2001.-ч.3.-С.44-46.

13. Запорожець Т.М. Регуляція пептидними фрагментами гемоглобіна свободнорадикальних і іммунологічних реакцій в умовах депресії кровотворення// Тавричеський медико-біологічний вестник.-2001.-№1-2.-С.31-34.

14. Запорожець Т.М. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на деякі показники крові та гемостаз *in vitro*// Медицина сьогодні і завтра.-2002.-№1.-С.32-34.

15. Запорожець Т.М., Ткаченко О.В. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на апоптоз гемопоетичних клітин кісткового мозку при променевому пошкодженні// Одеський медичний журнал.-2002.-№1.-С.4-6.

16. Запорожець Т.М. Дослідження біологічної активності комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну *in vivo*// Вісник проблем біології та медицини.-2002.-№3.-С.22-26.

17. Запорожець Т.М. Вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на гематологічні показники при мієлодепресії // Наукові записки НаУКМА. Біологія та екологія.-2002.- Т.20.- С.86-89.

18. Запорожець Т.М., Цебржинський О.І. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на пероксидацію в крові при свинцевій інтоксикації// Современные проблемы токсикологии.-2002.-№ 1.- С.72-74.

19. Запорожець Т.М. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на апоптоз гемопоетичних клітин кісткового мозку при мієлодепресії// Вісник Київського Державного університету. "Проблеми регуляції фізіологічних функцій".-2002.-Вип.8.-С.40-43.

20. Запорожець Т.М. Дослідження радіопротекторної дії комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на гемопоетичні клітини кісткового мозку// Актуальні проблеми сучасної медицини. Вісник Української медичної стоматологічної академії.-2002.-№1.-С.18-20.

21. Пат.48685 Україна, МКИ А61К38/00. Спосіб отримання комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну/ Запорожець Т.М., Кайдашев І.П.- Оpubл.15.08.2002.-Бюл.№8.

22. Запорожець Т.М. Регуляторные пептиды в регуляции физиологических функций //Матеріали науково-практич.конф."Актуальні питання теоретичної та клінічної медицини на сучасному рівні".-Полтава,1996.-С.145-146.

23. Запорожець Т.М., Міщенко В.П. Про можливі універсальні принципи дії та будови поліпептидних біорегуляторів //Матеріали XV з'їзду Українського фізіологічного товариства.- Донецьк,1998.-С.292.

24. Запорожець Т.М., Санік О.В., Міщенко С.В. Вплив пептидних регуляторів на зорові викликані потенціали в експерименті// Матеріали конференції молодих вчених "Фізіологія і патологія перекисного окислення, гемостазу та імуногенезу".-Полтава,1999.-С.15.

25. Запорожець Т.Н. Пептидные фрагменты гемоглобина, их влияние на некоторые показатели системы крови// Материалы международной научно-практической конференции "Актуальные вопросы клинической и экспериментальной медицины".-Минск,2000.-С.363.

26. Запорожець Т.М. Біологічно-активний комплекс гемоглобіну та його вплив на систему крові// Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції "Вчені України – вітчизняній фармації".- Харків, 2000.- С.253-254.

27. Запорожець Т.М., Ткаченко О.В. Універсальні механізми дії пептидних біорегуляторів на стан периферійної крові і кісткового мозку // Матеріали наукової конференції "Історія та сучасні досягнення фізіології в Україні".- Київ, 2001.-С.111.

28. Запорожець Т.Н., Міщенко В.П., Цебржинський О.І. К механізмам токсичності анемічних факторів//Матеріали доповідей 1-з'їзду токсикологів України.-Київ,2001.-С.95.

29. Запорожець Т.М. Корекція процесів гемостазу пептидними фрагментами гемоглобіну в умовах експериментальної патології //Материалы 2-й Международной конф. "Микроциркуляция и ее возрастные изменения".-Київ,22-24 травня 2002.-С.119-121.

30. Запорожець Т.М., Ткаченко О.В. Загальність дії пептидного комплексу гемоглобіну на

апоптоз гемопоетичних клітин кісткового мозку при патологічних станах у тварин//Матеріали XVI з'їзду Укр.фізіол.тов-ва. Вінниця,28-30 травня 2002 /Фізіол.ж-л.-2002.-Т.48,№ 2.-С.162.

31. Запорожець Т.М., Санік О.В., Насонова Т.І. Регуляція кровотворення та фізіологічної загибелі клітин пептидними фрагментами гемоглобіну// Тези доп. Всеукраїн. наук. конф., присвяченої 160-річчю каф. фізіології людини і тварин Київського нац. ун-ту ім.Тараса Шевченка. –Київ, 3-4 жовтня 2002р.-С.46.

АНОТАЦІЇ

Запорожець Т.М. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну: роль в регуляції системи крові.

Дисертація (рукопис) на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 14.03.13 - нормальна фізіологія. - Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, 2002.

Пептидний комплекс, отриманий шляхом ферментативного гідролізу гемоглобіну з наступною екстракцією органічною кислотою в присутності двохвалентних катіонів має власну фізіологічну активність, яка спрямована на підтримку метаболічних та регенераторних процесів у системі крові.

Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну можна віднести до медіаторної ланки біорегуляції системи крові, яка здійснює перенос специфічної інформації після взаємодії з мембранними рецепторами, змінюючи активність внутрішньоклітинних білків (зокрема bcl-2) з протеїназами, сигнали від яких змінюють експресію ядерних білків (зокрема p53). Виявлена здатність комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну посилювати розвиток еритробластних елементів та стимулювати процеси проліферації клітин гранулоцитарного ряду за фізіологічних умов і при розвитку експериментальних патологій. Комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну в умовах експериментальної патології системи крові (гемолітичної анемії, викликаній введенням сірчанокислого фенілгідразину, порушенні синтезу порфіринів та гем у умовах хронічної свинцевої інтоксикації, гіпопластичної анемії, викликаній променевим пошкодженням організму, депресії кровотворення, викликаній введенням цитостатика) притаманна нормалізуюча дія на систему вільнорадикального окислення, білки гострої фази запалення, неспецифічну резистентність, що супроводжується відновленням фагоцитарних властивостей нейтрофілів, нормалізацією функцій системи гемостазу та імунітету. Перспективне подальше вивчення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну, як потенційних лікарських речовин, що разом із вирішенням найважливіших теоретичних проблем біологічної регуляції дозволить накреслити нові підходи до лікування різних захворювань системи крові

Ключові слова: комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну, система крові, біорегуляція, експериментальна патологія крові.

Запорожець Т.Н. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіна: роль в регуляції системи крові.

Дисертація (рукопис) на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 14.03.13- нормальная физиология; Институт физиологии ім. А.А.Богомольца НАН України, Киев, 2002.

Пептидний комплекс, отриманий, путем ферментативного гідролізу гемоглобіна має власну біологічну активність, яка спрямована на підтримку метаболічних і регенераторних процесів у системі крові.

Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіна можна віднести до медіаторного звену системи біорегуляції крові, яка здійснює перенос специфічної

информации после взаимодействия с мембранными рецепторами, изменяя активность внутриклеточных белков (в частности, bcl-2) с протеинкиназами, сигналы от которых изменяют экспрессию ядерных белков (в частности, p53). Виявлена способность комплекса пептидных фрагментов гемоглобина ускорять развитие эритробластных клеток и стимулировать процессы пролиферации клеток гранулоцитарного ряда в физиологических условиях и при развитии экспериментальной патологии. Комплекс пептидных фрагментов гемоглобина в условиях экспериментальной патологии системы крови (гемолитическая анемия, вызванная введением фенилгидразина, нарушение синтеза порфиринов и гема в условиях хронической интоксикации солями свинца, гипопластическая анемия, вызванная гамма-излучением, депрессия кроветворения, вызванная введением цитостатика) способен оказывать нормализующее действие на систему свободнорадикального окисления, белки острой фазы воспаления, неспецифическую резистентность организма, что сопровождается восстановлением фагоцитарных функций нейтрофилов, нормализацией функций системы гемостаза и иммунитета. Перспективным является дальнейшее изучение комплекса пептидных фрагментов гемоглобина, как потенциального лекарственного препарата, которое вместе с решением теоретических проблем биологической регуляции позволит наметить новые подходы к лечению заболеваний системы крови. Ключевые слова: комплекс пептидных фрагментов гемоглобина, система крови, биорегуляция, экспериментальная патология крови.

Zaporozhetz T.N. The haemoglobin peptide fragments complex: its role in a blood system regulation

A thesis (manuscript) on the competition of academic degree of Biological Sciences Doctor by speciality 03.00.13-the Normal Physiology; A.A.Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, 2002.

The peptide complex, received by fermentative haemoglobin hydrolysis, has its own biological activity which is aimed to the metabolic and regenerative processes maintaining in a blood system.

In the work the chromatographic, haematological, biochemical, coagulological, immunological and histological methods are used. Immunohistochemical investigation of antigens bcl-2 and p53 were performed with the monoclonal antibodies using. The DNA fragmentation was accomplished by means of agarose-gel electrophoresis. The experiments were performed on the models of acute phenylhydrazine anaemia, chronic lead-poisoning (saturnism), acute haematopoiesis hypoplasia, caused by the vinblastine application, acute extracorporeal γ -irradiation.

The performed investigation results showed that the haemoglobin peptide fragments complex in vitro is capable to activate the fibrinolysis, to bloke the thrombine transformation, to decrease the mannosecontaining membrane lymphocytes and rod neutrophils structures expression degree.

While injecting to the health animals the peptide complex increased the velocity of conducting the visual modality impulses in the specific afferent systems of subcortical and cortical visual analysers regions, stimulated the erythroblastic elements development, the proliferation processes in the bone-marrow granulocytic line, increased the haemoglobin concentration in erythrocytes, and the neutrophils phagocytic activity.

In the condition of the chemical oxidant phenylhydrazine action the haemoglobin peptide fragments complex implication restored the glucose-6-dehydrogenase level and the reticulocytes number in a blood, normalized the nitroblue (NBT) test and neutrophil phagocytic activity, decreased the mannosecontaining membrane lymphocytes and rod neutrophils structures expression and inhibited the hypercoagulation development.

At the chronic saturnism the haemoglobin peptide fragments complex intramuscular injection restored the morphological blood and bone-marrow picture, while enhancing the erythropoiesis and

decreasing the apoptotic cells number and bone-marrow cells DNA-fragmentation.

The haemoglobin peptide fragments complex affected radioprotectively the blood system after the extracorporeal γ -irradiation in a sublethal dose. The animals mortality in experimental group decreased in 13%, in bone marrow there were a myeloid cells restoring, the DNA fragmentation reducing and the cell number with protein hall-marker p53 reducing in 2.3 times. The peptide complex decreased in a blood the malone dialdehyde accumulation level in 1,5 times, increased the young erythrocytes number in a circulation, normalized the coagulative blood potential.

In the haemodepression condition, caused by the vinblastine application, the haemoglobin peptide fragments complex decreased the animal lethality in 20%, inhibited the oncoprotein p53 expression and DNA degradation in a bone-marrow cells, increased in it the rod and segment-nuclear neutrophils containing. In a peripheral blood the peptide complex normalized the leucocytes number, neutrophils phagocytic index, T-lymphocytes, B-lymphocytes, theophyllin-perceptible cells, Ig A and Ig G containing.

Thus, the haemoglobin peptide fragments influence the blood cells exit from the bone marrow, the cell differentiation and specialization. To our point of view, the haemoglobin peptide fragments interact with the cell membrane receptors, changing the intracellular messengers and corresponding proteinkinases activity, modulate the nuclear proteins expression. All processes mentioned above lead to the genome activity change and secondary new proteins synthesis. The further studying of the haemoglobin peptide fragments physical role side by side with the most important theoretical problems of biological regulation solving will allow to substantiate the new ways of different blood system diseases treatment.

Key words: haemoglobin peptide fragments complex, blood system, bioregulation, experimental blood pathology.