ХАРЬКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

МЕДИЦИНА
СЕГОДНЯ И ЗАВТРА

18 05

ХАРКІВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

МЕДИЦИНА
СЬОГОДНІ І ЗАВТРА

2002 №1

ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ ПЕПТИДНИХ ФРАГМЕНТІВ ГЕМОГЛОБІНУ НА ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ТА ГЕМОСТАЗУ IN VITRO

Т.М. Запорожець

Українська медична стоматологічна академія, м. Полтава

Встановлено, що комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну в дозах 10, 25, 50 мкг/л має здатність активувати зовнішній шлях згортання крові та фібринолітичні властивості плазми. Найбільш виражені зміни виявлено при інкубації пептидного комплексу гемоглобіну з кров'ю донорів у дозі 25 мкг/мл. Відмічено подовження каолінового часу плазми та підвищення стійкості мембрани еритроцитів до дії соляної кислоти. Це вказує на антикоагулянтні та мембраностабілізуючі властивості комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну.

Ключові слова: швидкість осідання еритроцитів, кислотна стійкість мембрани еритроцитів, фібриноліз.

Фрагментація гемоглобіну в еритроцитах призводить до утворення коротких біологічно активних пептидів [1]. В еритроцитах людини присутні фрагменти гемоглобіну, які містять до 30 амінокислотних залишків [2]. Склад і рівень цих пептидів у нормі постійний і не залежить від статі, віку, групи крові та резус-фактора. Порушення фрагментації гемоглобіну виявлено при таких патологіях, як лімфогрануломатоз, лімфосаркома, рак легенів [3]. Руйнування механізмів протипухлинного захисту дослідники пов'язують з порушенням біохімічних процесів і вмісту окремих фрагментів гемоглобіну в екстрактах відповідних тканин. Для деяких таких пептидів встановлено наявність антипроліферативного ефекту в культурі трансформованих клітин [1]. У літературі відсутні дані про вплив пептидних фрагментів гемоглобіну (ПФГ) на гемостаз і показники крові in vivo та in vitro.

Метою роботи стало дослідження здатності комплексу ПФГ впливати на гемостаз та інші показники периферійної крові.

Матеріал і методи. Комплекс ПФГ отримували шляхом ферментативного гідролізу за власною методикою (рішення від 12.11.2001 № 200111694 подання заявки на винахід). Екстракцію гідролізату проводили за допомогою оцтової кислоти в співвідношенні 1:3 в присутності 0,1%-ного хлориду цинку і 0,1 %-ного хлориду магнію з подальшою очисткою шляхом гель-фільтрації для вилучення пептидів з молекулярною масою менше 10 кД. Препарат давав позитивну біуретову реакцію з максимумом спектра поглинання в УФ-ділянці (200–210 нм) [4].

Для дослідження біологічної активності комплексу ПФГ проби донорської крові поділили на серії (по 8 проб у кожній). В 1-й контрольній серії вносили 0,3 мл ізотонічного розчину хлориду натрію. В 2–4-й серіях вносили комплекс ПФГ в мінімальній (10 мкг/мл), середній (25 мкг/мл) та максимальній дозі (50 мкг/мл) у ізотонічному розчині хлориду натрію. Проби інкубували при 37 °С протягом 40 хв.

Швидкість осідання еритроцитів донорської крові визначали за стандартною методикою [5], гемолітичну резистентність еритроцитів — за методом [6]. При вивченні гемокоагуляційних властивостей плазми досліджували час рекальціфікації, протромбіновий, тромбіновий, каоліновий та частково активований тромбопластиновий час (АЧТЧ), вміст антитромбіну III та фібриногену [7]. Отриманий цифровий матеріал був статистично оброблений з використанням критерію Ст'юдента для зв'язаних виборок.

Результати дослідження. Інкубація крові з препаратом в мінімальній і середній дозах не мала вірогідного впливу на швидкість осідання червоних кров'яних клітин донорів. При інкубації крові з комплексом ПФГ у максимальній дозі виявлено прискорення седиментації еритроцитів до 45-ї хвилини досліду на 26,0 % ($p<0,05$), а до 60-ї хвилини цей показник не відрізнявся від контрольного значення (табл. 1). Зміни величини абсолютного приросту стовпа плазми в пробах крові, інкубованої з комплексом ПФГ, відрізнялись більш рівномірним приростом в одиницю часу, навіть у порівнянні з контрольними показниками.

Відмічено зниження величини абсолютного приросту плазми на 45-й хвилині до 46,0 % ($p<0,05$) і на 60-й хвилині до 71,0 % ($p<0,01$) при додаванні поліпептидів у мінімальній дозі. Середня доза поліпептиду також зменшувала величину приросту до 59,3 % ($p<0,01$) на 60-й хвилині. Максимальна доза поліпептиду збільшувала величину абсолютного приросту на 30-й хвилині до 158,0 % ($p<0,05$) і не мала впливу на цей показник у наступні часові інтервали.

Виявлено різноспрямовані зміни, які викликані дією різних доз комплексу ПФГ на стійкість еритроцитів крові донорів до дії солянокислого гемолітика (табл. 2).

Мінімальна доза поліпептиду скорочувала загальну тривалість процесу гемолізу на 15,5 % ($p<0,02$) порівняно із контролем. Кількість зруйнованих еритроцитів зростала на 23,6 % ($p<0,05$), а час настання максимуму гемолізу зменшувався на 15,3 % ($p<0,05$). Інкубація крові донорів з середньою дозою поліпептиду підвищувала стійкість еритроцитів до дії соляної кислоти (кількість зруйнованих еритроцитів зменшилась у 1,7 раза ($p<0,01$) порівняно з контрольним значенням). Максимальна доза поліпептиду не мала достатньо достовірного впливу на кислотну резистентність еритроцитів.

Таблиця. 1. Вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на ШОЕ крові донорів

Показник ШОЕ	Час дослідження, хв	Серія			
		1-а (контрольна)	з комплексом ПФГ		
			2-а	3-а	4-а
Висота стовпа плазми, мм	15	0,59±0,05	0,66±0,14	0,66±0,14	0,50±0,12
	30	0,83±0,11	1,10±0,19	1,30±0,31	4,60±0,24
	45	1,83±0,12	1,60±0,19	2,30±0,21	2,30±0,12*
	60	*3,66±0,11*	*2,10±0,29*	*3,0±0,32*	*3,51±0,22*
Величина абс. приросту, мм	15	0,59±0,05	0,66±0,14	0,66±0,14	0,52±0,12
	30	0,31±0,07	0,44±0,06	6,64±0,16	0,8±0,12
	45	0,93±0,11	0,50±0,01*	1,0±0,22	0,70±0,12
	60	1,72±0,11	0,50±0,01**	0,70±0,20	1,20±0,34

Примітка (в цій та інших таблицях). Достовірність відмінностей показників між контрольними та дослідними пробами: *p<0,05; **p<0,01.

Таблиця 2. Вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на кислотну стійкість еритроцитів крові донорів

Показник	Серія			
	1-а (контрольна)	з комплексом ПФГ		
		2-а	3-а	4-а
Загальна тривалість гемолізу, хв	8,58±0,34	7,25±0,11*	9,80±2,95	7,60±0,49
Кількість зруйнованих еритроцитів, %	12,0±0,72	14,83±0,93*	7,0±1,48**	13,40±1,12
Час настання максимуму гемолізу, хв	4,25±0,23	3,60±0,06	3,92±0,12	4,10±0,16
Час руйнування найменш стійких еритроцитів, хв	2,65+0,09	2,54± 0,08	2,34±0,07*	2,60±0,05
Час руйнування найбільш стійких еритроцитів, хв	6,19±0,44	5,66±0,09	6,4±0,45	6,25±2,55

Внесення пептидного комплексу призводило до комплексних змін показників зсідання крові (табл. 3).

Спостерігалось дозозалежне подовження каолінового часу та частково активованого тромбопластинового часу (АЧТЧ) на фоні скорочення протромбінового часу. Так, мінімальна доза комплексу ПФГ збільшувала каоліновий час на 16,8 % (p<0,01) та АЧТЧ на 12,2 % (p<0,05), зменшувала протромбіновий час на 21,7 % (p<0,05). Середня доза призводила до подовження каолінового часу плазми на 24,9 % (p<0,01), що вказує на антикоагулянтні властивості комплексу ПФГ. Максимальна доза збільшувала каоліновий час плазми на 20,9 % (p<0,01), АЧТЧ на 17,4 % (p<0,01), вміст антитромбіну-III на 6,7 % (p<0,01), гальмувала протромбіновий час на 24,9 % (p<0,01).

Обговорення результатів. Під дією комплексу ПФГ змінюється функціональна активність еритроцитів, збільшується час рекальцифікації плазми, АЧТЧ, каоліновий час і скорочується час лізису еуглобулінового згустка. Це свідчить про те, що пептидний комплекс має здатність активувати зовнішній шлях згортання крові та в незначній мірі блокувати внутрішній. Крім того, пептидний комплекс гемоглобіну гальмує перехід фібриногену у фібрин, що проявляється в подовженні тромбінового часу, посилює фібринолітичні

Таблиця 3. Вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на показники гемостазу крові донорів

Показник	Серія			
	1-а (контрольна)	з комплексом ПФГ		
		2-а	3-а	4-а
Час рекальцифікації, с	120,1±0,46	110,9±0,9*	124,9±1,6	115,3±0,5**
Час тромбіновий, с	14,9±0,2	18,3±0,3**	19,11±0,2**	21,0±0,3**
Час протромбіновий, с	15,46±0,32	12,10±0,3*	12,9±0,23*	11,61±0,24**
АЧТЧ, с	43,1±0,7	48,4±1,0*	45,2±1,0	50,8±0,4*
Каоліновий час, с	94,6±1,6	110,5±1,8**	118,2±1,2	114,4±1,5*
Фібриноген, г/л	2,06±0,29	2,55±0,08	2,58±0,07	2,90±0,11*
Антитромбін-III, %	26,8±0,3	25,61±0,4	24,6±0,25	28,6±0,4*
Фібриноліз, хв	246,0±6,11	218,5±9,8*	215,0±11,0*	120,1±13,2*

властивості плазми, скорочуючи час лізису еуглобулінового згустка. Можливо, дія комплексу ПФГ пов'язана з наявністю в них низькомолекулярних інгібіторів протеаз широкого спектра дії, як і поліпептидів, вилучених з тромбоцитів і плазми здорових людей [8]. Встановлено, що ці пептидні біорегулятори також уповільнюють зсідання крові шляхом запобігання полімерізації фібрину, одночасно зв'язуючи гепарин. Властивість пептидного комплексу гемоглобіну чинити дозозалежну дію на показники системи гемостазу споріднює його з цитомедином реналіном, який в дослідах in vitro уповільнює зсідання крові та стимулює фібриноліз. Автори [8] пов'язують ці зміни зі здатністю цитомединів зменшувати концентрацію аутоантитіл до Ха-фактора. Здатність комплексу ПФГ у дозі 25 мкг/мл підвищувати стійкість еритроцитів до дії солянокислого гемолітика вказує на можливість відновлення пептидним комплексом адсорбційно зв'язаних ліпідів зі стромою еритроцитів, які відповідають за стійкість клітин до гемолітика [6].

Таким чином, можна припустити, що комплекс ПФГ бере участь у біологічній регуляції процесів біосинтезу й обміну речовин. Не виключено, що первинний механізм дії регуляторного комплексу складається з розщеплення ПФГ на окремі олігопептиди (шляхом обмеженого протеолізу), які виконують регуляторні функції.

Висновки

1. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну має здатність активувати фібриноліз і блокувати перетворення тромбіну при внесенні у кров здорових донорів, що може бути пов'язано з наявністю в них низькомолекулярних інгібіторів протеаз широкого спектра дії.

2. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну підвищує стійкість еритроцитів до дії соляної кислоти, що вказує на здатність пептидного комплексу відновлювати адсорбційно зв'язані ліпіди зі стромою еритроцитів, які відповідають за стійкість клітин до дії гемолітика.

Список літератури

1. Пивнык А.В., Моисеева Т.Н., Карпова И.Б. и др. Изменения внутриэритроцитарного протеолиза гемоглобина при онкологических заболеваниях. Гематол. и трансфузиол. 2000; 45, 4: 14–18.

2. Гомазков О.А. Физиологически активные пептиды. Справочное руководство. М.: ИПГМ, 1995. 142 с.

3. Bagby G.A. Production of multilineage growth factors by hematopoetic stromal cells: an intercellular regulatory network involving mononucleous phagocytes and interleukin. Blood Cells 1987; 13: 147–159.

4. Запорожець Т.М., Міщенко В.П., Саник О.В. Характеристика біологічної активності комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну. Фізіол. журн. 2001; 47, 3: 42–46.

5. Козловская Л.В., Мартышова М.А. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования. М.: Медицина, 1975. 351 с.

6. Гительзон И.И., Терской И.А. Эритрограммы как метод клинического исследования крови. Красноярск: КМИ, 1959. 247 с.

7. Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. Томск: ТМИ, 1980. 312 с.

8. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Витковский Ю.А. и др. Применение пептидных биорегуляторов в хирургии и онкологии. Чита, 2001. 351 с.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСА ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ГЕМОГЛОБИНА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ И ГЕМОСТАЗА IN VITRO

Т.Н. Запорожец

Комплекс пептидных фрагментов гемоглобина в дозах 10, 25, 50 мкг/мл активировал внешний путь свертывания крови и фибринолитические свойства плазмы. Наиболее выраженные изменения выявлены при инкубации пептидного комплекса гемоглобина с кровью доноров в дозе 25 мкг/мл. Отмечено удлинение каолинового времени плазмы и повышение стойкости мембраны эритроцитов к действию соляной кислоты. Это указывает на антикоагулянтные и мембраностабилизирующие свойства комплекса пептидных фрагментов гемоглобина.

Ключевые слова: скорость оседания эритроцитов, кислотная стойкость мембраны эритроцитов, фибринолиз.

THE HAEMOGLOBIN PEPTIDE FRAGMENTS COMPLEX IFLUENCE ON THE SOME HAEMATOLOGICAL INDEXES AND HAEMOSTASIS IN VITRO

T.N. Zaporozhets

The haemoglobin peptide fragments complex in the dosages of 10, 25 and 50 mkg/ml has activated the external blood coagulation way and the donor's plasma fibrinolitic properties. The most evident changes have been observed at the haemoglobin peptide fragments complex incubation in a dosage of 25 mkg/ml with the donors' blood. The plasma caoline time prolongation and the erythrocyte membrane resistence increasing to the hydrochloric acid action have been noted. It points to the anticoagulative and membrane-stabilizing haemoglobin peptide fragments complex properties.

Key words: erythrocytes lodging rate, eryhrocyte membrane acid tolerance, fibrinolysis.

Поступила 05.03.2001 г.