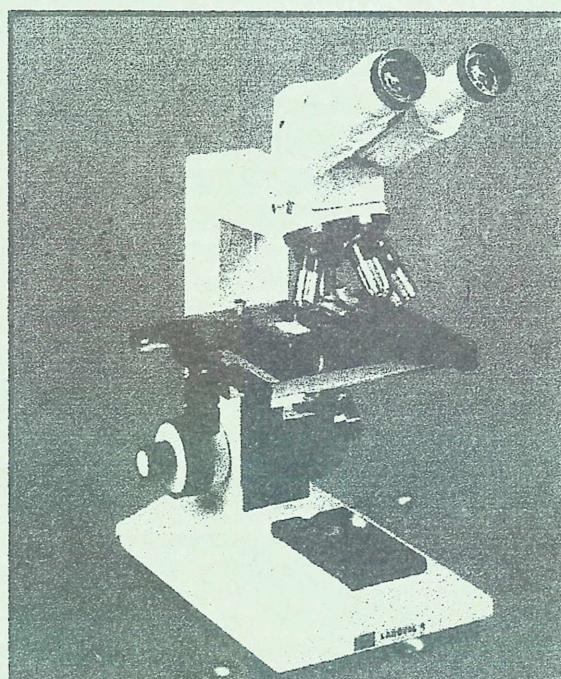


УКРАЇНСЬКА МЕДИЧНА СТОМАТОЛОГІЧНА АКАДЕМІЯ
УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ НАУК НАЦІОНАЛЬНОГО ПРОГРЕСУ

ВІСНИК ПРОБЛЕМ БІОЛОГІЇ І МЕДИЦИНИ



3

ПОЛТАВА-2002

Aseptic experimental inflammation resulted in rise of concentration of general protein (GP), general lipids (GL) and cholesterol (Ch). Injecting per os of new derivative of oxanyle acid in meddle doses did not produce statistically significant changes of concentrations of investigated parameters. After

injection UOA, U-4-COA and phlogogenum concentration of GP, GL and Ch starts to be reduced, but nevertheless obtained data remained above similar with intact animals.

Key words: derivates of oxanyle acid, lipid metabolism, protein metabolism, experimental inflammation.

УДК:612.111.11/13.001.6:615.36

ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ КОМПЛЕКСУ ПЕПТИДНИХ ФРАГМЕНТІВ ГЕМОГЛОБІНУ *IN VIVO*

Запорожець Т.М.

Для вирішення сучасних проблем міжклітинної регуляції в системі крові, в останній час велика увага приділяється коротким (менш 20 амінокислотних залишків) біологічно активним пептидам, які утворюються також і внаслідок фрагментації гемоглобіну [1]. Дослідженнями проведеними Пивних А.В. і

Співавт. [5] показано, що у онкологічних хворих в залежності від типу захворювання можуть розвиватися порушення протеолізу гемоглобіну в селезінці, які приводять до збільшення в крові пептидних компонентів. Виявлені порушення фрагментації гемоглобіну, на думку авторів, ведуть до руйнування механізмів протипухлинного захисту. Причина, що обумовлює цей феномен, поки що невідома, але припускається, що вона може бути пов'язана з порушенням біохімічних процесів в еритроцитах, або з його захисною реакцією [2]. У будь-якому разі вивчення фізіологічної ролі пептидних фрагментів гемоглобіну потребує додаткових досліджень.

Метою дослідження стало вивчення впливу комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на стан червоного кісткового мозку та периферичної крові після його введення здоровим тваринам.

Об'єкт і методи дослідження. Робота проведена на 40 мурчаках масою 380-420 г, поділених на чотири групи. Перша група - контрольні тварини (10), яким вводили внутрішньом'язово 0,2 мл фізіологічного розчину на протязі 7 днів. Відповідно -другій (10 тварин), третій (10 тварин) і четвертій (10 тварин) групам тварин вводили внутрішньом'язово комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну (КПФГ) одноразово в дозах 0,1 мг/кг, 1 мг/кг, 10 мг/кг на протязі 7 днів. Кров тварин які знаходилися під гексеналовим наркозом забирали з правого шлуночка серця в пластиковий шприц, який містив 3,8% розчин цитрату натрію в співвідношенні 9:1.

КПФГ отримували за власною методикою шляхом ферментативного гідролізу гемоглобіну людини (заявка на винахід № 2001117694, від 12.11.2001). Препарат мав молекулярну масу менш 10кД, давав позитивну біуретову реакцію з максимумом спектра поглинання в УФ-області (200-210нм).

Через добу після останнього введення препарату у тварин досліджували морфофункціональний стан периферичної крові. Мазки периферичної крові забарвлювали по

Романовському-Гимзе.[4]. Для підрахунку мієлограми використовували пунктат кісткового мозку стегнової кістки, мазок забарвлювали краскою Мая-Грюнвальда-Романовського [4] і підраховували клітинний склад за загально-визнаними методами [6]. Отриманий цифровий матеріал був статистично оброблений з використанням коефіцієнта Ст'юдента.

Результати дослідження та їх обговорення. Дослідження показників периферійної крові показали, що введення ПКФГ в дозі 0,1 мг/кг викликало зниження кількості еозинофілів у 6,0 разів ($p < 0,05$) та моноцитів у 3,8 рази ($p < 0,01$), підвищення числа сегментоядерних нейтрофілів та лімфоцитів на 25,0% ($p < 0,01$) (таблиця 1).

Таблиця 1

Гематологічні показники периферійної крові у здорових тварин після введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну

Гематологічні показники	Стат. показники	1 група контроль	Доза комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну		
			2 група 0,1мг/кг	3 група 1 мг/кг	4 група 10мг/кг
Кількість еритроцитів $\times 10^{12}$ / л	$M \pm m$	5.58 \pm 0.28	5.28 \pm 0.14	5.78 \pm 0.18	2.59 \pm 0.18**
Гемоглобін, г/л	$M \pm m$	100.0 \pm 4.8	84.8 \pm 5.6	131 \pm 3.89*	58.0 \pm 3.6*
ШОЕ, мм/год	$M \pm m$	4.6 \pm 0.5	3.4 \pm 0.5	7.8 \pm 0.37**	10.20 \pm 2.3**
Лейкоцитарна формула: паличко-ядерні нейтрофіли, %	$M \pm m$	5.4 \pm 0.24	4.0 \pm 0.32	7.4 \pm 0.5	1.2 \pm 0.49**
сегментоядерні нейтрофіли, %	$M \pm m$	14.40 \pm 0.68	17.20 \pm 0.97*	37.80 \pm 1.56**	30.60 \pm 0.81**
базофіли, %	$M \pm m$	1.0 \pm 0.5	0.6 \pm 0.4	0.62 \pm 0.4	0.8 \pm 0.4
еозинофіли, %	$M \pm m$	1.2 \pm 0.2	0.2 \pm 0.1*	0.0 \pm 0.24*	0.8 \pm 0.6
лімфоцити, %	$M \pm m$	59.8 \pm 1.39	74.8 \pm 1.71**	50.0 \pm 1.81**	55.0 \pm 1.45*
моноцити, %	$M \pm m$	11.4 \pm 2.0	3.0 \pm 0.7**	4.2 \pm 0.6**	13.6 \pm 2.0

Примітка: в цій та інших таблицях: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$. Достовірність відмінностей показників між контрольною та дослідними групами.

В групі тварин, які одержували ПКФГ в дозі 1мг/кг, збільшувалась кількість гемоглобіну на 30% та зростала швидкість осідання еритроцитів в 1,6 рази ($p < 0,01$). В цій групі тварин також зменшувалось число еозинофілів у 3,0 рази ($p < 0,01$), моноцитів у 2,7 рази ($p < 0,01$). Підвищувалась кількість паличко-ядерних у 1,4 рази ($p < 0,05$) та сегментоядерних нейтрофілів у 2,6 рази ($p < 0,01$).

Як свідчать дані таблиці 1, на 8 добу після введення КПФГ в максимальній дозі (10 мг/кг) в периферичній крові знижувалась кількість еритроцитів у 2,15 рази ($p < 0,01$) та гемоглобіну у 2,15 рази ($p < 0,01$) із зростанням швидкості осідання еритроцитів у 2,2 рази.

Зниженим була також кількість паличкоядерних нейтрофільних лейкоцитів у 4,5 рази ($p < 0,01$), число сегментоядерних нейтрофільних лейкоцитів зростало у 2,2 рази ($p < 0,01$).

Спостерігаючи різнонаправлені зміни гематологічних показників, нам було цікаво вивчити зміни показників кісткомозкового пунктату при введенні комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну в різних дозах здоровим тваринам. В мієлограмі виявлено зміни, які мали переважно дозозалежний характер та проявлялися в збільшенні відсотку мієлобластів, промієлоцитів, зменшенні відсотку мієлоцитів (таблиця 2).

Таблиця 2

Морфологія кісткомозкового пунктату у здорових тварин після введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну

Показники, що вивчалися	Стат.показники	1 група (контроль)	Доза комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну		
			2 група 0,1мг/кг	3 група 1 мг/кг	4 група 10мг/кг
Мієлобласти,%	M ± m	2.80 ± 0.66	8.80 ± 1.07**	4.40 ± 0.98*	6.00 ± 1.14*
Нейтрофіліні: промієлоцити, %	M ± m	1,80 ± 0,37	2.20 ± 0.37	3.40 ± 0.51	4.00 ± 0.71*
мієлоцити,%	M ± m	17.00 ± 0.84	5.60 ± 0.51**	8.00 ± 1.14**	10.80 ± 0.86**
метамієлоцити,%	M ± m	5.80 ± 1.02	2.20 ± 0.49**	6.00 ± 1.00	3.00 ± 0.32*
паличкоядерні, %	M ± m	13.00 ± 0.84	6.00 ± 0.71**	16.40 ± 0.93*	5,00 ± 0,71**
сегментоядерні, %	M ± m	19,60 ± 0,82	7.40 ± 0.68**	6.80 ± 0.68**	9.60 ± 1.03
Еозинофіли, %	M ± m	6,40 ± 0,76	1.60 ± 0.68**	2.80 ± 0.66**	1.40 ± 0.51**
Лімфоцити,%	M ± m	6.20 ± 0.66	4.60 ± 0.75	11.80 ± 1.07**	3.80 ± 0.73*
Моноцити,%	M ± m	2.00 ± 0.32	1.00 ± 0.32	0.60 ± 0.40	4.20 ± 0.66
Еритробласти, %	M ± m	1.20 ± 0.20	1.40 ± 0.51	1.60 ± 0.40	2.40 ± 0.51*
Пронормобласти, %	M ± m	1.00 ± 0.32	3.80 ± 0.37*	5.00 ± 0.71**	9.00 ± 0.84**
Нормобласти: базофіліні,%	M ± m	1.40 ± 0.51	12.80 ± 0.66**	12.20 ± 1.07**	16.60 ± 1.03**
поліхроматофіліні,%	M ± m	1.40 ± 0.51	40.60 ± 1.63**	14.40 ± 1.29**	18.00 ± 1.22**
оксифіліні,%	M ± m	0.60 ± 0.40	1.40 ± 0.51	3.00 ± 0.55*	2.40 ± 0.51*
Плазматичні клітини,%	M ± m	1.00 ± 0.37	1.25 ± 0.56	1.75 ± 0.76	1.75 ± 0.43
Мегакаріоцити,%	M ± m	17.67 ± 0.68	2.9 ± 0.58*	1.02 ± 0.06*	2.05 ± 0.48*

Різноманітні зміни нами відмічені в кількості паличкоядерних нейтрофілів, при застосуванні різних доз КПФГ. Так введення КПФГ в дозі 1 мг/кг підвищувало вміст паличкоядерних нейтрофілів на 26,1% (p<0,05), введення доз 0,1 мг/кг та 10 мг/кг викликало зменшення цих клітин на 54,0% (p<0,01) і 61,5% (p<0,01) відповідно. Кількість сегментоядерних нейтрофілів і еозинофілів зменшувалась незалежно від дози введеного поліпептиду. Застосування КПФГ в дозі 1 мг/кг сприяло зростанню відсотку лімфоцитів в кісткомозковому пунктаті у 1,9 рази (p<0,01), тоді як інші дози дещо зменшували вміст цих клітин. В еритроїдному ряду незалежно від дози відмічалась підвищена еритробластна реакція з посиленням проліферації базофіліних та поліхроматофіліних нормобластів.

Отримані дані підтвердили наше припущення, що комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну має широкий спектр біологічної дії на різні типи клітин червоного кісткового мозку та крові, здатен діяти дистантно на клітини кісткового мозку. Біологічно активні пептиди, які утворювалися внаслідок фрагментації гемоглобіну можна віднести до медіаторної ланки системи біорегуляції яка приймає участь у регуляції фізіологічних процесів починаючи з клітин-попередників кровотворення і завершуючи спеціалізованими клітинами крові [2]. Можливо, що за їх допомогою підтримується певне співвідношення клітин, а інформація, яку переносять вони, являє собою оцінюючий фактор подальшого цитодиференціювання [3]. Так, незалежно від введеної дози пептидного комплексу, в кістковому мозку

здорових тварин відмічено посилення розвитку еритробластних елементів на стадії пронормобластів, базофільних та поліхроматофільних нормобластів, стимуляція процесів проліферації клітин гранулоцитарного ряду, переважно мієлобластів і промієлоцитів, та гальмування мітозу на стадії мієлоцитів, з послідуочим пригніченням процесів дозрівання паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів. Це узгоджується із сучасним уявленням про вибірку активуючих генів [7] і підтверджує концепцію Кузника Б.І., Морозова В.Г., Хавінсона В.Х. [3] про існуючу в організмі систему біологічних регуляторів, що здійснюють перенос специфічної інформації, необхідної для нормального функціонування, розвитку і взаємодії клітинних популяцій. Властивість КПФГ чинити дозозалежну дію на проліферацію та диференціювання клітин-попередників еритроїдного ряду та проліферацію клітин гранулоцитар-

ного ряду *in vivo* споріднює їх з гемопоетичними колонієстимулюючими ростовими факторами [8].

Підсумки. Результати проведених експериментів свідчать про те, що в периферичній крові найбільші зміни спостерігались у тварин, яким вводили КПФГ в дозі 1 мг/кг: відбувалося підвищення кількості еритроцитів та гемоглобіну, поліморфноядерних лейкоцитів. Збільшення рівня гемоглобіну в крові дозволяє рекомендувати застосування пептидного комплексу гемоглобіну для доклінічних випробувань при анеміях.

Таким чином, подальше вивчення фізіологічної ролі пептидних фрагментів гемоглобіну разом із вирішенням найважливіших теоретичних проблем біологічної регуляції за фізіологічних умов дозволить накреслити нові підходи до лікування різних захворювань.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гомазков О.А. Физиологически активные пептиды. Справочное руководство.- Москва: ИПГМ, 1995.- 142 с.
2. Зайчик Ф.Ш., Чурилов Л.П. Основы общей патологии.-СПб.: ЭЛБИ, 1999.-618 с.
3. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины.-СПб.:Наука, 1998.-304с.
4. Лабораторные методы исследования в клинике /Под ред.В.В.Меньшикова.-Москва: Медицина, 1987.- С.140-145.
5. Пивнык А.В. Моисеева Т.Н. Карпова И.Б. Изменения внутриэритроцитарного про-

теолиза гемоглобина при онкологических заболеваниях //Гематол. и трансфузиол.- 2000.- N4.-С.14-18.

6. Посібник з експериментально-клінічних досліджень в біології та медицині // Під ред І.П.Кайдашева.-Полтава, 1997.-279 с.

7. Шиффман Ф.Дж. Патолофізіологія крові.- СПб.:Наука, 2000.-446 с.

8. Henry P.H., Longo D.L. Enlargement of lymph nodes and spleen// Principles of Internal Medicine.-1998.-V.14.-P.345-351.

Українська медична стоматологічна академія, м.Полтава

Стаття надійшла
15.10.2001р.

УДК:612.111.11/13.001.6:615.36

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ГЕМОГЛОБИНА IN VIVO

Запорожец Т.Н.

Целью работы явилось изучение влияния комплекса пептидных фрагментов гемоглобина на состояние красного костного мозга и периферической крови после введения его здоровым животным.

Работа проведена на 40 морских свинок, составивших 4 группы: 1-контрольные животные, 2, 3, 4 –опытные животные, которым внутримышечно вводили КПФГ в дозах соответственно 0,1; 1,0; 10 мг/кг однократно в течение 7 дней. Установлено, что КПФГ in vivo проявлял дозозависимое действие на пролиферацию и дифференцировку клеток эритроидного ряда (отмечено усиление развития эритробластных элементов на стадии пронормобластов, базофиль-

ных и полихроматофильных нормобластов). В миелоидном ряду наблюдалась стимуляция процессов пролиферации клеток гранулоцитарного ряда, преимущественно миелобластов и промиелоцитов, торможение митоза на стадии миелоцитов, с последующим угнетением процессов созревания палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов. Пептидный комплекс гемоглобина в дозе 1 мг/кг повышал содержание гемоглобина в эритроцитах, что позволяет рекомендовать его для доклинических исследований при различных видах анемий.

Ключевые слова: кровь, костный мозг, комплекс пептидных фрагментов гемоглобина.

UDC: 612.111.11/13.001.6:615.36

EXPERIMENTAL STUDY OF PEPTIDE FRAGMENTS OF HAEMOGLOBIN BIOLOGICAL ACTIVITY IN VIVO

Zaporozhets T.N.

The experiment object was the study of the haemoglobin peptide complex influence on the bone-marrow and peripheral blood state after injection to the healthy animals. The work was performed on the 40 guinea pigs made 4 groups: the 1st- control animals, the 2nd, 3rd, 4th – experimental animals, which were injected momentaneous intramuscular by the haemoglobine peptide fragments complex in doses of 0,1; 1,0; 10,0 mg/kg during 7 days. The study results showed that the haemoglobin peptide complex in vivo display a dose-dependent action to the erythroid precursors proliferation and differentiation (The erythroblastic elements development increasing on the stage of

pronormoblasts, basophil and polychromatophil normoblasts). In the myeloid line the haemoglobin peptide complex stimulates the granulocytes proliferation processes mainly myeloblasts and promyelocytes; peptide complex inhibits the mitosis on the stage of myelocytes with the subsequent rod neutrophils and segment - nuclear netrophils maturation processes depression. The haemoglobin peptide complex in a dose of 1 mg/kg is able to increase the haemoglobin level in a blood that permits to recommend its application for the preclinic experement during anaemia.

Key words: blood, bone-marrow, peptide fragments of haemoglobin