

ТАВРИЧЕСКИЙ МЕДИКО- БИОЛОГИЧЕСКИЙ ВЕСТНИК

научно-практический журнал
TAVRICHESKIY MEDIKO-BIOLOGICHESKIY VESTNIK

Том 4

№ 1-2

Volume 4

2001

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

Главный редактор

А. А. Бабанин

*А. И. Авдонина, В. А. Белоглазов (зам. главного редактора),
И. В. Богадельников, А. А. Горлов (ответственный секретарь),
Л. В. Дударь, К. А. Ефетов, В. А. Королев, В. Ф. Кубышкин,
В. В. Килесса (ответственный секретарь), А. В. Пидаев,
А. Н. Рыбалка, В. П. Самохвалов, В. Н. Старосек,
П. П. Толочко*

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ

*Е. Н. Амосова (Киев), С. Г. Безруков, С. П. Бережкова,
Н. П. Буглак, Ю. П. Вдовиченко (Киев), Н. Н. Волобуев,
Е. Н. Горбань (Киев), С. И. Галалу (Донецк),
А. В. Гербильский (Днепропетровск), Г. Н. Дранник (Киев), А. Е. Двирский,
Г. В. Дзяк (Днепропетровск), В. В. Ежов (Ялта), С. И. Жадько,
В. В. Жебровский, А. К. Загорулько, В. А. Зубарев, М. В. Иванова,
Н. Н. Каладзе, Т. С. Кирьякулов (Донецк), В. Н. Коваленко (г. Киев),
А. А. Коробов, Ю. С. Кривошеин (Москва), С. Н. Крутиков,
В. Н. Круцяк (Черновцы), Н. С. Кузнецов, С. М. Кузнецова (Киев),
И. И. Кутько (Харьков), Г. М. Кушнир, А. Б. Маркин (Львов),
В. П. Неспрядько (Киев), В. С. Онищенко (Киев),
А. Н. Пархоменко (Киев), В. Д. Розенберг (Евпатория), В. Ф. Русяев,
С. С. Солдатченко, Б. В. Троценко, В. П. Фесенко, П. С. Флис (Киев),
И. П. Фомочкин, Н. И. Чефранова, А. П. Чуприков (Киев),
А. А. Хренов.*

Рекомендовано к изданию постановлением Ученого Совета Крымского государственного
медицинского университета им. С. И. Георгиевского (проткол №8 от 28 сентября 2001г.)

УДК: 612.111.117.13:615.273

© Т. Н. Запорожец, 2001.

РЕГУЛЯЦИЯ ПЕПТИДНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ ГЕМОГЛОБИНА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В УСЛОВИЯХ ДЕПРЕССИИ КРОВЕТВОРЕНИЯ

Т. Н. Запорожец

Украинская медицинская стоматологическая академия, г. Полтава

THE HAEMOGLOBIN PEPTIDE FRAGMENTS REGULATION OF THE FREE-RADICAL AND IMMUNOLOGICAL REACTIONS UNDER THE HAEMOPOESIS DEPRESSION CONDITIONS

T. N. Zaporozhets

SUMMARY

Momentaneous vinblastine application to rats in a dose of 0,1 mg/100g for the animal's weight caused the phagocytic neutrophil activity was weakened. The number of O-, T-, B-lymphocytes has been decreased and the B-lymphocytes reducing corresponded to the Ig G diminishing. Peroxidation level increasing and antioxidative blood potential reducing.

After vinblastine injecting the peptide complex received by means of haemoglobin ferment proteolysis possessed the immunomodulating and activated the physiological antioxidative system thus reducing the erythrocytes membranes peroxidative lipid oxidation and facilitating the erythrocytes membranes stabilization according to the hydrochloric hemolytic substance action.

РЕГУЛЯЦИЯ ПЕПТИДНЫМИ ФРАГМЕНТАМИ ГЕМОГЛОБИНА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В УСЛОВИЯХ ДЕПРЕССИИ КРОВЕТВОРЕНИЯ

Т. Н. Запорожец

РЕЗЮМЕ

Однократное применение винбластина у крыс в дозе 0,1 мг/100 г веса тела животного вызывало снижение фагоцитарной активности нейтрофилов, количества О-, Т-, В-лимфоцитов, причем понижение числа В-лимфоцитов соответствовало снижению содержания Ig G, усиление уровня пероксидации и ослабление антиоксидантного потенциала крови.

Комплекс пептидов, полученных ферментативным гидролизом гемоглобина, обладал иммуномодулирующим действием, активировал физиологическую антиоксидантную систему, тем самым ослабляя перекисное окисление липидов.

Ключевые слова: пептидные комплексы гемоглобина, винбластин, фагоцитоз, пероксидация, иммунитет

Среди физиологически активных пептидов большое внимание уделяется группе пептидов, входящих в структуру гемоглобина: Hemorphin-5, h-LVV-Hemorphin-6, выделенных из гипофиза человека [1]. Несмотря на то что гемоглобин главным образом локализован в эритроцитах и, следовательно, как компонент крови должен присутствовать практически во всех тканях, его эндогенная фрагментация носит выраженный тканеспецифический характер. В зависимости от исходной ткани фрагменты этого белка составляют от 30 до 90% от общего числа пептидов, идентифицируемых в экстрактах [5], что делает вполне вероятным возможность реализации биологических эффектов. Ранее нами показано, что фрагменты гемоглобина, полученные ферментативным протеолизом, стимулируют кроветворение в костном мозге [2]. Учитывая рост частоты патологий, при которых необходимо проведение терапии иммунодепрессантами и цитостатиками, острой является проблема поиска средств, снижающих побочные действия данной категории лекарств на организм.

Поэтому целью настоящей работы стало изучение влияния комплекса пептидных фрагментов ге-

моглобина на иммунологические и биохимические показатели периферической крови после введения винбластина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Интактную группу животных составили 10 крыс, массой 180 г. Контрольную группу составили 13 крыс, у которых острую гипоплазию кроветворения вызывали однократным введением внутривенно винбластина в дозе 0,1 мг/кг массы тела животного [7] и в течение 7 дней после этого внутримышечно вводили 0,4 мл 0,9% раствора хлорида натрия. Животным опытной группы (14 крыс) одновременно с винбластином вводили внутримышечно пептидный комплекс выделенный из гемоглобина, в дозе 1 мг/кг массы тела в сутки в течение 7 дней.

При проведении исследований определяли показатели, характеризующие перекисное окисление липидов (ПОЛ): кинетика накопления продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, спонтанный гемолиз эритроцитов, диеновые конъюгаты, активность антиоксидантных ферментов: супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, церулоплазмينا, содер-

...инициатора ПОЛ является метгемоглобинообразование, ксантинооксидаза и дыхательный взрыв нейтрофилов, который оценивали по показателям НСТ-теста (тест восстановления нитросинего тетразолия) и по показателям фагоцитоза [4]. Показатели иммунограммы и содержание иммуноглобулинов подсчитывали по методике К.А. Лебедевой и соавт. [3]. Полученный цифровой материал был статистически обработан с использованием коэффициента Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На 7-е сутки после однократного введения винбластина погибло 70% животных, причем при вскрытии отмечались многочисленные спайки и перфорации стенок кишечника, некроз кожи и слизистых оболочек ротовой полости. У оставшихся в живых животных снизился вес, нарушилась координация движений.

У крыс, получавших на фоне отравления винбластином пептидный комплекс гемоглобина, сохра-

нился вес и координация движений, на 20% снилась летальность (на 7-е сутки погибло 50% животных). Таким образом, визуальные симптомы отравления винбластином были выражены в меньшей степени.

В периферической крови у животных после введения винбластина снизилось общее количество лейкоцитов в 1,55 раза ($p < 0,05$), содержание Т-лимфоцитов на 25,0% ($p < 0,01$), причем теофиллинрезистентных клеток на 100,0% ($p < 0,01$), а теофиллинчувствительных клеток на 25,0% ($p < 0,05$); процент О-клеток уменьшился на 39,0% ($p < 0,01$), содержание Т-лимфоцитов, напротив, увеличилось по сравнению с интактной группой животных на 100,0% ($p < 0,01$). Со стороны гуморального иммунитета содержание Ig A и Ig M осталось на уровне интакта, но вдвое снизилось содержание в сыворотке крови Ig G (таблица 1). Активность нейтрофилов по показателям фагоцитоза и способности восстанавливать нитросиний тетразолий была достоверно снижена (фагоцитарный индекс уменьшился относительно интакта на 21,39%, $p < 0,05$, а НСТ-тест на 42,64%, $p < 0,05$).

Таблица 1

Влияние комплекса пептидных фрагментов гемоглобина на показатели иммунитета и неспецифической резистентности у крыс при депрессии кроветворения, вызванной введением винбластина

Исследуемые показатели	Интактные животные	Контрольные животные	Опытные животные
Т-лимфоциты, %	52,00±1,55	39,00±0,63**	54,00±6,32*
В-лимфоциты, %	20,00±3,66	41,00±0,63**	22,50±4,74**
Теофиллинрезистентные клетки, %	8,40±2,06	16,80±0,37**	11,50±6,64
Теофиллинчувствительность	48,67±1,86	61,00±4,86*	43,00±7,59
Тельные клетки, %			
Количество нейтрофильных розеток (на 100 Лейкоцитов)	64,20±2,01	62,80±2,46	68,75±1,34
О-клетки, %	27,60±2,62	16,80±0,58**	48,40±4,74**
Ig A, г/л	0,80±0,49	0,91±0,02	2,60±0,14**
Ig M, г/л	0,15±0,03	0,13±0,01	0,16±0,03
Ig G, г/л	6,22±0,94	3,18±0,14*	10,95±0,69**
Фагоцитарный индекс, %	34,60±2,68	27,20±1,02*	35,80±1,28
НСТ-тест (индекс стимуляции)	1,29±0,02	0,74±0,01*	1,35±0,03*

Примечание. В таблицах 1 и 2: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ - достоверность показателей между интактной и контрольной, между контрольной и опытной группой животных.

Под действием пептидного комплекса гемоглобина в крови повышалось количество Т-лимфоцитов на 38,46% ($p < 0,05$) относительно контроля, причем количество теофиллинрезистентных клеток снижалось на 31,55% ($p > 0,1$), а теофиллинчувствительных клеток на 29,51% ($p < 0,1$), число О-клеток (Т-клеток, не обладающих ни хелперной, ни супрессорной активностью) возрастало на 188,09% ($p < 0,01$). Количество В-лимфоцитов понижалось по сравнению с контролем на 45,12% ($p < 0,01$). Увеличивалось содержание Ig A вдвое, а Ig G в 4,88 раза ($p < 0,01$) относительно животных контрольной группы. В опытной группе животных наблюдалось увеличение показателей неспецифической резистентности организма (фагоцитарный индекс возрастал на 31,62%, $p < 0,01$, а НСТ-тест на 82,43%, $p < 0,05$) (таблица 1). Полученные данные свидетельствовали о том, что пептидный комплекс гемоглобина обладал иммуномодулирующим действием, оказывая влияние на показатели как клеточного, так и гуморального иммунитета.

В наших исследованиях после однократного введения винбластина активировалось ПОЛ. По сравнению с нормой наблюдались следующие достоверные изменения показателей: содержание диеновых конъюгатов снизилось в 1,27 раза, количество липопротеидов низкой плотности в сыворотке крови уменьшилось в 1,44 раза. Концентрация ТБК-активных продуктов до инкубации эритроцитов возросла в 2,34 раза, а после 1,5-часовой инкубации в 2,47 раза, накопление МДА за время инкубации увеличилось в 2,51 раза. Эти данные свидетельствовали о том, что в крови понизилось содержание первичных продуктов перекисидации за счет снижения уровня атерогенных липопротеидов. Количество вторичных продуктов перекисидации возросло, что сопровождалось снижением антиоксидантного потенциала крови. На 34,25%, ($p < 0,01$) снизилась секреция печенью антиоксиданта сыворотки и реактанта острой фазы церулоплазмينا, вследствие чего в 1,27 раза, ($p < 0,01$) увеличился спонтанный гемолиз эритроцитов перекисного генеза (таблица 2).

Таблица 2

Влияние комплекса пептидных фрагментов гемоглобина на показатели перекисного окисления липидов у крыс при депрессии кроветворения, вызванной введением винбластина

Исследуемые показатели	Интактные животные	Контрольные животные	Опытные животные
СГЭ, %	9,60±1,30	16,23±0,56**	8,34 ±1,70**
Диеновые конъюгаты, мкмоль/л	22,26±1,79	17,57±0,65*	25,87±0,79**
Концентрация ТБК-активных продуктов, мкмоль/л	6,38±0,84	14,91±0,45**	14,27±2,23*
Концентрация ТБК-активных продуктов после 1,5 ч инкубации, мкмоль/л	26,60±6,99	65,74±3,92**	40,75±2,60**
Накопление МДА за время инкубации, %	20,23±6,37	50,82±3,51**	26,48±2,19**
Активность СОД, %	0,83±0,03	1,04±0,08*	1,00±0,13
Активность каталазы, индекс	1,50±0,10	1,34±0,06	1,99±0,09*
Концентрация церулоплазмينا, мг/л	283,50±4,72	186,40±5,19**	323,50±7,14* *
ЛПНП, г/л	0,23±0,02	0,16±0,01*	0,34±0,08

Под действием пептидных фрагментов гемоглобина в сыворотке крови нормализовалось содержание диеновых конъюгатов атерогенных липопротеидов (таблица 2). Возможно, увеличилась их продукция или снизилось их поглощение клеточными мембранами. Концентрация малонового диальдегида до

инкубации и активность СОД остались в пределах контроля, но концентрации МДА после инкубации и ее прирост за время инкубации выражено снизились, что указывало на нормализацию процессов свободнорадикального окисления в крови опытных животных. Активность каталазы увеличилась в 1,48

раза, ($p < 0,05$) а концентрация церулоплазмينا возросла в 1,74 раза, ($p < 0,05$) относительно контроля, что свидетельствовало о нормализации функции печени и элиминации перекиси водорода. Вследствие этого отмечалась нормализация (спад на 48,61% по сравнению с контролем) уровня спонтанного гемолиза эритроцитов перекисной природы. Следовательно, пептидные комплексы гемоглобина снижали перекисидацию в крови за счет активации физиологической антиоксидантной системы, вследствие чего повышалась стойкость мембран клеток организма и, в частности, эритроцитов к действию прооксидантов.

ВЫВОДЫ

1. Введение пептидного комплекса, полученного ферментативным гидролизом гемоглобина, ослабляет химиотерапевтическую лейкопению, эффективно стимулирует клеточный иммунитет и микробоцидную активность крови (НСТ-тест).

2. Под влиянием пептидных комплексов нормализуется состояние прооксидантно-антиоксидантной системы, что проявляется в ослаблении процессов перекисидации за счет повышения активности каталазы эритроцитов, содержания церулоплазмينا сыворотки крови, нормализации функционального состояния нейтрофилов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гомазков О.А. Физиологически активные пептиды: Справочное руководство.-М.:ИПГМ, 1995.-142с.
2. Запорожець Т.М., Нагорна Т.С., Єременко А.В., Ткаченко О.В Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на гематологічні показники крові та кісткового мозку за умов фенілгідразинової анемії // Проблеми екології та медицини.-1999.-Т.3, №1-2.-С.13-14.
3. Лебедев К.А., Понякина И.Д. Иммунограмма в клинической практике. -М.: Наука, 1990.-224с.
4. Нагоев Б.С. Модификация цитохимического метода восстановления НСТ // Лабор. дело.-1983.-№1.-с.23-24.
5. Пивнык А.В., Моисеева Т.Н., Карпова И.В. Изменения внутриэритроцитарного протеолиза гемоглобина при онкологических заболеваниях// Гематол.и трансфузиол.-2000.-Т.45, №4.-С.14-18.
6. Посібник з експериментально-клінічних досліджень в біології та медицині /І.П. Кайдашев, О.В. Катрушов, Л.В.Беркало та ін.-Полтава, 1997.-271с.
7. Торубарова Н.А. О взаимоотношении миелидных стромальных элементов костного мозга при острой экспериментальной аплазии // Бюл.эксперим. биол. и мед.-1977.-№2.-С.211-214.

Поступила 3.03.2001