

*Запорожець Т. М.*

## ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ ПЕПТИДНИХ ФРАГМЕНТІВ ГЕМОГЛОБІНУ НА ГЕМАТОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ПРИ МІЄЛОДЕПРЕСІЇ

*Стаття присвячена вивченню впливу комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на кровотворення і функціональні зміни периферичної крові при мієлодепресії, викликаній введенням вінбластиліну. Введення вінбластиліну щурам викликало порушення проліферації еритробластів та мієлобластів, гальмування мітозу на стадії промієлоцитів з наступним порушенням дозрівання метамієлоцитів. У периферичній крові знижувався рівень гемоглобіну на 21 %, кількість лейкоцитів - на 35 %. Встановлено, що введення пептидного комплексу гемоглобіну щурам на фоні розвитку мієлодепресії знижувало летальність на 20 %, підвищувало відсоток паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофіліву 3 та 2,5 рази відповідно у кістковому мозку, нормалізувало загальну кількість лейкоцитів у крові. Виявлені впливи пептидного комплексу гемоглобіну на організм дозволяють рекомендувати його для доклінічних випробувань при патологічних станах, які супроводжуються гемодепресією.*

Корекція порушень, які виникають в кістковому мозку при застосуванні цитостатичних препаратів, є актуальною і сьогодні. В останні роки значний прогрес при лікуванні хімотерапевтичних мієлосупресій пов'язаний із використанням рекомбінантних гемопостичних колонієстиму-

люючих факторів (КСФ) людини, особливо гранулоцитарного (Г-КСФ) і гранулоцитарно-макрофагального (ГМ-КСФ) [2, 3].

Попередніми нашими дослідженнями встановлено, що фрагменти гемоглобіну, отримані ферментативним протеолізом, стимулюють кро-

вотворення [4]. Роль комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну при депресії кровотворення не висвітлена, а можливість регулювати процеси кровотворення дозволить розробити нові методи корекції порушень, які виникають в системі крові при лікуванні цитостатичними препаратами.

Тому предметом дослідження стало вивчення впливу комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на пригнічення кровотворення внаслідок введення цитостатика (вінбластину) та викликані ним негативні цитологічні і функціональні зміни периферичної крові. Метою роботи є вирішення питання: чи впливає пептидний комплекс, отриманий шляхом ферментативного гідролізу гемоглобіну, на кровотворення та клітини крові при мієлодспресії?

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на 21 щурі обох статей масою 180 г. Тварини були поділені на 3 групи:

1) інтактна;

2) контрольна - тваринам одноразово внутрішньобрюшинно вводили вінбластин у дозі 0,1 мг на 100 г маси тіла [5] і паралельно вводили 0,2 мл апірогенного 0,9 %-го фізіологічного розчину натрію хлориду упродовж 7 днів;

3) дослідна - тваринам після введення вінбластину в дозі 0,1 мг на 100 г маси тіла пептидний комплекс, добутий з гемоглобіну, в дозі 1 мг/кг маси тіла на добу в 0,2 мл фізіологічного розчину протягом 7 днів.

Загальний клінічний аналіз крові проводили за стандартними методиками. Вміст гемоглобіну визначали уніфікованим гемоглобінціанідним

методом [6]. Для підрахунку мієлограми використовували пунктат кісткового мозку, мозок забарвлювали краскою Мая-Грюнвальда-Романовського і підраховували за загальноновизнаними методами [7]. Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну отримували за власною методикою шляхом ферментативного гідролізу гемоглобіну людини [4]. Отримані дані аналізувалися за допомогою персонального комп'ютера з використанням статистичної програми Microsoft Excel для Windows95.

### Результати досліджень та їх обговорення

Після одноразового введення вінбластину у тварин погіршувався апетит, починала знижуватися маса, спостерігалось випадання шерсті, порушилась координація рухів. На 7-му добу загинуло 70 % тварин. У загинлих тварин було відмічено численні спайки, перфорацію стінки кишки, некротичні процеси шкіри та слизових оболонок ротової порожнини і шлунка, глибоку гіпоплазію кісткового мозку.

У тварин, які вижили, було відмічено зниження гемоглобіну на 21,0 % ( $p < 0,05$ ), кількості лейкоцитів на 35,0 % ( $p < 0,01$ ) зарахунок паличкоядерних нейтрофілів, моноцитів та лімфоцитів, зростання швидкості осідання еритроцитів у 2,72 раза ( $p < 0,05$ ) (табл. 1).

У тварин, яким вводили пептидний комплекс гемоглобіну, на фоні розвитку гострої гіпоплазії кровотворення зберігалась маса і координація рухів, відмічалось незначне випадання шерсті. На 7-му добу загинуло 50 % тварин.

Таблиця 1. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на гематологічні показники периферійної крові у щурів при депресії кровотворення, викликаній введенням цитостатичного препарату

Показник	Інтактні тварини, $n = 10$	Контрольні тварини, $n = 4$	Дослідні тварини, $n = 7$
Кількість еритроцитів $\times 10^{12}/л$	4,41 $\pm$ 0,62	4,01 $\pm$ 0,37	4,53 $\pm$ 0,32
Гемоглобін, г/л	123,94 $\pm$ 6,94	98,48 $\pm$ 8,99	103,94 $\pm$ 7,22
Кольоровий показник	0,89 $\pm$ 0,09	0,69 $\pm$ 0,06	0,70 $\pm$ 0,07
УІОЕ, мм/г	1,32 $\pm$ 0,19	3,60 $\pm$ 0,24**	3,20 $\pm$ 0,49
Кількість лейкоцитів, $\times 10^9/л$	4,45 $\pm$ 0,81	2,88 $\pm$ 0,12	5,30 $\pm$ 0,83*
Лейкоцитарна формула, %:			
паличкоядерні нейтрофіли	3,20 $\pm$ 0,58	1,20 $\pm$ 0,37*	6,80 $\pm$ 0,73**
сегментоядерні нейтрофіли	29,60 $\pm$ 4,71	52,80 $\pm$ 4,71*	36,20 $\pm$ 3,17**
еозинофіли	4,80 $\pm$ 1,85	5,00 $\pm$ 0,89	2,20 $\pm$ 0,86
лімфоцити	54,60 $\pm$ 2,01	30,00 $\pm$ 1,52**	38,20 $\pm$ 1,39**
моноцити	7,60 $\pm$ 0,68	4,80 $\pm$ 0,73*	10,25 $\pm$ 0,76**

**Примітки.** В цій та інших таблицях: ( $p < 0,05$ )\*, ( $p < 0,01$ )\*\* - достовірність відмінностей показників між інтактною і контрольною, між контрольною та дослідною групами.

Введення внутрішньом'язово пептидних фрагментів гемоглобіну викликало певний про-ективний ефект щодо лейкоцитарних клітин системи крові. Як свідчать дані табл. 1, у дослідних тварин у 1,8 раза ( $p < 0,01$ ) зростав вміст лейкоцитів за рахунок паличкоядерних нейтрофілів та моноцитів, на 31,44% і 56,0% ( $p < 0,05$ ), відповідно, зменшувалось число сегментоядерних нейтрофілів та еозинофілів, дещо нормалізувався рівень гемоглобіну.

Відомо, що вінбластин спричинює виснаження кісткового мозку і розвиток вторинних інфекцій. Дослідження пунктату кісткового мозку тварин, яким вводили одноразово цитостатичний препарат, виявило збіднення кісткового мозку мієлоїдними клітинними елементами: зменшувалось число 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% ( $p < 0,05$ ) та моноцитів у 18,8 раза ( $p < 0,01$ ), збільшувалось число лімфоцитів у 2,3 раза ( $p < 0,01$ )(табл.2).

Дослідження еритропоезу виявило збільшення кількості еритробластів у 2,3 раза ( $p < 0,05$ ), зменшення пронормобластів та поліхроматофільних нормобластів у 2,1 раза ( $p < 0,05$ ) та 3,4 раза ( $p < 0,05$ ), відповідно. Вміст мегакаріоцитів зменшувався у 3,2 раза ( $p < 0,01$ ).

У тварин, які одержували пептидний комплекс гемоглобіну, в мієлоїдному ростку відміча-

лось підвищення паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів у 3,0 та 2,5 раза ( $p < 0,05$ ), відповідно. Практично до норми знижувалось число моноцитів (з 26,4 % у контрольних тварин до 4,8 % у дослідній групі,  $p < 0,01$ ). В еритроїдному ряду відмічалось зростання поліхроматофільних у 4,2 раза ( $p < 0,01$ ), що трохи перевищувало норму.

Отже, введення вінбластину впливало на тканини, клітини яких постійно діляться: бласні клітини червоного мозку, епітелій слизових шлунково-кишечного тракту. Відомо, що вінбластин денатурує впливає на тубулін цитоскелету, викликаючи К-мітоз, що блокує мітоз у метафазі, спричинює розрив та непрхідність мембранних каналів, тому використовується як протипухлинний засіб [1].

Поділ клітини у контрольних тварин був найбільш порушений в ряду еритробластів та мієлобластів. Нами виявлено порушення диференціювання та спеціалізації у паличкоядерних нейтрофілів, посилений вихід з депо сегментоядерних гранулоцитів, моноцитів та лімфоцитів. Збіднення червоного кісткового мозку мієлоїдними елементами призвело до зменшення кількості лейкоцитів: нейтрофілів, моноцитів і лімфоцитів у периферійній крові.

Збільшення відсотка моноцитів у пунктаті кісткового мозку та зменшення їх кількості у периферійній крові вказувало на затримку їх виходу з депо у кров та можливе посилене вико-

**Таблиця 2. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на показники кісткомозкового пунктату у щурів при депресії кровотворення, викликаній введенням цитостатичного препарату, %**

Показник	Інтактні тварини $n = 10$	Контрольні тварини $n = 4$	Дослідні тварини $n = 7$
Мієлобласти	4,40 ± 0,51	1,20 ± 0,37**	2,00 ± 1,05
Нейтрофільні гromієлоцити	1,80 ± 0,37	2,75 ± 0,67*	1,40 ± 0,51
Мієлоцити	7,60 ± 0,93	1,80 ± 0,58**	2,20 ± 0,58
Мстамієлоцити	12,20 ± 0,97	3,25 ± 0,56**	2,80 ± 0,37**
Паличкоядерні	24,80 ± 4,81	2,50 ± 0,26**	7,60 ± 1,03**
Сегментоядерні	18,60 ± 0,93	13,40 ± 1,44*	33,80 ± 2,76**
Еозинофіли	9,00 ± 1,14	3,50 ± 0,77**	2,00 ± 0,45
Лімфоцити	9,20 ± 1,07	21,50 ± 3,32**	39,80 ± 3,40* *
Моноцити	1,40 ± 0,51	26,40 ± 2,64**	4,80 ± 0,86**
Еритробласти	1,40 ± 0,51	2,80 ± 0,51*	1,80 ± 0,86
Пропормобласти	0,53 ± 0,16	0,25 ± 0,12	0,20 ± 0,10
Нормобласти базофільні	2,40 ± 0,51	1,50 ± 1,34	1,40 ± 0,51
Нормобласти поліхроматофільні	3,40 ± 0,87	1,0 ± 0,1*	4,20 ± 0,51*
Плазматичні клітини	1,50 ± 0,26	1,50 ± 0,58	2,75 ± 1,23
Мегакаріоцити	14,25 ± 3,25	4,50 ± 1,18*	4,00 ± 0,73

ристання в тканинах. У пунктаті кісткового мозку відсоток промієлоцитів збільшувався, тоді як відсоток мієлоцитів, метамієлоцитів, паличкоядерних, сегментоядерних, еозинофілів зменшувалася. У крові абсолютна кількість паличкоядерних нейтрофілів знижувалася. Таким чином, мітоз гальмувався на стадії промієлоцитів з наступним порушенням дозрівання метамієлоцитів, паличкоядерних нейтрофілів, можливо, гальмується вихід деяких клітин з мозку в кров, де посилюється дозрівання паличкоядерних у сегментоядерні нейтрофіли. В еритроцитарному ростку нами відмічено зменшення відсотка пронормобластів, базофільних нормобластів, поліхроматофільних нормобластів, частково - синтез гему в ретикулоцитах.

Введення пептидного комплексу гемоглобіну щурам, які отримували вінбластин, знижувало летальність на 20 % у порівнянні з контрольною групою. У дослідних тварин зберігалася маса тіла та координація рухів, відмічалось незначне випадання шерсті. У червоному кістковому мозку після введення пептидного комплексу гемоглобіну майже до норми знизився відсоток моноцитів, у бік норми підвищився відсоток паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів. У еритроїдному ряду залишався зниженим відсоток пронормобластів, базофільних нормобластів, збільшився відсоток поліхроматофільних нормобластів. У периферійній крові нормалізувались загальна кількість лейкоцитів, причому відсотки паличкоядерних нейтрофілів та моноцитів зросли та перевищили величини норми і контролю.

У тварин, які отримували пептидний комплекс гемоглобіну, знизився вміст сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів, зростає відсоток лімфоцитів, підвищився до норми фагоцитарний індекс. Кількість еритроцитів у крові незначно збільшилась у порівнянні з нормою та контролем, вміст гемоглобіну підвищився відносно контролю. Таким чином, незважаючи на гальмування мітозів попередників пронормобластів, різко зростала швидкість дозрівання поліхроматофільних нормобластів та ретикулоцитів, що майже нормалізувало кількість еритроцитів та гемоглобін крові.

У мієлоїдному ряду червоного кісткового мозку під впливом пептидного комплексу гемоглобіну підвищився відсоток мієлобластів, мієлоцитів та паличкоядерних і сегментоядерних нейтрофілів, знизився відсоток метамієлоцитів, еозинофілів, моноцитів. Нормалізувалася фагоцитарна активність лейкоцитів - вона підвищилася порівняно з контролем. Тобто затримка лейкопоезу зберігалася на рівні поділу попередників промієлоцитів, у кістковому мозку нагромаджувалися сегментоядерні форми, але трансформація метамієлоцитів у еозинофіли гальмувалася. Вихід паличкоядерних та сегментоядерних форм нейтрофілів у кров різко збільшився. У червоному мозку почала відновлюватися продукція моноцитів.

Виявлені ефекти пептидного комплексу дозволяють рекомендувати його для доклінічних випробувань при патологічних станах, які супроводжуються гемодепресією.

1. Булкина З. П. Противоопухолевые препараты: Справочник.- К.: Наук. думка, 1991.— С. 44-48.
2. Возинов А. Ф., Бутенко А. К., Зак К. П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства.- К.: Наук. думка, 1998.-315 с.
3. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Жданов В. В. и др. Механизмы гемостимулирующего эффекта грануцитарного колониестимулирующего фактора при цитостатическом воздействии // Бюллетень экспер. биологии и медицины.- 1999.— Т. 128. - № 8. - С. 194-199.
4. Запорожець Т. М., Мищенко В. П., Саник О. В. Характеристика біологічної активності комплексу пептидних фраг-

ментів гемоглобіну // Фізіол. журнал.- 2001.- Т. 47.- № 3.- С. 42-46.

5. Торубарова Н. А. О взаимоотношении миелоидных и стромальных элементов костного мозга при острой экспериментальной аплазии // Бюллетень экспер. биологии и медицины. - 1977. - № 2. - С. 211-214.
6. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова.-М.: Медицина, 1978. - С. 140-145.
7. Руководство к практическим занятиям по клинической лабораторной диагностике / Под ред. М. А. Базарновой.- К.: Вища школа, 1988.- С. 5-19.

*T. N. Zaporozhets*

## THE HAEMOGLOBIN PEPTIDE FRAGMENTS COMPLEX INFLUENCE ON THE HEMATOLOGICAL PARAMETERS AT MYELODEPRESSION

*The clause is devoted to study of the haemoglobine peptide fragments influence on haemopoesis at myelodepression, caused by vinblastine introduction. The vinblastine introduction led to the infringements in erythroblasts line, the mitosis braking at promyelocytes stage with the subsequent metamyelocytes maturation infringement. In the peripheral blood the haemoglobine level on 21%? Leucocytes on 35% was reduced. The haemoglobine peptide complex application at rats that received vinblastine resulted in lethality reduction on 20% in comparison with control group. In red bone marrow after polypeptide complex introduction almost up to norm monocytes percent has decreased, rod neutrophils and segment-nuclear neutrophils percent in 3 times and 2,5 times accordingly has increased. In blood the leucocytes total quantity and phagocytic index was normalised.*