

Запорожець Т. М.

МОДИФІКАЦІЯ ПОСТПРОМЕНЕВОЇ РЕАКЦІЇ СИСТЕМИ КРОВІ КОМПЛЕКСОМ ПЕПТИДНИХ ФРАГМЕНТІВ ГЕМОГЛОБІНУ

Дослідження присвячено вивченню впливу комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на стан периферичної крові та функціональну активність нейтрофілів в умовах екстракорпорального опромінення тварин гама-променями.

Введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну опромінені тваринам нормалізувало показники лейкоцитарної формули, збільшувало вміст гемоглобіну в еритроцитах, посилювало фагоцитарну активність нейтрофілів.

Давно відомо, що висока радіочутливість системи крові в багатьох випадках визначає тяжкість гострого променевого синдрому. Проблема відновлення кісткового мозку і периферичної крові при променевому ураженні різноманітна і може включати в себе як пересадку кісткового мозку, так і стимуляцію кровотворення [1].

На сьогодні досліджено десятки тисяч протирадіопротективних препаратів, але всі вони мають свої вади. В останній час привертають увагу нові засоби радіопротекції організму, такі, як трефони (білкові стимулятори гемопоеза), інтерлейкіни, гемопоетичні колоніестимулюючі фактори [2].

Метою дослідження стало вивчення впливу комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на стан периферичної крові, функціональну активність нейтрофілів в умовах екстракорпорального опромінення тварин жорсткими гама-променями. Попередніми дослідженнями, проведеними за фізіологічних умов, ми виявили біологічну активність комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну. Зокрема, було помічено вплив пептидного комплексу гемоглобіну на зміни експресії мембранних структур лімфоцитів та нейтрофілів, що містять залишки D-манози [3].

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на 26 морських свинках обох статей вагою 400—420 г, поділених на три групи. Перша група — інтактні (10), друга група — контрольні тварини (7) — підлягали одноразовому тотальному гама-опроміненню в дозі 4,5 Гр з внутрішньом'язовим введенням 0,2 мл 0,9 % апірогенного розчину натрію хлориду протягом 7 діб, третя група — дослідні тварини (10), яким після одноразового тотального опромінення в дозі 4,5 Гр вводили внутрішньом'язово пептидний комплекс гемоглобіну в дозі 1 мг/кг протягом 7 діб. Дослідження проводили на восьму добу після опромінення. Кров тварин забирали під гексеналовим наркозом з правого шлуночка в пластиковий шприц, який містив 3,8 % розчин цитрату натрію у співвідношенні 9:1.

Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну отримували за власною методикою шляхом ферментативного гідролізу гемоглобіну. Екстракцію гідролізату проводили органічною галогеномісткою кислотою за наявності катіонів цинку та магнію з наступним осадженням пептидів органічним розчинником та очисткою шляхом гел'фільтрації для вилучення пептидів з молекулярною масою

менше 10 кД. Препарат давав позитивну біуретову реакцію з максимумом спектра поглинання в УФ-області (200—210 нм). Аналіз іонообмінної хроматографії встановив, що пептидний комплекс гемоглобіну розділявся на шість основних фракцій, час утримання: 3, 12, 18, 27, 35, 39 хвилин.

Загальний клінічний аналіз крові проводили за стандартними методиками, мазки периферичної крові забарвлювали по Романовському—Гимзе. Функціональний стан нейтрофілів оцінювали за показниками фагоцитозу та показниками НСТ-тесту (тест з використанням нітросинього тетразолію) [4, 5].

Отриманий цифровий матеріал був статистично оброблений з використанням коефіцієнта Ст'юдента.

Результати досліджень та їх обговорення

Проведені нами дослідження показали, що гостре опромінення в сублетальній дозі викликало цілу низку морфологічних та функціональних змін у системі крові. Відомо, що радіочутливість адекватно характеризується дозою опромінення, яка спричиняє загибель 50 % тварин. Середнє значення ЛД 50/30 для морської свинки складає 4,5 Гр, а найбільша ступінь гранулоцитопінії (максимум першого спустошення), яке характеризує розпал гострої променевої хвороби, настає на восьму добу після опромінення [6].

Важливим показником впливу екстракорпорального опромінення і радіопротекторного ефекту пептидного комплексу гемоглобіну є смертність тварин. Так, у контрольній групі загинуло 25 % тварин, тоді як у дослідній групі — 12 %.

Доза опромінення 4,5 Гр не впливала на кількість еритроцитів у периферичній крові, вміст ге-

моглобіну та кольоровий показник (табл. 1), відмічався анізоцитоз за рахунок макроформ.

В опроміненіх тварин зростала швидкість зсідання еритроцитів у 2,7 рази ($p < 0,01$), в периферичній крові відмічалась лімфо- і лейкопенія за рахунок паличкоядерних та сегментоядерних нейтрофілів (зменшення на 55,4 % ($p < 0,05$) та на 15 % ($p < 0,01$) відповідно), підвищення кількості моноцитів відмічалось у 2,9 рази ($p < 0,01$).

Як свідчать дані таблиці, після введення пептидного комплексу гемоглобіну загальна кількість еритроцитів та рівень гемоглобіну в опроміненіх тварин не змінювався, при цьому вірогідно зростав в 1,2 рази ($p < 0,01$) кольоровий показник еритроцитів. У дослідних тварин залишався низький рівень лейкоцитів, але зростало число сегментоядерних нейтрофілів у 8,0 раз ($p < 0,01$) та лімфоцитів у 1,3 рази ($p < 0,01$) в порівнянні з контрольною групою тварин.

Враховуючи виражені порушення цитокінези гранулоцитарних популяцій у тварин, які перенесли променеве опромінення в сублетальній дозі, ми вважали доцільним оцінити здатність зрілих гранулоцитів до фагоцитозу і внутрішньоклітинного лізису (табл. 2)

Як свідчать дані таблиці, в період розпаду променевої хвороби у тварин, що перенесли опромінення в сублетальній дозі, знизився відсоток нейтрофілів-фагоцитів на 13,7% ($p < 0,05$). В порівнянні з інтактними тваринами здатність нейтрофілів відновлювати нітросиній тетразолій при цьому зростала на 30,0% ($p < 0,01$). Розглянуті вище дослідження засвідчили наявність фагоцитарних змін зрілих гранулоцитів після опромінення тварин у сублетальній дозі. Відмічена також постпроменева депресія фагоцитарних функцій нейтрофілів на

Таблиця 1. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на гематологічні показники периферійної крові у морських свинок при променевому ушкодженні.

Показники, що вивчалися	Інтактні тварини $n=10$	Контрольні тварини розчин $n=7$	Дослідні тварини $n=9$
Кількість еритроцитів, $\chi 10^{12}/\text{л}$	5,09±0,18	4,48±0,54	4,33 ± 0,24
Гемоглобін, г/л	106,49±2,67	115,00±6,87	121,20±9,91*
Кольоровий показник	0,70±0,04	0,90±0,06	1,12±0,11*
ШОЕ, мм/г	1,35±0,06	3,60±0,24**	4,00±0,32
Кількість лейкоцитів, $\chi 10^9/\text{л}$	5,05±0,22	1,9± 0,10**	1,79±0,44
Паличкоядерні нейтрофіли, %	1,50±0,26	0,67±0,24*	0,50±0,26
Сегментоядерні нейтрофіли, %	8,00±0,82	3,31±1,25*	10,00±3,46**
Еозинофіли, %	3,50±1,06	3,00±0,37	1,50±0,58
Лімфоцити, %	81,40±0,81	45,60±4,72**	60,00±3,65*
Моноцити, %	3,60±0,81	10,50±1,18**	9,50±3,38

Примітка: в цій та іншій таблиці, * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$. Порівняння проведено між інтактною та контрольною групою; між контрольною та дослідною групою тварин.

Таблиця 2. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на показники активності нейтрофільних лейкоцитів крові морських свинок при променевому ушкодженні.

Показники, що вивчалися	Інтактні тварини n=10	Контрольні тварини n=7	Дослідні тварини n=9
Фагоцитарний індекс, %	39,40±0,75	34,0±1,71*	53,60±1,86**
НСТ-тест індекс стимуляції	1,20±0,07	1,56±0,02*	1,19±0,03**

фоні нейтропенії та появи у периферичній крові так званих гігантських нейтрофілів. За даними Жербин Е. А. і співавт. [6] цей феномен є додозалежним і пов'язаний з аномаліями процесів поділу зріючих мієлоїдних елементів гемопоетичних тканин. Відомо, що гранулоцити дуже чутливі до дії продуктів тканинної деструкції та хемотоксичних речовин, які утворюються в тканинах при дії іонізуючого опромінення [7]. Цим пояснюється підвищення киснетворної функції нейтрофілів у тварин контрольної групи. В свою чергу "дихальний вибух" нейтрофілів гальмується тріфтазіном, який зв'язується з кальмодуліном, а активується входом у нейтрофіли іона кальцію [8]. При зростанні рівня Ca^{2+} в клітині активується ендонуклеаза, яка викликає деградацію ДНК [9] та загибель нейтрофілів шляхом апоптозу.

Введення пептидного комплексу гемоглобіну опромінені тваринам збільшувало кількість нейтрофілів, здатних до фагоцитозу, у 1,6 рази ($p < 0,01$) та нормалізувало їхню здатність відновлювати нітросиній тетразолій. Можливо, пептидний комплекс гемоглобіну перешкоджає зростан-

ню рівня Ca^{2+} в клітині, діючи через Ca^{3+} — кальмодулінову систему, гальмує апоптоз, інгібуючи "дихальний вибух" нейтрофілів.

Таким чином, внаслідок гострого тотального опромінення в сублетальній дозі у тварин розвивався гематологічний синдром гострої променевої хвороби, який супроводжувався загибеллю кровотворних стовбурних клітин, збільшенням дефіциту зрілих клітин кісткового мозку і периферичної крові. Насамперед знижувався вміст клітин з малою тривалентністю життя в організмі (гранулоцити). В період максимуму першого спустошення гранулоцитів була помітна функціональна патологія лейкоцитів крові, яка проявлялась у порушенні антимікробної і поглинаючої функції циркулюючих нейтрофілів.

Введення пептидного комплексу гемоглобіну в умовах дії сублетального опромінення вже на восьму добу вносило певні зміни. У периферичній крові в порівнянні з контролем нормалізувались показники лейкоцитарної формули, збільшувався вміст гемоглобіну в еритроцитах. Пептидний комплекс гемоглобіну посилював фагоцитарну активність нейтрофілів, нормалізував їх киснетворну функцію.

1. Williams D. A. The stem cell model of hematopoiesis. In: Hoffman R., Benz E., Shattil S., et al. Hematology: Basic Principles and Practice. Baltimore: Williams & Wilkins.— 1995.— P. 92—180.
2. Miller A. M. Hematopoietic growth factor in autologous bone marrow transplantation. Semin. Oncol.— 1993.— № 20.— P. 88—95.
3. Нагоев Б. С. Модификация цитохимического метода восстановления НСТ // Лаб. дело.— 1983. № 1.— С. 23—24.
4. Посібник з експериментально-клінічних досліджень в біології та медицині // 1. П. Кайдашев, О. В. Катрушов, Л. В. Беркало та ін.— Полтава, 1997.— 271 с.

5. Жербин Е. А., Чухловин А. Б. Радиационная гематология.— М.: Медицина — 1989.— 176 с.
6. Miller R. A., Britigan B. E. The formation and biologic significance of phagocyte — derived oxidants // J. Invest. Med.— 1995, № 43 (1).— P. 39—49
7. Harfield P. J., Robinson J. M. Arachidonic acid stimulates NADPH oxidase — mediated O₂ generation by intact neutrophils independent of protein kinase activation // J. Cell Biol.— 1990.— 111, N5.— p. 49.
8. Kaneko Y., Tsucamoto A. Thapsigargin — induced persistent intracellular calcium pool depletion and apoptosis in human hepatoma cells // Cancer Lett. 1994.— Vol.79, №2 — P. 147—155.

Zaporozhets T. M.

THE MODIFICATION OF THE BLOOD SYSTEM POST-RADIATION REACTION BY THE COMPLEX OF HEMOGLOBIN PEPTIDE FRAGMENTS

The research is devoted to the study of hemoglobin peptide fragments' complex influence upon the peripheral blood state and neutrophils' functional activity in the conditions of the extracorporeal γ — radiation of animals.

The introduction of the hemoglobin peptide fragments' complex to the irradiated animals normalized the differential count data? increased the hemoglobin content in erythrocytes? strengthened neutrophil phagocyte activity.