

Запорожець Т. М.

ВПЛИВ КОМПЛЕКСУ ПЕПТИДНИХ ФРАГМЕНТІВ ГЕМОГЛОБІНУ НА ПЕРЕБІГ ГЕМОЛІТИЧНОЇ АНЕМІЇ

Стаття присвячена вивченню впливу комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на перебіг гемолітичної анемії, викликаной сірчаноокислим фенілгідразиним. Дія хімічного гемолітика фенілгідразину сприяла розвитку анемії. Гемоліз еритроцитів проходив з участю активних форм кисню при підвищенні кисеньактивуючої дії нейтрофілів та підвищенні у крові концентрації білірубіну.

Введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну посилювало дозрівання клітин еритроїдного ряду за рахунок гіперплазії та можливо мітозу пронормобластів і базофільних нормобластів. У периферичній крові підвищився вміст гемоглобіну, нормалізувались процеси фагоцитозу та дихального вибуху нейтрофілів.

Біологічна активність пептидних комплексів, добутих з різних органів тварин, є предметом уваги останнього десятиріччя [1]. Останнім часом велика увага приділяється коротким (менше 20 амінокислотних залишків) біологічно активним пептидам, які утворюються внаслідок фрагментації гемоглобіну [2]. Порушення фрагментації гемоглобіну виявлені Півник А. В. у співавторстві в онкологічних хворих, що може сприяти порушенню механізмів протипухлинного захисту [3]. Попередніми наши-

ми дослідженнями встановлено біологічну активність продуктів протеолізу гемоглобіну [4]. Але потребує вивчення протективна дія комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну при реакції еритролієзу. Оскільки реакція еритролієзу спостерігається при дії багатьох екстремальних факторів (механічна, теплова енергія, ультразвук, крововтрата, антигенна стимуляція, різні гемолітичні отрути), ми відтворили гемолітичну анемію внаслідок інтоксикації сірчаноокислим фенілгідразиним

ном. Тому метою роботи стало вивчення впливу пептидних комплексів, добутих з гемоглобіну, на перебіг гемолітичної анемії, що викликана сірчано-кислим фенілгідразинном.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на 30 щурах популяції Вістар масою 150—180 г., поділених натри групи. Перша група — інтактні (10), друга група — контрольні тварини (10), у яких було відтворено гостру форму фенілгідразинової анемії шляхом трикратного, через добу, підшкірного введення 2 % водного розчину сірчано-кислого фенілгідразину (0,25 мл на 100 г маси тіла) і паралельним введенням 0,9 % апірогенного розчину натрію хлориду. Третя група — дослідні тварини (10), яким вводили внутрішньом'язово пептидний комплекс гемоглобіну в дозі 1 мг на 1 кг маси тіла протягом 7 діб з протективною метою і потім ще 7 діб, паралельно з підшкірним введенням 2 % водного розчину сірчано-кислого фенілгідразину (0,25 мл на 100 г маси тіла).

Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну отримували з еритроцитів донорської крові людей за власною методикою. Екстракцію гідролізату еритроцитів проводили за допомогою оцтової кислоти у співвідношенні 1 : 3 із вмістом 0,1 % хлориду цинку і 0,1 % хлориду магнію з наступною очисткою шляхом гельфільтрації для вилучення пептидів з молекулярною масою менше 10 кД. Такий пептидний екстракт давав позитивну біуретову реакцію, мав спектр поглинання в УФ-області з

максимумом 210—220 нм, характерний для пептидного зв'язку.

При проведенні досліджень у крові визначали вміст ретикулоцитів, кількість еритроцитів та гемоглобіну за стандартними методиками, концентрацію прямого, непрямого і загального білірубину в сироватці крові [5], кінетику накопичення продуктів реагуючих з тіобарбітуровою кислотою — показник перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) [6], спонтанний гемоліз еритроцитів [7], активність каталази [8], вміст церулоплазміну [9]. Також визначали активність фагоцитозу та тест відновлення нітросинього тетразолія (НСТ-тест), який відображає кисеньутворюючу функцію нейтрофілів [10]. Для оцінки морфологічної картини мазки периферичної крові забарвлювали за Романовським-Гимзе [11]. Для підрахунку деяких показників міслограми використовували пунктат кісткового мозку, мазок забарвлювали кольором Мая-Грюнвальда-Романовського і підраховували за загальноновизнаними методами. Отриманий цифровий матеріал був статистично оброблений з використанням коефіцієнта Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення

Як показали дослідження, у щурів, що отримували фенілгідразин у крові відмічали ретикулоцитоз, наявність мікросфероцитів та еритроцитів з тільцями Жолі, зниження кількості еритроцитів у 4,2 рази ($p < 0,01$) та гемоглобіну у 2,6 рази порівняно з інтактними тваринами (табл. 1).

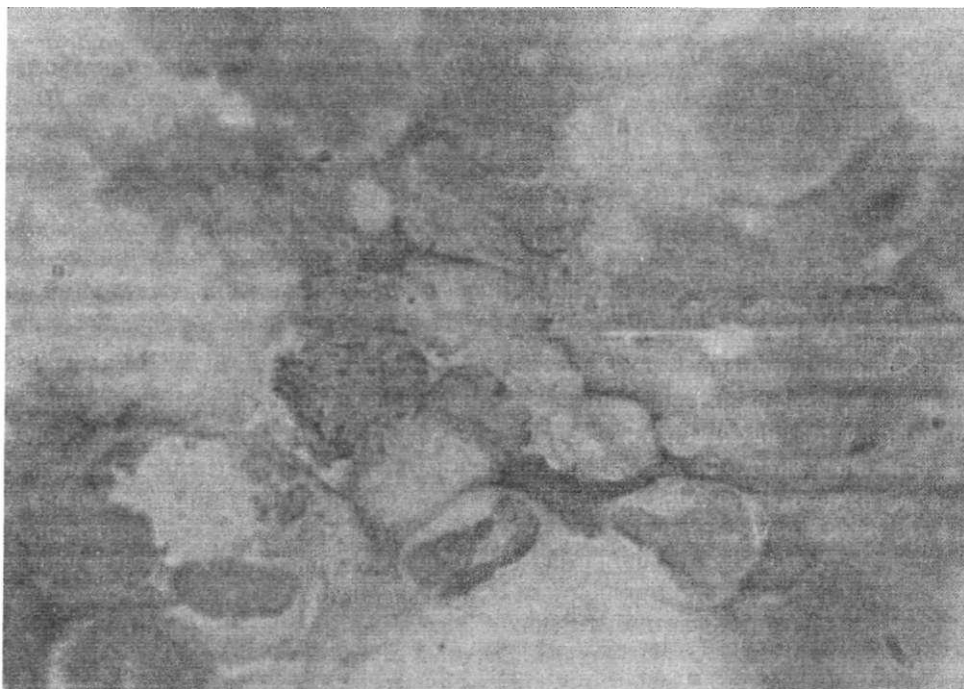


Рис. 1. Картина пунктату кісткового мозку за умов фенілгідразинової анемії. Переважають базофільні та поліхроматофільні еритро-нормобласти. Об. 40, ок. 10

Дослідження кістковомозкового пунктату виявило реактивну гіперплазію еритробластної тканини з підвищеним еритропоезом у контрольних тварин (рис. 1).

У тварин, яким вводили розчин сірчанокислого фенілгідазину, відмічено нормобластоз за рахунок поліхроматофільних нормобластів (кількість клітин зростала у 2,8 рази порівняно з інтактними тваринами ($p < 0,05$) (табл. 1).

Протективна та корегуюча дія пептидів гемоглобіну у тварин третьої групи порівняно з другою групою проявлялась у відсутності еритроцитів з тільцями Жолі, зменшенні кількості ретикулоцитів в 1,5 рази ($p < 0,05$), при збільшенні числа еритроцитів та вмісту гемоглобіну, але величини цих показників не досягали норми. У дослідних тварин залишалась вираженою еритронормобластна реакція з підвищеним числом поліхроматофільних та базофільних нормобластів.

Враховуючи, що гемолітична анемія супроводжується прискореним руйнуванням еритроцитів, порушенням їхніх функцій, процесів обміну в клітинах, що неминує, відбивається і на обміні гемоглобіну, ми дослідили вміст білірубину, який утворюється в процесі розпаду гемоглобіну (табл. 2).

Як видно з таблиці 2, у контрольних тварин порівняно з інтактними, концентрація загального білірубину зростала в 1,8 рази ($p < 0,05$), концентрація прямого білірубину — в 3,4 рази ($p < 0,05$), концентрація непрямого білірубину у 1,4 рази ($p < 0,05$). Введення пептидного комплексу гемоглобіну не впливало на рівень білірубину у сироватці крові дослідних тварин.

Як відомо, дуже чутливою системою, яка неспецифічно реагує на різноманітні чинники, є ПОЛ та система антиокислювальних ферментів. Як видно з таблиці 3, в крові щурів після введення розчину сірчанокислого фенілгідазину підвищувалось накопичення малонового діальдегіду (МДА) у мембранах еритроцитів у 4,0 рази ($p < 0,01$), на фоні зниження активності одного з основних еритроцитарних захисних ферментів — супероксиддисмутази (СОД) у 1,5 рази ($p < 0,01$), підвищувався рівень реактанта "гострої фази" запалення — церулоплазміну в 1,45 рази ($p < 0,01$). У контрольних тварин порівняно з інтактними, активність нейтрофілів за показниками фагоцитозу була вірогідно знижена на 15,5 % ($p < 0,05$), тоді як здатність нейтрофілів відновлювати нітросиній тетразолій зростала на 42,0 % ($p < 0,01$). Все це характеризує розвиток синдрому пероксидації.

Внутрішньом'язове введення пептидного комплексу гемоглобіну суттєво не змінювало рівня ПОЛ в крові дослідних тварин. Залишались високими показники спонтанного гемолізу еритроцитів, рівень накопичення МДА в мембранах еритро-

цитів та концентрація церулоплазміну в сироватці крові. Концентрація СОД еритроцитів у тварин, які одержували пептидний комплекс, не змінювалась відносно контролю. Після введення пептидного комплексу в дозі 1 мг на 1 кг маси тіла, в порівнянні з контролем, нами спостерігалось підвищення фагоцитарної активності нейтрофілів на 11,1 % ($p < 0,05$) та нормалізація їх кисеньактивуючої функції.

Таким чином, дія хімічного гемолітика фенілгідазину сприяла гемолізу еритроцитів та розвитку анемії. Це підтверджувалось зниженням кількості еритроцитів периферичної крові та наявністю її патологічних форм (мікросфероцитів, еритроцитів з тільцями Жолі). Різке підвищення вмісту вторинних продуктів пероксидації у крові вказувало на участь активних форм кисню в процесі руйнування еритроцитів при дії таких ксенобіотиків, як гідазин [12]. Підтвердженням гемолітичної жовтяниці є суттєве підвищення у крові концентрацій білірубину. Існує майже пряма залежність між рівнем розпаду гемоглобіну і кількістю вільного (непрямого) білірубину. Зростання концентрації зв'язаного (прямого) білірубину вказувало на порушення видільної функції печінки [13].

Зміни еритроцитів можливо розцінювати, як посилений еритродієрез "стресових" еритроцитів [14]. Відомо, що підвищення функціонального навантаження на еритроцити при дії стресорів призводить до зміни поверхневих антигенів мембран еритроцитів та підвищення активності мононуклеарної фагоцитуючої системи (підвищення кисеньактивуючої функції нейтрофілів у контрольних тварин), сприяє елімінації із кровотока низькостійких популяцій еритроцитів [15]. При пошкодженні еритроцитів в циркуляцію потрапляють продукти їх розпаду, частина яких є еритропоетично активною. Біологічно активні продукти еритродієрезу стимулюють еритропоез [16]. Підтвердженням стимулюючого впливу продуктів розпаду еритроцитів на еритропоез є посилення еритронормобластної реакції з підвищеним числом поліхроматофільних нормобластів у контрольної групи тварин.

Введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну подіяло в першу чергу на пронормобласти, оскільки у кістковому мозку збільшився відсоток базофільних нормобластів. Тобто, посилилось дозрівання клітин еритропоезу за рахунок гіперплазії та можливо мітозу пронормобластів і базофільних нормобластів. У периферичній крові також підвищився вміст гемоглобіну при зменшенні частки ретикулоцитів, хоча до величин норми ці показники не дійшли. Про ефект пептидного комплексу гемоглобіну свідчило зменшення кількості мікросфероцитів та відсутність еритроцитів з тільцями Жолі. Але залишкова дія фенілгідазину сприяла елімінації великої частки еритроцитів на

Таблиця 1. Вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на деякі гематологічні показники шурів в умовах дії гемолітичної отрути

Показники, що вивчалися	Стат. показ.	Інтактні тварини n = 10	Контрольні тварини n = 10	Дослідні тварини n = 10
Еритробласти, %	M ± T	1,20 ± 0,20	1,00 ± 0,32	0,80 ± 0,37
Пронормобласти, %	M ± T	1,40 ± 0,24	1,45 ± 0,20	1,20 ± 0,37
Нормобласти:				
базофільні, %	M ± T	3,80 ± 1,07	5,00 ± 0,71*	6,80 ± 0,86*
поліхроматофільні, %	M ± T	9,00 ± 1,38	25,60 ± 1,03**	21,60 ± 1,21*
оксифільні, %	M ± T	2,00 ± 0,55	1,60 ± 0,51	1,00 ± 0,32
Ретикулоцити, %	M ± T	0,38 ± 0,13	2,32 ± 0,12**	1,58 ± 0,30*
Кількість еритроцитів x 10 ¹² /л	M ± T	4,52 ± 0,37	1,07 ± 0,07**	1,13 ± 0,10**
Гемоглобін, г/л	M ± T	108,40 ± 4,71	41,00 ± 0,63**	48,00 ± 2,90*
ШОЕ, мм/г	M ± T	1,90 ± 0,33	1,00 ± 0,09	1,20 ± 0,12
Кольоровий показник	M ± T	0,7 ± 0,05	0,17 ± 0,08**	1,31 ± 0,11**

Примітка: У цій та інших таблицях: (p < 0,05)*, (p < 0,01)** — достовірність відмінностей показників між інтактною і контрольною, між контрольною та дослідною групою тварин.

Таблиця 2. Вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на вміст білірубину в сироватці крові в умовах дії гемолітичної отрути

Показники, що вивчалися	Стат. показники	Інтактні тварини n = 10	Контрольні тварини n = 10	Дослідні тварини n = 10
Концентрація білірубину загального, мкмоль/л	M ± m	9,0 ± 0,49	16,76 ± 0,63	18,56 ± 0,49
прямого, мкмоль/л	M ± m	1,98 ± 0,10	6,74 ± 1,05*	5,32 ± 0,24
непрямого, мкмоль/л	M ± m	7,02 ± 0,46	10,02 ± 0,47	13,22 ± 0,34

Таблиця 3. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на пероксидацію крові в умовах дії гемолітичної отрути

Показники, що вивчалися	Стат. показники	Інтактні тварини n = 10	Контрольні тварини n = 10	Дослідні тварини n = 10
СГЕ %	M ± m	7,68 ± 0,67	9,72 ± 1,09	10,67 ± 1,01
Концентрація ТБК-активних продуктів мкмоль/л	M ± m	8,16 ± 0,62	49,03 ± 1,60**	44,35 ± 2,02**
Концентрація ТБК-активних продуктів після 1,5 годин інкубації, мкмоль/л	M ± m	14,10 ± 1,36	73,24 ± 5,16**	68,35 ± 2,15**
Накопичення МДА за час інкубації, мкмоль/л	M ± m	5,95 ± 1,67	23,93 ± 5,48**	24,43 ± 3,91
Активність СОД, %	M ± m	0,85 ± 0,07	0,55 ± 0,09**	0,53 ± 0,02**
Активність каталази, індекс	M ± m	2,53 ± 0,25	3,18 ± 0,05	3,22 ± 0,12
Концентрація церулоплазміну, мг/л	M ± m	212,46 ± 1,63	308,19 ± 5,19**	325,63 ± 14,62**
Фагоцитарний індекс, %	M ± m	66,00 ± 3,63	55,80 ± 2,69*	62,60 ± 1,54
НСТ-тест (індекс стимуляції)	M ± m	2,17 ± 0,16	3,09 ± 0,1188	2,48 ± 0,228

тлі лікування, залишилися молоді стійкі клітини, про що вказувала незмінність кількості еритроцитів, вмісту білірубину та вторинних продуктів пероксидації, як реакції на гемоліз та гіпоксію. Деяке

поліпшення структури та функцій еритроцитів супроводжувалось змінами у функціонуванні лейкоцитів. Так, нормалізувались процеси фагоцитозу та дихальний вибух нейтрофілів.

1. Кузник Б. И., Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Цитомедины.— С.-Петербург: Наука, 1998,— 304 с.
2. Гомазков О. А. Физиологически активные пептиды. Справочное руководство. Москва: ИПГМ, 1995.— 142 с.
3. Пивных А. В., Моисеева Т. П., Карпова И. Б. Изменения внутриэритроцитарного протеолиза гемоглобина при онкологических заболеваниях // Гематол. и трансфузиол.— 2000,— Т. 45.— № 4.— С. 14-18.
4. Запорожець Т. М. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на стан показників імунітету та експресію маннозо-вміщуючих мембранних структур лейкоцитів // Проблеми екології та медицини.— 1997.— № 1-2.— С. 38-40.
5. Комаров Ф. И., Коровкин Б. Ф., Меньшиков В. В. Биохимические исследования в клинике. Элиста. АПП. "Джангар".— 1998.— С. 116-118.
6. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах.— М.: Наука, 1972.— 252 с.
7. Спиричев В. Б., Матусис И. И., Брошштейн Л. М. Витамин Е // Экспериментальная витаминология.— Минск, Наука и техника.— 1979,— С. 18-57.
8. Архипова О. Г. Методы исследования в профпатологии.— М.: Медицина.— 1988,— 207 с.
9. Колб В. Г., Камышиников В. С. Клиническая биохимия (Пособие для врачей-лаборантов). Минск: Беларусь.— 1976.— 311 с.
10. Посібник з експериментально-клінічних досліджень в біології та медицині // Беркало Л. В., Боброва Н. О., Бобович І. О. та інші.— Полтава, 1997.— 271 с.
11. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В. В. Меньшикова.— М.: Медицина, 1987.— С. 140-145.
12. Губский Ю. И., Долго-Сабуров В. Б., Храпак В. В. Химические катастрофы и экология.— К: Здоров'я, 1993.— 224 с.
13. Давыдов А. А., Жидовинов Г. И., Адельшина Г. А. Взаимосвязь интенсивности свободно-радикального окисления с уровнем сывороточного билирубина при поражении гепатобилиарной системы // Клин. лаб. диагн.— 1998.— № 5.— С. 11-13.
14. Гольдберг Е. Д., Дыгай А. М., Удуд В. В. и др. Закономерности структурной организации систем жизнедеятельности в норме и при развитии патологического процесса / Изд. Томского университета.— Томск, 1996.— 282 с.
15. Маянский А. Н., Пикуза О. И. Клинические аспекты фагоцитоза. Изд. "Магариф", Казань, 993.— 191 с.
16. Катюхин Л. П. Реологические свойства эритроцитов. Современные методы исследования // Физиол. журнал им. И. М. Сеченова,— 1995.— Т. 81.— № 6.— С. 122-129.

Запорожець Т. М.

THE HAEMOGLOBIN PEPTIDE FRAGMENTS COMPLEX INFLUENCE ON THE NEMOLYTIC ANEMIA CURRENT

The clause is devoted to study of the haemoglobine peptide fragments complex action on the hemolytic phenylhydrazine sulphate anemia current. The chemical hemolytic phenylhydrazine action promoted anemia development. The erythrocytes hemolysis passed with the active oxygen forms participation at axygen-activating neutrophils action rising and bilirubin concentntration increasing in a blood.

The haemoglobin peptide complex application strengthened erythroid line cells maturation for the account of hyperplasia and probably pronormoblasts and basophilic normoblasts. In the peripheral blood the haemoglobin concentration has increased, the phagocytosis and neutrophils respiratory explosion processes were normalized.