

**Т.М. Запорожець, В.П. Міщенко, О.В. Саник**

## **Характеристика біологічної активності комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну**

*Изучено действие пептидных фрагментов гемоглобина в различных дозах на показатели системной гемодинамики, ЭКГ, зрительных вызванных потенциалов у здоровых животных. В дозе 10 мг/кг пептидный комплекс увеличивал время прохождения процессов деполяризации и реполяризации в желудочках миокарда, с возрастанием ударного объема крови. В дозе 1 мг/кг введение пептидного комплекса ускоряло проведение импульсов зрительной модальности по специфическим афферентным системам подкорковых и корковых отделов зрительного анализатора.*

### **Вступ**

Нині з екстрактів різних біологічних тканин вилучено близько 200 ендогенних фрагментів гемоглобіну. Залежно від типу тканин фрагменти гемоглобіну складають від 30 до 90% загальної кількості пептидів, які ідентифікували в екстрактах [1, 3, 6]. На важливість біологічних функцій фрагментів гемоглобіну вказує те, що при лімфосаркомі та раку легень спостерігаються порушення внутрішньоеритроцитарного протеолізу гемоглобіну, які призводять до збільшення вмісту окремих пептидних компонентів. Для кожного з цих захворювань виявлені певні зміни пептидного складу еритроцитів [5]. Таким чином, можливо припустити важливу роль ендогенних біологічно активних пептидів гемоглобіну в регуляторних процесах.

Ми вважали доцільним дослідити прямі та опосередковані ефекти пептидних фрагментів гемоглобіну на здорових тваринах.

Враховуючи практичний досвід вивчення природних пептидних речовин, які проводились на базі кафедри нормальної фізіології і Центральної науково-дослідної лабораторії Української медичної стоматологічної академії, ми використали блочний принцип скринінгових досліджень [4] для вивчення біологічної активності пептидного комплексу гемоглобіну. На першому етапі було проведено детермінуючий блок загального скринінгу, який поєднував електрофізіологічні та основні фізіологічні методи дослідження.

### **Методика**

Досліди проведено на 36 статевозрілих морських свинках із середньою масою 380 г., обох статей. Тварин поділили на 4 групи: 1-ша – контрольні, 2-га, 3-тя, 4-та – дослідні. Дослідним тваринам внутрішньом'язово вводили пептидні комплекси гемоглобіну в дозах: для 2-ї групи - 0,1 мг/кг, для 3-ї групи - 1 мг/кг, для 4-ї групи - 10 мг/кг протягом 10-ти діб. Отримані результати порівнювали з показниками контрольних тварин, яким вводили внутрішньом'язово 0,2 мл апірогенного фізіологічного розчину. Дослідження проводили на живих тваринах без використання наркотичних речовин.

© Т.М. Запорожець, В.П. Міщенко, О.В. Саник

Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну отримували за власною методикою за допомогою ферментативного гідролізу гемоглобіну. Екстракцію гідролізату проводили органічною галогенвміщуючою кислотою за наявності катіонів цинку та магнію з наступним осадженням пептидів органічним розчинником та очисткою гельфільтрацією для вилучення пептидів з молекулярною масою менше ніж 10 кДа. Препарат давав позитивну біуретову реакцію з максимумом спектра поглинання в УФ-ділянці (200-210 нм). Аналіз іонообмінної хроматографії встановив, що пептидний комплекс гемоглобіну розділявся на шість основних фракцій, час утримання був: 3, 12, 18, 27, 35, 39 хв.

Реєстрацію електрокардіограми та дослідження системної гемодинаміки проводили з використанням комп'ютерної системи "РЕО-КОМ" (м.Харків), створеної на базі реографа "RG-0010" і інтерфейса зв'язку з ЕВМ "ADC -0010".

Зорові викликані потенціали (ЗВП) реєстрували за допомогою комп'ютерного електроенцефалографа "DX-4000" (м.Харків). Для запису ЗВП активні електроди розміщували симетрично в потиличній ділянці (зорова проекція), референтні електроди розташовували на вухах, електрод заземлення - в лобовій частці. Спалах світла подавався з відстані 30 см. Для зменшення включення залишкового фонового - ритму у форму ЗВП використовували неритмічну стимуляцію з випадковими інтервалами від 1 до 2 с. Статистичну оцінку результатів проводили, використовуючи критерій t Стьюдента.

## **Результати та їх обговорення**

Внутрішньом'язове введення пептидного комплексу гемоглобіну в дозах 0,1 та 1 мг/кг не викликало змін в показниках ЕКГ. У дослідних тварин, які одержували ці дози пептидного комплексу, зберігався правильний синусовий ритм, про що свідчила наявність постійної форми зубця Р, синусового походження, який реєструвався перед комплексом QRS та постійність інтервалу R-R. Тривалість комплексу QRS і амплітуда зубця R, яка характеризує перебіг процесу деполяризації по м'язах шлуночків, у дослідних тварин не відрізнялась від показників у контрольних тварин. Процеси реполяризації шлуночків (амплітуда, тривалість зубця Т) зберігались на рівні контролю.

Введення дози 10 мг/кг призводило до зниження частоти серцевих скорочень в 1,4 раза порівняно з тваринами, яким вводили фізіологічний розчин. При цьому нами було відмічено збільшення тривалості серцевого циклу внаслідок видовження комплексу QRS (на 0,01 с,  $P<0,05$ ) і зубця Т (на 0,012 с,  $P<0,05$ ), при зниженні амплітуди зубця R на 0,1 мВ ( $P<0,01$ ), що свідчило про збільшення часу перебігу процесів деполяризації та реполяризації у шлуночках міокарда.

Аналіз показників тетраполяричних грудних реограм дав змогу виявити особливості стану системної гемодинаміки у здорових тварин, яким вводили комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну (рис.1).

При введенні комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну в дозі 0,1 та 1 мг/кг, ударний об'єм крові залишався в межах норми. Нами

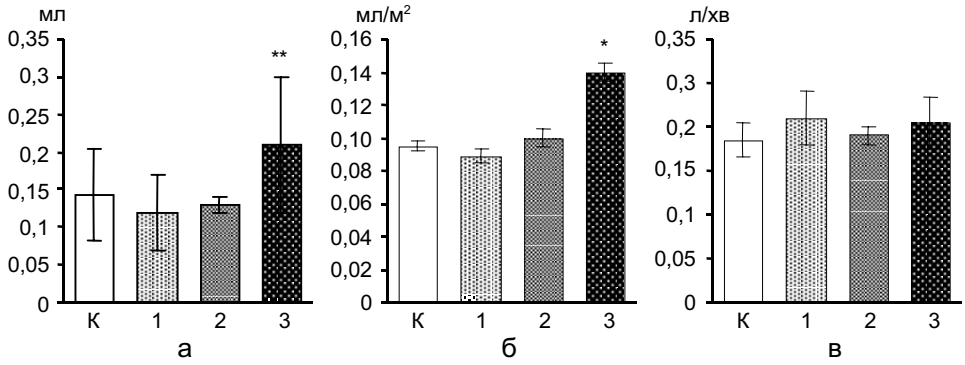


Рис.1. Показники грудної реограми у здорових тварин: а - ударний об'єм крові, б - ударний індекс, в - хвилинний об'єм крові при введенні пептидних фрагментів гемоглобіну 0,1 мг/кг (n=9) - (1), 1 мг/кг (n=9) - (2), 10 мг/кг (n=9) - (3). \* P< 0,05; \*\* P< 0,01 - порівняно з контрольними значеннями (К).

відмічена тенденція до збільшення ударного об'єму крові у тварин, яким вводили пептидний комплекс гемоглобіну в дозі 10 мг/кг.

Далі досліджували здатність комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну чинити рецепторну дію, що включало дослідження ЗВП. Викликані зорові потенціали записували у морських свинок після введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну в дозі 1 мг/кг. Як відомо, викликані потенціали являють собою сумачію елементарних електричних потенціалів нервових аксонів, дендритів та тіл нейронів.

Як видно з рисунка 2, у тварин до введення комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну, ЗВП містить низку послідовних коливань потенціалу, зростаючих за амплітудою зі збільшенням латентності. За цими компонентами йдуть декілька монотонних коливань, які складають післярозряд. Латентний період коркових ЗВП у здорових тварин становив 20 мс. Найбільш ранні компоненти (до 20 мс після стимулу) мають низьку амплітуду і зумовлені

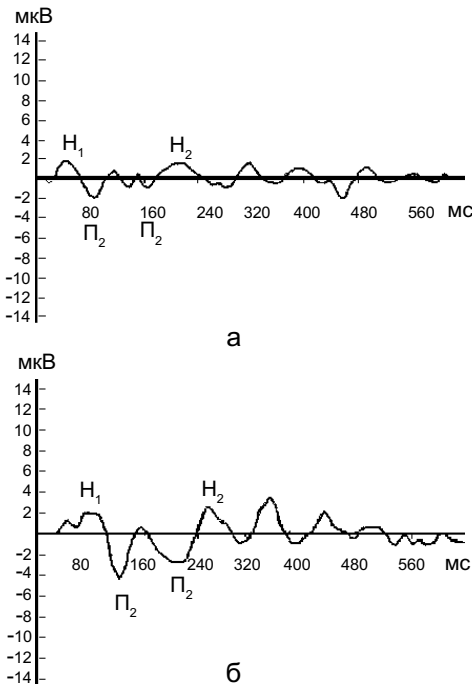


Рис.2. Зорові викликані потенціали у контрольних тварин (а) та у тварин (б) після введення пептидного комплексу гемоглобіну в дозі 1 мг/кг : П<sub>1</sub> - перший позитивний компонент ЗВП, П<sub>2</sub> - другий позитивний компонент ВП, Н<sub>1</sub> - перший негативний компонент ЗВП, Н<sub>2</sub> - другий негативний компонент ЗВП.

екстракортикальним джерелом, який включає периферичні нервові провідники, перший і другий аферентний нейрон зорового аналізатора (нейрони сітківки ока, зорові нерви і тракти).

Основні компоненти належать безпосередньо кірковому викликано-му потенціалу, який виникає внаслідок імпульсів із специфічних та неспецифічних таламічних ядер, ретикулярної формації, підкіркових ядер. Перші основні компоненти зареєстровані з 40 мс і мають позитивну (П1) та негативну (Н1) хвилі з амплітудами 4 і 1 мкВ відповідно. Другі компоненти П2 і Н2 мали амплітуди 3 і 2,5 мкВ відповідно. Компоненти в ділянці від 300 мс зумовлені неспецифічним аферентним притоком від ретикулярних структур таламічних ядер та медіобазальних структур лімбічної кори [2], мали амплітуди позитивної хвилі - 1,2 мкВ, негативної хвилі - 3,8 мкВ.

Введення внутрішньом'язово комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну в дозі 1 мг/кг призводило до зменшення площі ЗВП з 574 до 271 мкВ/мс. Латентний період скорочувався до 10 мс. Перші основні компоненти (з 20 мс) мали амплітуди позитивної хвилі 0,3 мкВ та негативної хвилі 2,4 мкВ. Другі компоненти П2 і Н2 реєструвалися з 70 мс і мали амплітуди 2 і 0,2 мкВ відповідно. Післярозряд складався із більш високоамплітудних коливань ніж у контрольних тварин. Скорочення латентного періоду ЗВП під впливом пептидного комплексу гемоглобіну свідчить про прискорення синаптичної передачі нервових імпульсів.

Таким чином, отримані результати доводять здатність комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну впливати в максимальній дозі на перебіг напрямку електрорушійної сили збуджених ділянок міокарда, збільшуючи час перебігу процесів деполяризації і реполяризації у шлуночках міокарда. Ці зміни відображались в кардіодинаміці збільшенням ударного об'єму крові. Пептидний комплекс мав рецепторний тип дії, про що свідчило збільшення швидкості проведення імпульсів зорової модальності по специфічним аферентним системам підкіркових та кіркових відділів зорового аналізатора.

**T.N.Zaporozhets, V.P.Mistchenko, A.V.Sanyk**

### **THE RESEARCH OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF HEMOGLOBIN PEPTIDE FRAGMENTS IN ACCORDANCE WITH DETERMINATING BLOCK OF GENERAL SCREENING**

There were studied the influence of hemoglobin peptide complex in different doses on indexes of systemic hemodynamics, ECG and visually cased potentials in healthy animals. In the dose of 10 mg/kg the peptide complex prolonged the time of the course of depolarization and repolarization processes on the miocardial ventricles with the increase of the systolic blood volume. In the dose of 1 mg/kg the introduction of the peptide complex accelerated the conduction of visual modality stimuli on the specific afferent systems subcortex and cortex divisions of visual analyzer.

*Ukrainian Medical Dental Academy,*

*Health Protection Ministry of Ukraine, Poltava*

**СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. *Гомазков О.А.* Физиологически активные пептиды .-М.: - 1995.-143 с.
2. *Зенков Л.П., Ронкин М.А.* Функциональная диагностика нервных болезней.-М.: Медицина,1991.-250 с.
3. *Иванов В.Т., Карелин А.А., Михалева И.И.* и др. Нейтральная фракция низкомолекулярних пептидов гемоглобина //Биоорган.химия.-1992.- **18**.- С.1271-1311
4. *Кайдашев И.П., Катрушов А.В.* Методические подходы к проведению скрининга биологической активности пептидных веществ// Пробл. екології та медицини.-1997.- 1, N 1-2.-С.12-17.
5. *Пивник А.В., Моисеева Т.Н., Карпова И.В.* и др. Изменения внутриэритроцитарного протеолиза гемоглобина при онкологических заболеваниях // Гематология и трансфузиология.- 2000.- **45**, N4.-С.14-18.
6. *Vaskavsky B.V., Kishinevsky R.N., Mikhaleva I.I.* et al. Bioactive peptides from bovine pineal gland and bone marrow extracts//Chemistre of peptides and proteins / Eds.Brandenburg, Ivanov, vaelter.Vol. 5-6, part B.DWT Reports/ Aachen, 1993 .- P.309-316.

*Укр. мед. стомат. академія,  
Полтава*

*Матеріал надійшов  
до редакції 27.08.99*