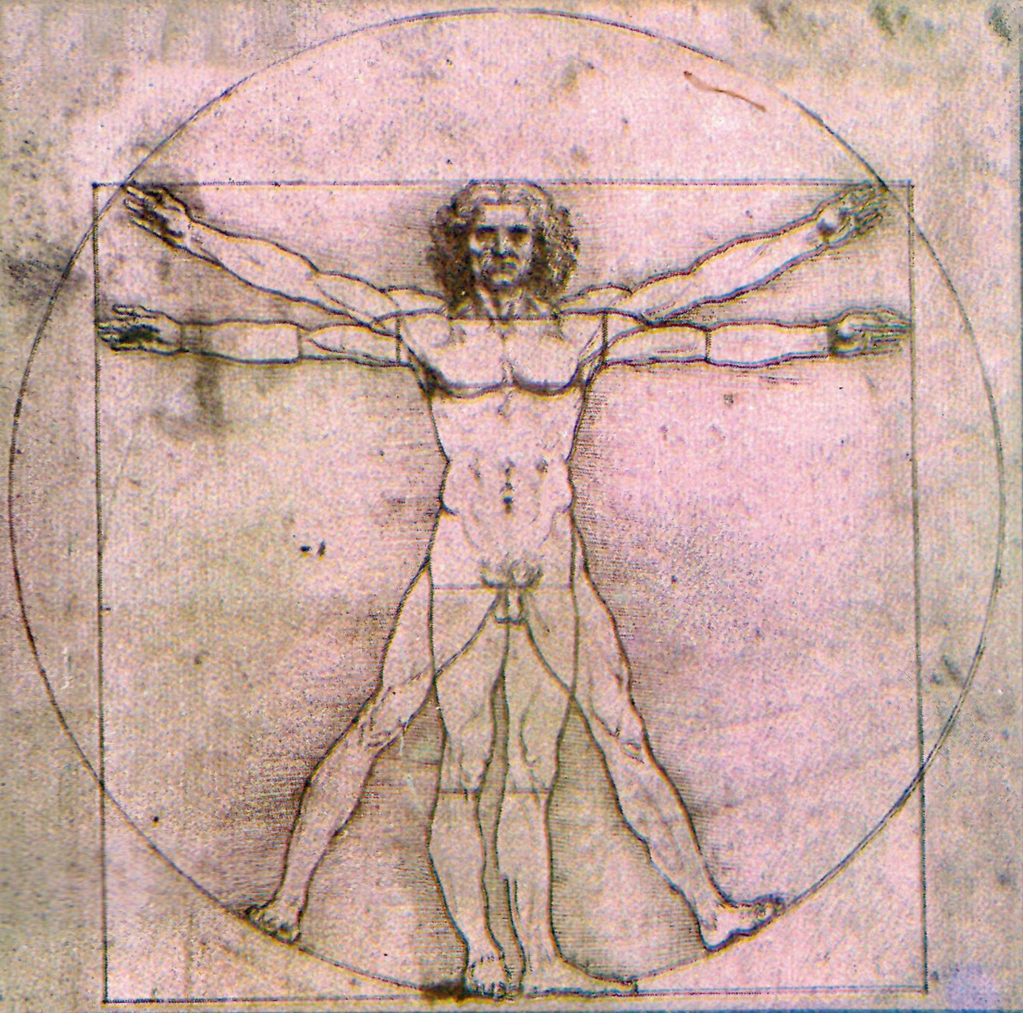


7 1 2001

Травень 2001

# ВІСНИК МОРФОЛОГІЇ

## REPORTS OF MORPHOLOGY



Видавник  
Вінницький державний  
медичний університет  
ім. М.І.Пирогова

Т.М.Запорожець

Українська медична стоматологічна академія, м.Полтава

## КОРЕКЦІЯ ПРОЦЕСІВ АПОПТОЗУ В КІСТКОВОМУ МОЗКУ КОМПЛЕКСОМ ПЕПТИДНИХ ФРАГМЕНТІВ ГЕМОГЛОБІНУ ПРИ ХРОНІЧНОМУ ОТРУЄННІ СВИНЦЕМ

### Ключові слова

Apoptosis  
Haemoglobin peptide complex  
Plumbum

### Резюме

*The present work was carried out to study mechanisms controlling interrelations: microelements (plumbum) - marrow cells apoptosis - polypeptide haemoglobin fragments. The immunohistochemical analysis shows that the chronic plumbum salts application causes the oncoprotein bcl-2 expression reducing and internucleosomal bone - marrow cells DNA fragmentation. The haemoglobin peptide complex application decreased the oligonucleosomal DNA fragmentation and intensified bone-marrow cells protein bcl-2 expression in animals under the chronic lead salt intoxication conditions.*

### Вступ

Як відомо, солі свинцю мають певну тропність до системи крові: скорочують життя еритроцитів, гальмують синтез гемоглобіну (блокуючи порфобіліногенсинтетазу - дельта-амінолевулінатдегідратазу) та  $\alpha$ -ланцюгів гемоглобіну [Авцын с соавт., 1991]. Солі свинцю, як і деяких інших металів, відносяться до канцерогенних і токсичних речовин. Зі стрес-індукованою дією свинцю пов'язують експресію генів металотіонеїнів [Кудрин, Жаворонков, 1998]. Ці білки здатні захищати клітини (в тому числі і пухлинні) від вільнорадикального пошкодження і від мембранотоксичної дії лікарських препаратів. Тому металотіонеїни можуть запобігати як некрозу, так і апоптозу [Kane et al., 1993]. Водночас свинець може виступати в ролі апоптогенного стимулу. За даними літератури [Кудрин, Жаворонков, 1998] у хворих після хронічного отруєння солями свинцю зростає рівень фактору некрозу пухлини у сироватці крові.

Попередніми дослідженнями [Запорожець, 1999] нами була відмічена здатність комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну впливати на процеси проліферації і диференціювання, стабілізацію мембрани еритроцитів. Тому метою дослідження стало вивчення впливу отриманого нами комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на апоптоз гемопоетичних клітин кісткового мозку при хронічному отруєнні свинцем.

### Матеріали та методи

Дослідження були проведені на 26 статевозрілих мурчачах з середньою масою 360г. Тварин поділили на 3 групи: інтактну (10), контрольну (7), дослідну (9). Мурчачки контрольної групи отримували розчин 4% розчину ацетату свинцю з розрахунку 60 мг/кг маси тіла на добу на протязі 27 днів [Архипова, 1961], а останні 7 діб їм внутрішньом'язово вводили 0,2 мл 0,9% апірогенного розчину хлориду натрію. Мурчачки дослідної групи також отримували 27 днів ацетат свинцю в дозі 60 мг/кг маси тіла на добу, а останні 7 днів інтоксикації їм внутрішньом'язово вводили пептидний комплекс, добутий з гемоглобіну у дозі 1 мг/кг маси тіла на добу у 0,2 мл фізіологічного розчину.

Комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну отримували за власною методикою шляхом ферментативного гідролізу гемоглобіну. Екстракцію гідролізату проводили за до-

помогою оцтової кислоти у співвідношенні 1:3 в присутності 0,1% хлориду цинку і 0,1% хлориду магнію з наступною очисткою шляхом гел'яфільтрації для вилучення пептидів з молекулярною масою менше 10 кД. Препарат давав позитивну біуретову реакцію з максимумом спектра поглинання в УФ-області (200-210 нм).

Маркер апоптозу онкопротеїн bcl-2 визначали універсальним імуногістохімічним стрептавідин-пероксидазним методом [Глузман с соавт., 1993] на парафінових зрізах кісткового мозку. В якості перших антитіл використовували моноклональні антитіла до bcl-2 ("Dako" N-Series Mouse ANTI-HU $\beta$ :AN bcl-2 oncoprotein, 124). В якості других антитіл до bcl-2 використовували біотиновані антитіла козла до імуноглобулінів миші ("Sigma" Anti-Mouse Immunoglobulins Biotin Conjugate). Для зв'язування біотину користувались третіми антитілами ExtrAvidin Peroxidase Conugate "Sigma". Для цитохімічного визначення активності пероксидази, отримані зрізи кісткового мозку відмивали та інкубували в розчині хромогену діамінобензидіну. В контрольних реакціях на зрізи, замість перших антитіл, наносили Negative Control "Dako". Враховували інтенсивність (за середнім цитохімічним коефіцієнтом СЦК) і розповсюдженість (за процентом клітин з маркером апоптозу bcl-2) зафарбованого продукту реакції, котрий проявляли діамінобензидіном тетрахлоридом.

Міжнуклеосомну фрагментацію ДНК виявляли шляхом електрофорезу в 1,8% агарозному гелі. ДНК вилучали за методом [Asuma et al., 1995]. Після пофарбування етідіумом бромідом гел'я фотографували в ультрафіолеті. Статистичну оцінку результатів проводили, використовуючи критерій Ст'юдента.

### Результати

За умов хронічної інтоксикації солями свинцю, нами виявлені численні зміни в структурі ДНК, нуклеосомній організації хроматину. При електрофоретичному аналізі зразків ДНК кісткового мозку тварин отруєних солями свинцю, відмічено фрагментацію ДНК у вигляді "драбини". Спостерігається більша кількість смуг, які розташовані далі від старту, у порівнянні з електрофореграмою інтактних тварин. Введення тваринам пептидного комплексу гемоглоб-

іну знижувало ступень фрагментації ДНК (основна частина фрагментів знаходилась ближче до старту, зменшувався відсоток фрагментованої ДНК).

Імуноцитохімічними дослідженнями встановлено, що рівень експресії bcl-2 у клітинах кісткового мозку тварин після хронічної інтоксикації солями свинцю, був значно нижче, ніж у інтактних тварин (табл. 1).

**Таблиця 1.** Вплив комплексу пептидних фрагментів гемоглобіну на експресію онкопротеїну bcl-2 у клітинах кісткового мозку мурчаків за умов хронічної свинцевої інтоксикації.

Маркер апоптозу bcl-2	Статист. показники	Групи тварин		
		Інтактні тварини, n=10	Контрольні тварини, n=7	Дослідні тварини, n=9
% клітин, які несуть маркер апоптозу	M	46,9	39,2	72,4
	±m	6,21	3,26	14,68
	P1		<0,05	<0,01
	P2			<0,01
СЦК	M	0,59	0,41	0,82
	±m	0,08	0,06	0,24
	P1		<0,05	<0,01
	P2			<0,01

**Примітка:** p<sub>1</sub> - достовірність відмінності показників між інтактною та контрольною групами; p<sub>2</sub> - достовірність відмінностей показників між контрольною і дослідною групами.

У тварин, яким вводили розчин оцтовокислого свинцю, кількість клітин, що несли маркер апоптозу bcl-2, зменшилась на 16,42%, (p<0,05), а середній цитохімічний коефіцієнт зменшився на 30,51%, (p<0,05), відносно інтактної групи тварин. Встановлена експресія протеїну bcl-2 у клітинах кісткового мозку мурчаків, яким вводили розчин оцтовокислого свинцю.

У тварин, яким поряд з розчином оцтовокислого свинцю вводили комплекс пептидних фрагментів гемоглобіну, процент клітин з маркером апоптозу bcl-2 відносно контролю збільшився на 11,8% (p<0,01), а СЦК збільшився на 20,6%, (p<0,05). Встановлена експресія протеїну bcl-2 у клітинах кісткового мозку мурчаків, які поряд з розчином оцтовокислого свинцю вводили пептидний комплекс гемоглобіну.

## Література

- Архипова О.Г. Влияние CaNa<sub>2</sub> диэтилен-триаминпептауксусной кислоты на введение свинца в условиях хронической интоксикации. Токсикология новых промышленных химических веществ /Под ред. А.А.Летавета.- М.: Медгиз, 1961.- С.142-148.
- Глузман Д.Ф., Абраменко И.В., Склярченко Л.М. Писнячевская Г.В. Иммуноцитохимическая диагностика злокачественных экссудатов.- К.: Наукова думка, 1993.- С.133-140.
- Запорожець Т.М. Вплив пептидних фрагментів гемоглобіну на морфофункціональні показники периферичної крові за умов фенілгідразинської анемії //Вісник проблем біології та медицини.-1999.- №13.- С.128-132.
- Кудрин А.В., Жаворонков А.А. Роль микроэлементов и кальция в регуляции апоптоза //Успехи совр. биологии.- 1998.- Т.118.- С.623-629.
- Микроэлементозы человека /А.П.Авцын, А.А.Жаворонков, М.А.Риш, Л.С.Строчкова.- М.: Медицина, 1991.- 496 с.
- Ярилин А.А. Апатоз, природа феномена и его роль в целомном организме //Пат. физиология и эксперим. терапия.- 1998.- № 2.- С.38-48.
- Asuma G., Sato G., Kizaki H. Effects of protein Tyrosine Kinase inhibitors with/Different Modes of Action on Teroisomerase activity and Death of IL-2dependent CTLL-2 cells // J.Biochem.- 1995.- № 118.- P.312-318.
- Bcl-2 Inhibition of Neuras Cell Deth: Decreased Generation of Oxygen Species /D.Kane, T.Sarafian, R.Antin, T.Pater.- 1993.- Vol.262.- P.1274-1277.
- Hsu B., Marin M., Brishay S. Weiss S. Tpression of bcl-2 gene confers multidrug resistance to chemotherapy-induced cell death //Cancer Bull.- 1994.- Vol.46, №2.- P.125-129.