

# РОЛЬ СРЕДНЕМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ В АГРЕГАЦИИ КЛЕТОК КРОВИ В ОСТРЫЕ ПЕРИОДЫ ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНИ

УДК 616—001.17—002.3:616.15—018

Поступила 16.09.2010 г.



**М.Н. Егорихина**, младший научный сотрудник отделения гравитационной хирургии и гемодиализа;  
**Г.Я. Левин**, д.м.н., профессор, руководитель отделения гравитационной хирургии и гемодиализа,

Нижегородский НИИ травматологии и ортопедии, Н. Новгород

**Цель исследования** — изучить влияние концентрации среднемолекулярных пептидов (СМП) на агрегацию тромбоцитов и эритроцитов у тяжелообожженных больных.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 34 образцах крови здоровых людей и на 30 образцах крови тяжелообожженных больных. Определяли уровень СМП, а также креатинина, мочевины. Для выделения СМП использовали микроцентрифужные пробирки Amicon Ultra-4.

**Результаты.** Установлено, что повышение уровня молекул средней массы, выделенных из плазмы крови больных в острый период ожоговой болезни, вызывает прогрессивное возрастание агрегации тромбоцитов здоровых доноров. Возрастание агрегации эритроцитов в этих условиях наблюдается лишь при очень высоких концентрациях СМП. Креатинин и мочевина практически не оказывают влияния на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов и агрегацию эритроцитов здоровых доноров, а в очень высоких концентрациях, наблюдающихся при острой почечной недостаточности, даже снижают спонтанную агрегацию тромбоцитов.

**Заключение.** Одной из причин снижения агрегации тромбоцитов под действием гемосорбции при ожоговой болезни может являться уменьшение под ее влиянием концентрации СМП.

**Ключевые слова:** агрегация тромбоцитов, агрегация эритроцитов, среднемолекулярные пептиды, креатинин, мочевина, ожоговая болезнь.

## English

## The role of the midmolecular peptides in the blood cell aggregation in acute periods of a burn disease

**M.N. Egorikhina**, Junior Research Worker of the Department of Gravitational Surgery and Hemodialysis;  
**G.Ya. Levin**, MD, Professor, Head of the Department of Gravitational Surgery and Hemodialysis,

Nizhny Novgorod Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Nizhny Novgorod

**The aim** of the investigation is to study the effect of midmolecular peptide (MMP) concentration on platelet and erythrocyte aggregation in severe burned patients.

**Materials and methods.** The investigation was carried out on 34 blood samples of healthy people and 30 blood samples of severe burned patients. There was determined the level of MMP, as well as that of creatinine, and urea. The "Amicon Ultra-4" microcentrifuge tubes were used to isolate MMP.

**Results.** The level increase of average mass molecules isolated from the blood plasma of patients in an acute period of a burn disease has been stated to cause a progressive increase of platelet aggregation of healthy donors. The erythrocyte aggregation increase in such conditions is observed only in very high MMP concentrations.

Для контактов: Егорихина Марфа Николаевна, тел. раб. 8(831)436-21-80, тел. моб. +7 903-657-09-59; e-mail: egorihina@rambler.ru.

Creatinine and urea do not practically effect the ADP-induced platelet aggregation and the erythrocyte aggregation of healthy donors, and even decrease spontaneous thrombocyte aggregation in very high concentrations occur in an acute renal insufficiency.

**Conclusion.** One of the reasons of platelet aggregation decrease under the influence of chemisorption in a burn disease can be the decrease of the MMP concentration in response to chemisorption.

**Key words:** platelet aggregation, erythrocyte aggregation, midmolecular peptides, creatinine, urea, burn disease.

В основе патогенеза острых периодов ожоговой болезни лежат нарушения микроциркуляции [1—3]. Их основной причиной является резкое повышение агрегации клеток крови [4—7]. Известно, что изменение агрегации клеток крови может быть связано с влиянием как плазменных, так и клеточных факторов [8—13]. Ранее нами было показано [14—15], что добавление донорской плазмы к клеткам, выделенным из крови ожоговых больных, практически полностью нормализует их агрегацию, а плазма крови ожоговых больных вызывает увеличение спонтанной агрегации эритроцитов и тромбоцитов здоровых людей до уровня, наблюдаемого у тяжелообожженных пациентов. Было доказано, что основной причиной усиления агрегации эритроцитов и тромбоцитов при ожоговой болезни является изменение физико-химических свойств плазмы крови и выявленные изменения агрегации клеток крови практически полностью обратимы.

В составе плазмы крови ожоговых больных присутствует большое количество различных факторов, которые могут обладать проагрегатными свойствами. Для определения тактики терапии, направленной на коррекцию микроциркуляторных нарушений при термической травме, необходимо иметь представление о роли и механизме агрегационного действия каждого из этих факторов.

Общеизвестно, что уже с первых часов после термической травмы развивается эндогенная интоксикация. Резкая активация протеолиза («протеазный взрыв») приводит к увеличению количества среднемолекулярных пептидов (СМП) в крови больных [16—20]. Именно они являются одной из основных групп эндотоксинов, обуславливающих развитие токсемии при ожоговой болезни. СМП оказывают влияние на деятельность всех систем и органов, так как по своему строению близки к регуляторным пептидам. В составе СМП обнаружены вещества, имеющие высокую биологическую активность: паратгормон, нейротоксин X, ингибитор глюконеогенеза, ингибиторы клеточной пролиферации и бласттрансформации лимфоцитов, фагоцитоза и гемопоэза, ингибиторы аминокислотного транспорта, синтеза гемоглобина, факторы, приводящие к разобщению окислительного фосфорилирования и снижению пула АТФ, вещества, способные связывать двухвалентные ионы кальция и нарушать  $Ca^{2+}$ -зависимые процессы, и др. [21—26]. В экспериментальных исследованиях на животных с термическим ожогом Б.М. Вальдманом и соавт. [27] показано, что СМП вызывают нарушения процессов микроциркуляции, воздействуя на диаметр сосудов, микроциркуляторное русло, скорость кровотока и проницаемость сосудов.

Однако несмотря на обширные исследования, посвященные молекулам средней массы, до сих пор остается неясным, в какой мере они влияют на агрегацию клеток крови в острые периоды ожоговой болезни.

**Цель исследования** — изучить влияние концентрации среднемолекулярных пептидов тяжелообожженных больных на агрегацию тромбоцитов и эритроцитов в острые периоды ожоговой болезни.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на образцах крови 34 здоровых людей и 30 больных ожоговой болезнью, находившихся в остром периоде (ожог II, III и IV степени, более 15% поверхности тела).

Спонтанную агрегацию тромбоцитов и эритроцитов исследовали на приборе собственной конструкции [28], в котором использован принцип, предложенный Н. Schmid-Schonbain с соавт. [29]. В данном приборе клетки крови помещают в камеру между двумя плоскопараллельными пластинами, вращающимися навстречу друг другу. Спонтанную агрегацию тромбоцитов оценивали в условиях сдвигового потока с видеозаписью процесса агрегации и последующей компьютерной обработкой полученных микрофотоснимков. Процесс агрегации эритроцитов регистрировали на самописце (по изменению оптической плотности) после гидродинамического перемешивания суспензии клеток и остановки вращения.

Индукцированную АДФ ( $2 \cdot 10^{-5}$  моль) агрегацию тромбоцитов исследовали на агрегометре по методу С. Vorn [30].

Содержание креатинина и мочевины в сыворотке крови проводили на биохимическом анализаторе CIBA-CORNING (Bayer, Германия).

Определение СМП проводили по методу Н.И. Габриэлян [31]. Для количественной их оценки использовали сумму полученных экстинкций при  $\lambda=254$  и  $\lambda=282$  нм. Ответ выражали в условных единицах (усл. ед.).

Для выделения СМП использовали микроцентрифужные пробирки Amicon Ultra-4, Ultracel-10k (ф. MILLIPORE, USA). Полученный центрифугат, содержащий СМП, добавляли к суспензии клеток крови здоровых доноров. В качестве контроля использовалась суспензия клеток крови здоровых доноров, к которой добавляли центрифугат, выделенный из их плазмы.

Результаты исследований обработаны методом непараметрической статистики с применением критериев Манна—Уитни и парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета программ Statistica 6.0. За уровень статистической значимости принято  $p=0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Для выделения из плазмы крови ожоговых больных СМП использовали микроцентрифужные пробирки с фильтрующей единицей,

пропускающей вещества с молекулярным весом до 10 000 Да. Однако через микропоры данных фильтрующих единиц могут проходить не только СМП, но и другие низкомолекулярные вещества, например мочевины и креатинин. Известно, что после массивного ожога, как правило, развивается острая почечная недостаточность. Ее следствием является повышение в крови пациентов концентрации продуктов азотистого обмена (креатинина и мочевины), что также усиливает эндотоксемию [32, 33]. В литературе данных о действии креатинина и мочевины на агрегацию клеток крови мы не встретили. В связи с этим были проведены несколько серий экспериментов с целью выявления влияния повышенных концентраций креатинина и мочевины, наблюдаемых в острые периоды ожоговой болезни, на агрегационные свойства тромбоцитов и эритроцитов. Для этого в донорской крови определяли уровень креатинина и мочевины (контроль), а затем их концентрацию повышали до уровней, наблюдаемых у тяжелообожженных больных в острые периоды ожоговой болезни: креатинина (Creatine Monohydrate, Bio Chemica, Austria) — до 140, 160, 180 и 200 мкмоль/л, а мочевины (ОАО «Реактив», Россия) — до 8, 12, 16 ммоль/л.

Как показали проведенные исследования, повышение концентрации креатинина и мочевины в плазме крови здоровых доноров практически не оказывало влияния на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов и агрегацию эритроцитов. При этом очень высокие концентрации и креатинина, и мочевины даже снижали спонтанную агрегацию тромбоцитов (табл. 1, 2).

Уровень СМП в плазме крови тяжелообожженных

больных был резко повышен по сравнению со здоровыми донорами ( $0,97 \pm 0,13$  и  $0,53 \pm 0,02$ ;  $p < 0,001$ ). В дальнейшем мы использовали СМП, полученные из плазмы крови ожоговых больных.

Установлено, что повышение уровня молекул средней массы вызывало прогрессивное возрастание агрегации тромбоцитов. При увеличении концентрации СМП на 13% спонтанная и АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов возрастала, но статистически значимо не отличалась от контроля. Повышение уровня СМП более чем на 30% приводило к увеличению степени спонтанной агрегации на 21%, а скорости — на 32% (табл. 3). Еще более значимо изменялась АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов. Ее степень повышалась на 71%, а скорость — на 34%. При увеличении уровня СМП в 2 раза и степень, и скорость спонтанной агрегации возрастали более чем на 67%, а степень АДФ-индуцированной агрегации повышалась более чем в 2 раза.

Исследование влияния СМП на агрегацию эритроцитов показало, что увеличение их уровня до 0,61 усл. ед. вызывало только тенденцию к нарастанию агрегации (см. табл. 3). И лишь при повышении концентрации СМП до 0,72 усл. ед. степень агрегации эритроцитов возрастала статистически значимо. При увеличении уровня молекул средней массы в 2 раза наблюдалось повышение как скорости агрегации — на 38%, так и степени — на 23%.

Таким образом, увеличение концентрации средних молекул оказывает большее влияние на агрегацию тромбоцитов, чем на агрегацию эритроцитов.

Таблица 1

**Влияние различных концентраций мочевины на агрегацию тромбоцитов и эритроцитов**

Концентрация мочевины, ммоль/л	АДФ-агрегация тромбоцитов, мм		Спонтанная агрегация тромбоцитов, усл. ед.		Агрегация эритроцитов, мм	
	степень	скорость	степень	скорость	степень	скорость
3,89±0,42 (начальный уровень)	160,50±13,78	71,33±14,25	754,86±88,36	445,81±42,79	142,20±8,50	90,20±5,02
8,0	173,33±17,86	78,17±15,29	720,00±68,66	420,08±57,74	135,00±7,98	79,40±5,45
12,0	188,83±21,73	80,25±17,60	628,52±94,66	350,70±71,52	139,60±9,60	77,40±4,80*
16,0	180,00±24,19	78,67±23,74	578,28±52,26*	235,17±29,78*	137,80±8,38	70,80±5,82*

\* — статистически значимая разница значений по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

Таблица 2

**Влияние различных концентраций креатинина на агрегацию тромбоцитов и эритроцитов**

Концентрация креатинина, мкмоль/л	АДФ-агрегация тромбоцитов, мм		Спонтанная агрегация тромбоцитов, усл. ед.		Агрегация эритроцитов, мм	
	степень	скорость	степень	скорость	степень	скорость
92,78±7,22 (начальный уровень)	154,05±14,12	64,50±15,32	891,67±34,89	660,30±32,14	136,67±8,08	95,00±4,69
140	134,67±16,24	37,30±14,67	586,06±70,76*	323,52±69,44*	138,33±7,32	85,67±5,81
160	133,67±14,86	33,67±15,84	576,07±92,94*	409,98±98,03	141,67±9,25	89,33±6,36
180	120,67±17,33	42,00±15,62	485,87±88,45*	293,89±59,37*	140,33±11,15	83,00±5,29
200	121,33±18,53	37,00±16,08	509,28±91,23*	290,22±65,76*	132,33±8,86	83,00±7,27

\* — статистически значимая разница значений по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

Таблица 3

## Влияние различных концентраций среднемолекулярных пептидов на агрегацию тромбоцитов и эритроцитов

СМП, усл. ед.	АДФ-агрегация тромбоцитов, мм		Спонтанная агрегация тромбоцитов, усл. ед.		Агрегация эритроцитов, мм	
	степень	скорость	степень	скорость	степень	скорость
0,54±0,02 (начальный уровень)	102,30±15,29	51,90±7,58	609,27±26,68	399,84±21,57	92,82±8,22	15,18±2,87
0,61±0,01	132,25±12,04	63,50±8,67	656,48±27,23	448,19±33,42	100,80±10,38	14,60±2,15
0,72±0,01	175,33±12,17*	69,33±7,82*	738,97±23,62*	527,74±36,00*	106,33*±9,21	13,67±2,86
1,09±0,02	227,67±31,90*	91,33±10,31*	1019,82±46,38*	686,74±63,12*	114,00*±8,59	21,00±3,07*

\* — статистически значимая разница значений по сравнению с контролем,  $p < 0,05$ .

Полученные данные свидетельствуют о том, что при выраженной эндогенной интоксикации у тяжело-ожогенных больных креатинин и мочевина не вызывают гиперагрегации клеток крови. Последняя во многом обусловлена повышением в крови пациентов концентрации молекул средней массы. В связи с этим можно полагать, что одной из причин реокорректирующего действия гемосорбции при ожоговой болезни является снижение под ее влиянием концентрации СМП.

**Заключение.** Увеличение концентрации среднемолекулярных пептидов, выделенных из плазмы крови ожоговых больных (в острый период), приводит к прогрессирующему возрастанию как АДФ-индуцированной, так и спонтанной агрегации тромбоцитов здоровых доноров. Агрегация эритроцитов усиливается лишь под действием очень высоких концентраций СМП ожоговых больных. Креатинин и мочевина практически не оказывают влияния на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов и агрегацию эритроцитов здоровых доноров, а в очень высоких концентрациях, наблюдающихся при острой почечной недостаточности, даже снижают спонтанную агрегацию тромбоцитов.

Можно полагать, что одной из причин снижения агрегации тромбоцитов под действием гемосорбции при ожоговой болезни может являться уменьшение под ее влиянием концентрации СМП. Полученные данные позволяют объяснить механизм реокорректирующего действия экстракорпоральной детоксикации в острые периоды ожоговой болезни.

## Литература

1. Гордеев В.Ф., Морозов С.С., Зиновьев Е.Ш. Микроциркуляция при ожоговом шоке. В кн.: Нарушения микроциркуляции при ожоговой болезни. Сб. науч. работ. Отв. ред. М.Г. Григорьев. Горький: Горьковский НИИ-ТО; 1983; с. 62—65.
2. Milner S.M., Bhatta S., Gulatia S. et al. Observations on the microcirculation of the human burn wound using orthogonal polarization spectral imaging. *Burns* 2005; 31(3): 316—319.
3. Xu R.X., Sun X., Weeks B.S. Burn regenerative medicine and therapy. Switzerland: Karger AG; 2004; 152 p.
4. Балуда В.П., Зяблицкий В.М., Лукоянова Т.И. Характеристика синдрома внутрисосудистого свертывания крови при ожоговой болезни. Пат физиол и эксперим терапия 1984; 2: 19—22.
5. Штыхно Ю.Ф., Недошивина Р.В. Состояние микроциркуляции и уровень токсичности в динамике ожогового шока разной тяжести у крыс. *Вестн АМН СССР* 1976; 8: 52—61.
6. Ericsson E., Plum-Forsell K., Robson M.C. Distant microcirculatory changes after a major burn: effects of methylprednisolone, dextran 40, heparin and normal saline. *Burns* 1981; 7(3): 158—161.
7. Kamel A.H., Ahmed Y.A.A., Thabet N.M., El-Haish M.K. Modulation by aspirin of platelet function in burn patients: clinical and laboratory assessment. *Annals of Burns and Fire Disasters* 1999; 12(2): 99—103.
8. Азизова О.А. Роль физико-химических изменений клеточной мембраны и свободно-радикальных процессов в патологии. В кн.: Физико-химическая медицина: проблемы атеросклероза, детоксикации и иммунокоррекции. М; 1991; с. 46—62.
9. Заец Т.Л., Лавров В.А., Марчук А.И. и др. Изменение некоторых свойств эритроцитарной мембраны и структуры эритроцитов при тяжелых ожогах в эксперименте. *Бюл эксперим биологии и медицины* 1990; 1: 27—30.
10. Andrews D.A., Yang L., Low P.S. Phorbol ester stimulates a protein kinase C — mediated agtoxin-TK — sensitive calcium permeability pathway human red blood cells. *Blood* 2002; 100: 3382—3392.
11. Jain M.K., Wagner R.C. Introduction to biological membranes. New York: John Wiley and Sons; 1980; 382 p.
12. Koshkaryev A., Yedgar S., Relevy H. Acridine orange induced translocation of phosphatidylserine of red blood cell surface. *Amer J Physiol* 2003; 285: 720—722.
13. Schwarz S., Deuticke B., Haest C.W. Passive transmembrane redistribution of phospholipids as determination of erythrocyte shape change studied of electroporated cells. *Mol Membr Biol* 1999; 16: 247—255.
14. Егорихина М.Н., Изумрудов М.Р., Гайнутдинова Л.И. Агрегация эритроцитов в острый период ожоговой болезни. *Тромбоз, гемостаз и реология* 2007; 1: 56—63.
15. Левин Г.Я., Егорихина М.Н., Изумрудов М.Р. Особенности агрегации тромбоцитов в острый период ожоговой болезни. В кн.: Материалы III Всерос. конф. по клинической гемостазиологии и гемореологии в сердечно-сосудистой хирургии. 2007, 1—3 февраля. М; 2007; с. 128—129.

16. Волчегорский И.А. Анальгетические и антистрессорные эффекты СМП в норме и при термических ожогах. Пат физиол и эксперим терапия 1991; 3: 44—46.
17. Смирнов С.В., Габриэлян Н.И., Игнатов С.В. Эндотоксемия и критерии ее объективизации у больных с ожогами. Клинич медицина 1989; 5: 128—131.
18. Allogover M., Guenil N., Stadler K. Burn toxin in mouse skin. J Trauma 1975; 13: 95—111.
19. Bekyarova G., Yankova T., Kozarev I., Yankov D. Reduced erythrocyte deformability related to activated lipid peroxidation during the early postburn period. Burns 1996; 22(4): 291—294.
20. Horton J.W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. Toxicology 2003; 189(1—2): 75—88.
21. Вальдман Б.М., Волчегорский И.А., Лившиц Р.И. Среднемолекулярные пептиды крови как нейротропные факторы острой ожоговой токсемии. Пат физиол и эксперим терапия 1985; 6: 39—42.
22. Гордеева И.П., Иванова М.Н., Соловьева Е.И. и др. Определение степени интоксикации у детей с хирургическими гнойно-септическими заболеваниями. Хирургия 1986; 8: 27—29.
23. Козинец Г.П., Слесаренко С.В., Радзиховский А.П. и др. Ожоговая интоксикация: патогенез, клиника, принципы лечения. М: МЕДпресс-информ; 2005; 184 с.
24. Карякина Е.В., Белова С.В. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика 2004; 3: 3—7.
25. Лавров В.А., Заяц Т.Л., Марчук А.И. Среднемолекулярные пептиды и интоксикация у обожженных. В кн.: Современные средства первой помощи и методы лечения ожоговой болезни. Материалы III Всесоюз. конф. М; 1986; с. 157—158.
26. Мовшев Б.Е., Недошивина Р.В. Ожоговый токсин, его идентификация и биологическая активность. Гематология и трансфузиология 1986; 31(8): 49—51.
27. Вальдман Б.М., Волчегорский И.А., Хшиво А.Л., Пужевский А.С. Функциональная активность среднемолекулярных пептидов, выделенных из крови собак при ожоговой токсемии. В кн.: Ожоговая токсемия: современные проблемы патогенеза и клиники. Науч. ред. Р.И. Лившиц. Челябинск; 1986; с. 6—19.
28. Левин Г.Я., Модин А.П., Кудрицкий С.Ю., Соснина Л.Н. Устройство для исследования агрегации тромбоцитов. А.с. 2278381 РФ. ПМК G01N 33/48. 2006.
29. Schmid-Schönbein H., Gosen J.V., Heinrich L. et al. Counter-rotating «rheoscope chamber» for the study of the micro-rheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry. Microvasc Res 1973; 6: 366—376.
30. Born C.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature 1962; 194: 927—929.
31. Габриэлян Н.И., Липатова В.И. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей. Лаб дело 1984; 3: 7—12.
32. Al-Hawary S.E., Abdel Razek E.M., Belal T.H., Mandour E. Acute resuscitation of burn injury: haes-steril versus lactated ringer's solution. Annals of Burns Fire Disasters 2001; 14(2): 72—78.
33. Sabry A., Wafa I., El-din A.B., El-Hadidy A.M., Hassan M. Early markers of renal injury in predicting outcome in thermal burn patients. Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation 2009; 20(4): 632—638.