

ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«СИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

С.П. Чумакова, О.И. Уразова,
В.М. Шипулин, В.В. Новицкий

**ПАТОЛОГИЯ ЭРИТРОЦИТА:
ПРЕДИКТОРЫ ГЕМОЛИЗА
В КАРДИОХИРУРГИИ**



Томск – 2015

УДК 616.1-089-06:616.155.1-091.818

ББК 54.10:54.57:54.11

Ч 90

Авторы:

С.П. Чумакова — доктор медицинских наук, доцент
кафедры патофизиологии СибГМУ;

О.И. Уразова — доктор медицинских наук, профессор,
профессор кафедры патофизиологии СибГМУ;

В.М. Шипулин — доктор медицинских наук, профессор, руководитель отделения
сердечно-сосудистой хирургии ФГБНУ «НИИ кардиологии»;

В.В. Новицкий — заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ

Рецензенты:

А.М. Дыгай — заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН, директор НИИФ и РМ им. Е.Д. Гольдберга;

Г.Ц. Дамбаев — заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор,
член-корреспондент РАН, зав. кафедрой госпитальной хирургии СибГМУ

Чумакова, С.П.

Ч 90

Патология эритроцита: предикторы гемолиза в кардиохирургии / С.П. Чумакова, О.И. Уразова, В.М. Шипулин, В.В. Новицкий. — Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2015. — 208 с.

ISBN 978-5-94476-320-4

В монографии представлены обобщенные данные современной литературы и результаты собственных исследований относительно факторов физиологической и патологической гибели эритроцитов у кардиохирургических больных до операции с искусственным кровообращением и во время ее проведения. Приведены новые сведения о механизмах реализации умеренного и выраженного постперфузионного гемолиза у больных ишемической болезнью сердца, не страдающих заболеваниями гематологического профиля, а также установлена роль предсуществующей патологии эритроцита в этом процессе, предложены оригинальные способы его прогнозирования и коррекции. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках проекта «Механизмы нарушений гемолитической стойкости эритроцитов к факторам экстракорпоральной перфузии» (соглашение №12-04-31655/12 от 16 октября 2012 г.).

Для перфузиологов, кардиохирургов, кардиологов, реаниматологов, гематологов, патофизиологов и других специалистов.

УДК 616.1-089-06:616.155.1-091.818

ББК 54.10:54.57:54.11

© С.П. Чумакова, О.И. Уразова, В.М. Шипулин,
В.В. Новицкий, 2015

ISBN 978-5-94476-320-4

© ООО «Печатная мануфактура», макет, 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	5
Введение.....	7
Глава 1. Общие сведения о физиологии эритроцитов и механизмах их гибели	12
1.1. Структурно-функциональные особенности эритроцитов ...	12
1.2. Механизмы гибели эритроцитов в норме и при патологии .	16
Глава 2. Интенсивность гемолиза и структурно-функциональные свойства эритроцитов у кардиохирургических больных	24
2.1. Состояние периферического звена эритрона при атеросклерозе коронарных артерий, предшествующее реваскуляризации миокарда	24
2.2. Феномен вариабельности внутрисосудистого гемолиза при операциях с искусственным кровообращением	29
Глава 3. Влияние микрореологических свойств эритроцитов на выраженность гемолиза после искусственного кровообращения.....	36
3.1. Современные представления о механической травме эритроцитов и нарушении их микрореологических свойств в ходе экстракорпоральной перфузии	36
3.2. Факторы агрегации эритроцитов при умеренном и выраженном постперфузионном гемолизе.....	41
3.3. Деформируемость и механическая резистентность эритроцитов при постперфузионном гемолизе различной степени выраженности	52
Глава 4. Роль свободнорадикального окисления в модуляции гемолиза при искусственном кровообращении	60
4.1. Феномен активации свободнорадикального окисления при искусственном кровообращении	60
4.2. Окислительно-антиокислительный баланс плазмы крови при умеренном и выраженном постперфузионном гемолизе	63
4.3. Перекисное окисление липидов мембраны эритроцита как причина выраженного гемолиза в кардиохирургии	65
4.4. Изменение состава липидной фазы мембраны эритроцитов при постперфузионном гемолизе различной степени выраженности.....	74
Глава 5. Система комплемента и механизмы регуляции объема эритроцита при операциях на остановленном сердце	83
5.1. Активация системы комплемента при операциях с искусственным кровообращением и ее роль в патогенезе гемолиза	83

5.2. Состояние путей активации системы комплемента и экспрессия ее ингибиторных молекул на эритроцитах у больных с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом	85
5.3. Участие механизмов регуляции объема эритроцита в патогенезе умеренного и выраженного гемолиза у кардиохирургических больных после операции с искусственным кровообращением	96
Глава 6. Влияние дисфункции эритропоэза, АВ0- и резус-фенотипа эритроцитов на выраженность постперфузионного гемолиза	112
6.1. Дисрегуляция процессов эритропоэза и эритродиереза как причина вариабельности внутрисосудистого гемолиза при искусственном кровообращении	112
6.2. Связь АВ0- и резус-фенотипа эритроцитов с интенсивностью гемолиза при искусственном кровообращении	125
Глава 7. Патогенез постперфузионного гемолиза различной степени выраженности и клиническая значимость выраженной гемоглобинемии.....	129
7.1. Механизмы умеренного и выраженного гемолиза при операциях в условиях искусственного кровообращения	129
7.2. Дисфункция систем органов у кардиохирургических больных при массивном интраоперационном гемолизе	134
7.3. Особенности течения послеоперационного периода у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом после искусственного кровообращения	137
Глава 8. Современные подходы к прогнозированию и коррекции интраоперационного гемолиза в кардиохирургии	142
8.1. Унифицированный подход в дооперационной профилактике внутрисосудистого гемолиза путем подбора перфузиологического оборудования	142
8.2. Индивидуальный подход к терапии и вторичной профилактике гемолитических осложнений после операций с искусственным кровообращением	145
8.3. Современные проблемы коррекции постперфузионной гемоглобинемии	147
8.4. Способы прогнозирования выраженного гемолиза после искусственного кровообращения.....	149
Заключение	155
Литература	159
Приложение	189

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЕРО	– (erhytropoetein) эритропоэтин
HIF	– (hypoxia inducible factor) гипоксия-индуцируемый фактор
IL	– (interleukin) интерлейкин
NF-kB	– (nuclear factor) нуклеарный фактор kB
NO	– монооксид азота
TNF	– (tumor necrosis factor) фактор некроза опухолей
TNF-R	– (tumor necrosis factor receptor) рецептор для фактора некроза опухолей
АДФ	– аденозиндифосфат
АМФ	– аденозинмонофосфат
АОА	– антиокислительная активность
АТФ	– аденозинтрифосфат
АФК	– активные формы кислорода
Г-6-ФДГ	– глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа
ГПО	– гиперполяризационный ответ
ГРП	– гемолитический риск перфузии
ДК	– диеновые конъюгаты
2,3-ДФГ	– 2,3-дифосфоглицерат
ИБС	– ишемическая болезнь сердца
ИК	– искусственное кровообращение
лФХ	– лизофосфатидилхолин
МАК	– мембраноатакующий комплекс
НАДН	– восстановленный никотинамидадениндинуклеотид
НАДФН	– восстановленный никотинамидадениндинуклеотид-фосфат
НИГ	– нормализованный индекс гемолиза
ПОЛ	– перекисное окисление липидов

Список сокращений

РЭС	– ретикулоэндотелиальная система
СН	– сердечная недостаточность
СОД	– супероксиддисмутаза
СРБ	– С-реактивный белок
СФМ	– сфингомиелин
ТБК	– тиобарбитуровая кислота
ТКК	– терминальный комплекс комплемента
ФИ	– фосфатидилинозитол
ФК	– фосфатидная кислота
ФЛ	– фосфолипиды
ФС	– фосфатидилсерин
ФХ	– фосфатидилхолин
ФЭА	– фосфатидилэтаноламин
ХС	– холестерол

ВВЕДЕНИЕ

Согласно пятилетним отчетам кардиологов, в Российской Федерации в течение 2010 г. от болезней системы кровообращения погибли 1 152 197 человек, что составляет 56,8% от общей смертности населения. Доля умерших от сердечно-сосудистой патологии в трудоспособном возрасте составила 31,7% (176 739 человек) всех случаев смерти в этот период. Общая заболеваемость болезнями системы кровообращения за период 2006–2010 гг. выросла среди взрослого населения страны в среднем на 8,4%, у детей – на 17,0%. Данный факт наглядно демонстрирует необходимость совершенствования методов терапии сердечно-сосудистых заболеваний, из которых основное значение имеют хирургические и интервенционные методы лечения, в том числе операции с использованием искусственного кровообращения (ИК) [8].

На сегодняшний день ИК является неотъемлемой частью сердечно-сосудистой хирургии, позволяя выполнять разнообразные вмешательства на сердце и аорте, среди которых оперативное лечение ишемической болезни сердца (ИБС) с многососудистым поражением коронарного русла, коррекция врожденных и приобретенных пороков сердца, резекция аневризмы аорты или сердца и трансплантация этого органа [1, 8, 123].

Между тем, внедрение экстракорпоральных технологий в медицину неизбежно сопряжено с комплексом патофизиологических реакций организма на экстремальное воздействие и серьезными нарушениями гомеостаза. Одной из первых и до сих пор нерешенных проблем кардиохирургии является травматизация форменных элементов крови в экстракорпоральном контуре с развитием внутрисосудистого гемолиза [25]. О гемолитических эффектах перфузиологических устройств впервые стало известно в 1958 г., когда

V.O. Bjork сделал доклад о гемолизе, вызываемом механическими насосами различных конструкций [407]. В связи с этим выраженность гемогlobeинемии традиционно служит индикатором перфузионной травмы клеток крови [25]. Концентрация свободного гемоглобина в крови прогрессивно нарастает с первых секунд перфузии и по одним данным достигает максимума спустя 120 мин после начала ИК [407], по другим – через 90 мин [25], по третьим – через 2 ч после окончания ИК и даже через 2 сут после него не возвращается к дооперационным значениям [395]. Последнее объясняется формированием сублетальных повреждений в эритроцитах во время ИК в виде нарушений их структурно-метаболических и микрореологических характеристик, что определяет разрушение до 15% таких клеток через 24 ч после операции [394].

Известно, что повреждение эритроцитов в аппарате ИК обусловлено турбулентностью потока крови и выраженными напряжениями сдвига, действием положительного и отрицательного давления, сил гидродинамического удара и поверхностного натяжения [25, 310]. В условиях постоянной деформации изменяется проницаемость мембраны эритроцита для одновалентных катионов и кальция – клетка испытывает «деформационный стресс» [69, 158]. Кроме того, важное значение имеет артериальная гипероксия, контакт крови с воздушной фазой и синтетическими поверхностями экстракорпорального контура, что активирует свободнорадикальное окисление, систему комплемента и гемостаз [25, 51, 138, 194, 245]. В комплексе это инициирует внутрисосудистый гемолиз, который, по данным G. Wright (2001), отмечается в ходе каждой из 1000 изученных им кардиохирургических операций в условиях ИК [407].

Массивная деструкция эритроцитов в пределах сосудистого русла сопровождается появлением в крови разрушенных стром эритроцитов и аденозиндифосфата (АДФ), стимулирующих агрегацию тромбоцитов и коагуляционный гемостаз, а также свободного гемоглобина, активирующего процессы свободнорадикального окисления и связывающего монооксид азота, что опосредует нарушения микроциркуляции во многих органах и гипоксию тканей вследствие гемодилюции и централизации кровообращения [29, 54, 97, 255, 359, 395]. Интраоперационные нарушения регионарного кровотока в жизненно важных органах определяют их дисфункцию

в постперфузионном периоде и усугубляют тяжесть таких ранних послеоперационных осложнений, как инфаркт миокарда и инсульт. Показано, что после операций с ИК почечная недостаточность манифестирует примерно у 4% пациентов [103], у 40–100% больных имеют место субклинические нарушения клубочковой фильтрации и дисфункция проксимальных канальцев почек вследствие фильтрации свободного гемоглобина [68, 89, 268], дыхательная недостаточность отмечается у 2% пациентов [89, 103], респираторные осложнения – у 8% [268], острая ишемия кишечника – у 6% [260], инсульты – у 2–7,5% [89, 371], поражение центральной нервной системы в виде когнитивного дефицита – у 12,5–73% пациентов [5, 9, 148]. Полиорганная недостаточность встречается редко, но служит основной причиной смерти среди пациентов палат интенсивной терапии и реанимации хирургических стационаров, а при операциях с ИК составляет треть от общей смертности больных, варьирует от 6 до 15% [78, 260, 349].

Учитывая высокую значимость интраоперационного гемолиза в ранней реабилитации пациентов, главным принципом его профилактики на сегодняшний день служит разработка наименее травматичных модулей аппарата ИК, в связи с чем изучение гемолиза в кардиохирургии в основном проводится с целью сравнительной оценки перфузионных устройств и методик [24, 25, 276, 322, 372, 394]. При этом совершенно не учитываются внутренние факторы организма больного, предрасполагающие к интенсивной деструкции эритроцитов. Выявлению этих факторов посвящено настоящее исследование.

В результате клинических наблюдений сотрудниками ФГБНУ «НИИ кардиологии» (г. Томск) было отмечено, что у пациентов, оперированных с применением идентичных перфузионных систем примерно в равных условиях, выраженность постперфузионной гемоглобинемии значительно варьирует. Это позволяет предположить детерминирующую роль в патогенезе гемолиза исходного клинического статуса пациентов и (или) структурно-метаболических свойств эритроцитов на момент хирургического вмешательства. Следует отметить, что немногочисленные работы относительно этой проблемы констатируют лишь факт развития выраженной гемоглобинемии после операций в условиях ИК у

больных с серповидно-клеточной анемией, талассемией, генетически детерминированным дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах и пароксизмальной ночной гемоглобинурией [180, 182, 212]. Для кардиохирургических пациентов, не страдающих гематологическими заболеваниями, влияние дооперационного статуса эритроцитов на степень выраженности гемолиза остается не изученным. Показано, что дисфункция эритрона формируется при многих соматических заболеваниях и нервно-психических расстройствах [45, 73, 74], поэтому заболевания сердечно-сосудистой системы в комплексе с сопутствующей патологией могут оказывать существенное влияние на выраженность постперфузионной гемоглобинемии.

Поскольку модификация структурно-метаболических свойств эритроцитов на фоне ишемической болезни сердца не вызывает сомнений [10, 45, 49, 64, 74, 125, 129, 136, 188, 275, 385, 386], и пациенты этой категории составляют половину всех кардиохирургических больных, оперированных в условиях ИК [1, 8, 123], то изучение причин вариабельности постперфузионного гемолиза при операциях коронарного шунтирования является чрезвычайно важной задачей. На сегодняшний день альтернативные коронарному шунтированию способы реваскуляризации миокарда (чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика со стентированием и без него, трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация, ротационная атерэктомия) и применение техники «Off-pump», имеющей многочисленные ограничения, не позволяют полностью отказаться от использования аппаратов ИК. В мире ежегодно выполняется 800 тыс. операций коронарного шунтирования, из которых более 80% – с применением ИК [123]. В России число операций с ИК в 3 раза меньше их необходимого количества (300 операций на 1 млн населения), в связи с чем численность подобных вмешательств и клиник, осуществляющих их, в настоящее время прогрессивно увеличивается (за последние 5 лет на 29,3%) [8, 112]. Данное обстоятельство определяет необходимость поиска подходов, снижающих тяжесть постперфузионных гемолитических реакций. Однако современные способы медикаментозной и аппаратной коррекции уже сформировавшейся гемоглобинемии не позволяют решить задачу ее первичной профилактики, а комплектация аппаратов ИК современными модулями

не гарантирует отсутствие гемолиза ввиду возможной индивидуальной предрасположенности пациента.

В связи с этим изучение механизмов, лежащих в основе формирования выраженной и умеренной гемоглобинемии у больных ИБС, оперированных с использованием идентичного перфузиологического оборудования, представляется, безусловно, актуальной. Подобное исследование раскрывает роль нарушений структурно-метаболического статуса эритроцитов и исходного состояния пациента в патогенезе массивного гемолиза после операций с ИК, а также идентифицирует факторы риска его развития. Кроме того, результаты исследования положены в основу двух способов прогнозирования выраженного гемолиза, которые позволяют создать более совершенную программу первичной профилактики гемолитических расстройств у кардиохирургических больных, уменьшить вероятность и тяжесть гемолизопосредованных осложнений, облегчить реабилитацию пациентов и сократить сроки их пребывания в стационаре.

Авторы выражают глубокую признательность заведующему отделением сердечно-сосудистой хирургии ФГБНУ «НИИ кардиологии» д-ру мед. наук Б.Н. Козлову; заведующему отделением анестезиологии и реанимации д-ру мед. наук, профессору Ю.К. Подоксёнову; заведующему ЦНИЛ ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, д-ру мед. наук, профессору А.Н. Байкову; профессору кафедры биофизики и функциональной диагностики ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, д-ру мед. наук, профессору И.В. Петровой; ст. науч. сотруднику ЦНИЛ ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России, канд. хим. наук Э.В. Сапрыкиной; сотрудникам отделения сердечно-сосудистой хирургии ФГБНУ «НИИ кардиологии» канд. мед. наук Т.В. Емельяновой и З.К. Амришевой за проявленный интерес к работе, помощь в организации и проведении исследования, ценные теоретические и методические рекомендации. Отдельная благодарность профессору кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России д-ру мед. наук Ю.В. Колобовниковой, аспирантам кафедры И.В. Мальцевой и О.А. Хохлову за участие в выполнении экспериментального блока работ.

Глава 1

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О ФИЗИОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТОВ И МЕХАНИЗМАХ ИХ ГИБЕЛИ

1.1. Структурно-функциональные особенности эритроцитов

Согласно классическим представлениям, эритроциты являются безъядерными клетками крови, имеющими форму двояковогнутого диска, 98% белка цитоплазмы которых составляет гемоглобин, определяющий кислородотранспортную функцию этих форменных элементов крови. В силу структурных и метаболических особенностей эритроциты не способны к синтезу белков и липидов, окислительному фосфорилированию и поддержанию реакций цикла трикарбоновых кислот [74, 132, 158]. Редукция данных обменных процессов и механизмов трансляции генетического материала в зрелых клетках эритроидного ряда позволяла длительное время рассматривать эритроциты как клетки с ограниченными возможностями и изучать их лишь в качестве моделей клеточной мембраны [52, 213].

Между тем, эритроциты имеют много особенностей. Так, образование эритроидных клеток происходит в красном костном мозге в результате энуклеации эритрокариоцитов, которая представляет собой аномальное клеточное деление оксифильного нормобласта с формированием разделительной пластинки между эксцентрично расположенным ядром и цитоплазмой. Дальнейшее сокращение нитей актина цитоскелета опосредует появление перетяжки, разделяющей клетку на ретикулоцит и «пиреноцит» – ядро, окруженное мембраной и тонким кольцом цитоплазмы, которое затем фагоцитируется костномозговыми макрофагами [258]. В течение 30–40 ч ретикулоциты дозревают в костном мозге, избавляясь от ненужных компартментов (рибосом, митохондрий, эндоплазматического ретикулума) путем образования цитоплазматических везикул, которые сливаются с органеллами и подвергаются либо экзоцитозу, либо

аутофагии при взаимодействии с лизосомами [97, 324]. Достигая определенной степени зрелости, ретикулоциты приобретают свойство деформируемости и покидают костный мозг, проникая в кровь через цилиндрические поры в цитоплазме эндотелиоцитов костномозговых синусов (диаметр пор менее 4 мкм) [137, 287].

В периферической крови эритроциты составляют основную часть ее форменных элементов, влияя тем самым на реологические свойства этой неньютоновской жидкости [60, 94]. Двигаясь по магистральным сосудам, эритроциты участвуют не только в поступательном, но и во вращательном движении (вокруг своей оси). При этом максимально удаленные от оси вращения области эритроцита (торообразующие) наиболее уязвимы к повреждениям, в том числе иммунными комплексами [88]. Кроме того, недавно установлено, что эритроциты подвергаются сепарации на уровне дуги аорты: молодые и полноценные клетки поступают в головной мозг, а старые и дегенеративные – на периферию [46].

Проходя через различные участки кровеносного русла, эритроциты модулируют свои вязкостно-эластические свойства путем изменения степени сродства между белками цитоскелета, что регулируется уровнем фосфорилирования последних и внутриклеточным содержанием кальция [74, 158]. Мембрана эритроцитов слабо проницаема для катионов, поскольку в ней отсутствуют Na^+ -каналы [69, 99], а K^+ -каналы открываются только при увеличении концентрации внутриклеточного кальция [79, 87, 204]. В настоящее время показано, что поступление кальция в эритроциты происходит через неспецифические ионные каналы, хотя не исключается наличие в клетках рецептор-управляемых, механочувствительных и потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа [99, 109, 273].

В норме эритроцит испытывает транзитное повышение мембранной проницаемости для катионов при сдвиговой деформации («деформационный стресс») в магистральных сосудах, когда ионы Na^+ и Ca^{2+} поступают через участки пониженной плотности упаковки молекул липидного бислоя при его кренировании. Увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} опосредует тесное взаимодействие белков цитоскелета, придающих стабильность мембране и дисковидную форму клетке. По мере продвижения клеток по сосудистому руслу в эритроцитах за счет функционирования Na^+/K^+ - и

Ca^{2+} -аденозинтрифосфатаз (АТФаз) снижаются интрацеллюлярные концентрации Na^+ и Ca^{2+} , что сопровождается фосфорилированием белков цитоскелета, опосредующим снижение сродства таковых друг к другу и жесткости клетки в целом. Последнее обеспечивает реализацию свойства деформируемости эритроцитов в микроциркуляторном русле [109, 158]. Интересно, что *in vivo* при определенных условиях Na^+/K^+ -АТФаза может обращаться в Na^+/H^+ -АТФсинтазу, транспортирующую соответствующие ионы по градиенту концентрации с образованием короткоживущих молекул аденозинтрифосфата (АТФ), которые имеют сигнал-индуцирующее значение [10].

Показано, что АТФ в эритроцитах находится в составе двух пулов – цитозольного и мембраносвязанного [10, 54, 181], и образуется исключительно анаэробным путем, при этом потребляется 90% поступающей в клетку глюкозы [173]. Не утилизируя кислород, эритроциты контактируют с его максимальными концентрациями в организме, поэтому обладают мощной системой антиоксидантной защиты, основными компонентами которой являются супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и система глутатиона. В свою очередь, восстановление последнего осуществляется за счет окисления восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН), который является продуктом пентозофосфатного шунта, потребляющего 10% глюкозы [74].

Удивительным является тот факт, что помимо ферментов и гемоглобина в зрелых клетках эритроидного ряда обнаружен нуклеарный фактор kB (NF- kB), фармакологическая блокада которого *in vitro* приводит к уменьшению количества восстановленного глутатиона в клетках, экспонированию фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны и гибели эритроцитов [213]. Кроме того, показано наличие цитокиновых рецепторов на мембране эритроцитов, в частности, рецепторов к интерлейкину (IL) 8, которые, вероятно, служат эквивалентом растворимых рецепторов, акцептируя избыток данного цитокина [387]. Наряду с этим эритрокариоциты человека способны продуцировать в культуральную среду IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, фактор некроза опухолей α (TNF- α), тканевый фактор роста $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), интерферон- γ (IFN- γ) [47].

Экспериментально доказано наличие на мембране зрелых клеток красной крови рецепторов к инсулину, эндотелину, фибриноге-

ну, гистамину, тромбоксану A_2 , простациклину, церулоплазмину, α_2 -макроглобулину, эритропоэтину, а также α - и β -адренорецепторов [54, 109, 273]. Их роль в клетке еще до конца не изучена. В частности, поступление глюкозы в эритроциты не зависит от инсулина и происходит путем облегченной диффузии с помощью белка-переносчика ГЛЮТ-1 [74]. Ингибирование гипоосмотического лизиса эритроцитов под влиянием катехоламинов, по мнению некоторых авторов, не связано с системой «G-белок – аденилатциклаза», а реализуется путем изменений взаимодействия цитоплазматических карбоксильных концов β -адренорецептора с фактором регуляции Na^+/H^+ -обмена в клетке [110].

Кроме того, эритроциты способны вступать в межклеточные контакты с тромбоцитами, лейкоцитами и эндотелием, что опосредуется молекулами межклеточной адгезии CD242, экспонированными на эритроцитарной мембране [54, 237]. Среди большого количества мембранных гликопротеинов, несущих антигенные детерминанты групп крови, имеются функциональные молекулы, определяющие, например, электростатические взаимодействия эритроцитов с другими объектами (гликофорины A, B, C, D) и степень активации системы комплемента (молекулы CD35, CD55, CD59) [76, 77, 324].

По современным данным, эритроциты являются важными участниками коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, выступая источниками фосфолипидных матриц, антигепаринового фактора, АДФ, NO, и модулируют ретракцию кровяного сгустка. В эритроцитах содержатся фибринакцелератор (возможно, гликофорин), фибринстабилизирующий фактор и естественные антикоагулянты (сорбированы из плазмы), активаторы и ингибиторы фибринолиза. Кроме того, клетки красной крови, как известно, транспортируют аминокислоты, белки, углеводы, ферменты, липиды, иммунные комплексы, продукты обмена, гормоны и другие биологически активные вещества, регулируют pH крови и участвуют в водно-солевом обмене [54, 69, 91, 97].

Таким образом, роль эритроцитов в организме не ограничивается газотранспортной функцией, их свойства многообразны, а клеточная и молекулярная организация гораздо сложнее, чем кажется на первый взгляд. Клетки красной крови за свою жизнь совершают

кругооборот по организму более 1 млн раз. За это время эритроциты подвергаются механической травме, в них происходят метаболические изменения, которые через 90–120 сут после образования клеток приводят к их естественной гибели [69, 74, 97, 295].

1.2. Механизмы гибели эритроцитов в норме и при патологии

В норме у человека за 1 с разрушается 5 млн эритроцитов, за сутки – более 360 млрд. При этом физиологический эритродиерез на 80–90% обусловлен внутриклеточным гемолизом и лишь на 10–20% – внутрисосудистым [97]. Гемолизом (гематолизисом, эритроцитоллизом) (греч. *haima* – кровь, *lysis* – распад, разрушение, растворение) называется разрушение эритроцитов с выходом гемоглобина в окружающую их среду. Внутриклеточный гемолиз представляет собой разрушение клетками-киллерами (макрофагами, гранулоцитами, натуральными киллерами) маркированных иммуноглобулинами класса G эритроцитов в селезенке, печени и костном мозге. Внутрисосудистый гемолиз – это комплемент-зависимый лизис маркированных иммуноглобулинами класса M (реже G) эритроцитов в кровеносном русле. Чрезмерное усиление гемолитических реакций на фоне патологии опосредует формирование гемолитической анемии и может происходить как по первому, так и по второму пути. При этом наследственные гемолитические анемии сопровождаются усилением преимущественно внутриклеточного пути эритродиереза, а приобретенные – чаще всего активацией внутрисосудистого механизма [97, 106, 120].

Патологический гемолиз происходит под влиянием различных факторов. В зависимости от вызывающих его причин, выделяют следующие виды: химический (возникает при действии лекарственных препаратов, различных кислот), механический (например, у больных с искусственным клапаном сердца, в аппарате искусственного кровообращения), физический (может быть обусловлен ионизирующей радиацией), биологический (развивается в результате воздействия ядов змей, насекомых), термический (при действии температур ниже фазового перехода липидного бислоя или выше термической коагуляции белков мембраны) [120].

В основе гемолиза могут лежать иммунные процессы, в результате которых аллоиммунные или аутоиммунные антитела адсорбируются на эритроцитах, связываются с антигенами мембран эритроцитов и вызывают их разрушение. Механизм деструкции этих клеток зависит от типа антител и антигенов мембраны эритроцитов, против которых они направлены. Так, полные холодовые агглютинины вызывают агглютинацию эритроцитов при пониженной температуре окружающей среды (оптимум $+4^{\circ}\text{C}$); неполные тепловые агглютинины (оптимум $+37^{\circ}\text{C}$) лишь нарушают проницаемость мембраны эритроцитов, что приводит к изменению формы и размеров клеток, а в дальнейшем – к уничтожению их макрофагами. Опсонины, сорбируясь на эритроцитах, облегчают их фагоцитоз клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС). Гемолизины присоединяют к эритроциту терминальный комплекс комплемента, который осуществляет лизис клеток красной крови в кровотоке [106, 120]. Большая часть поступившего в плазму свободного гемоглобина взаимодействует с гаптоглобином, препятствующим проникновению гемоглобина через гломерулярный фильтр, после чего данный комплекс поглощается тканевыми макрофагами с участием scavenger-рецепторов («рецепторов-мусорщиков») CD163 [278, 365]. Некоторое количество гемоглобина в плазме легко окисляется и в отсутствие воздействия ферментов распадается на гем и глобин. Гем связывается с гемопексином и транспортируется в печень [97, 359, 382].

Независимо от вида гемолиза метаболизм гема осуществляется в клетках РЭС и включает гидроксилирование α -метенового углерода, расщепление его при действии микросомальных гидроксилаз с высвобождением окиси углерода и дальнейшим превращением в биливердин при участии гемоксигеназы [97, 365, 394, 395]. Биливердин восстанавливается в непрямой билирубин и поступает из РЭС в кровь для последующего метаболизма в печени. Поэтому характерными признаками любого гемолиза являются иктеричность кожи и слизистых вследствие гипербилирубинемии. При этом массивный внутриклеточный гемолиз чаще сочетается со сплено- и гепатомегалией, повышением содержания стеркобилиногена в кале и появлением уробилиногена в моче, в то время как внутрисосудистый – с увеличением концентрации свободного гемоглобина

в плазме крови (гемоглобинемией), гемосидерина в моче (гемосидеринурией) или появлением гемоглобина в моче (гемоглобинурией) [97, 120].

1.2.1. Причины патологического усиления внутриклеточного гемолиза

Гиперактивация внутриклеточного лизиса эритроцитов является следствием ускоренного их старения, приводящего к изменению структурно-функциональных характеристик клетки и приобретению ею свойств, характерных для старых эритроцитов. Существует ряд гипотез, которые объясняют механизмы старения эритроцитов: снижение активности ферментов эритроцитов (прежде всего гликолитических), изменение заряда, углеводов мембраны и баланса Ca^{2+} в эритроцитах, окислительная модификация структур клетки, появление антител к компонентам мембраны [195]. Все эти факторы имеют место, однако истинный механизм старения эритроцитов еще не известен [97]. В последние годы появились сведения о феномене запрограммированной гибели эритроцитов, которая отличается от апоптоза ядродержащих клеток и поэтому называется эриптозом [19, 273].

Инициация эриптоза возможна при дефиците эритропоэтина в крови или деструкции рецепторов к эритропоэтину, экспрессированных на мембране зрелых клеток эритроидного ряда в небольших количествах. В норме взаимодействие рецепторов с эритропоэтином поддерживает кальциевые каналы эритроцитарной мембраны в закрытом состоянии. Деградация этих рецепторов по мере старения эритроцитов (или по другим причинам) приводит к увеличению потока Ca^{2+} в их цитоплазму, который активирует фосфолипазу A_2 , Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы, Ca^{2+} -чувствительную скрэблазу и повышает степень сродства белков цитоскелета друг к другу. В свою очередь скрэблаза переносит молекулы фосфатидилсерина, локализованного в интактных эритроцитах на внутренней стороне мембраны, на внешний слой липидного бислоя, что является меткой для макрофагов, фагоцитирующих подобные клетки. Фосфолипаза A_2 инициирует деградацию мембранных фосфолипидов с образованием арахидоновой кислоты и фактора активации тромбоцитов. Открывание Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов приводит к выходу K^+ из клетки и, следовательно, ионов Cl^- и молекул воды, что уменьшает

объем эритроцита и повышает вязкость его интрацеллюлярного матрикса [19, 273]. Последнее вместе с тесным взаимодействием компонентов цитоскелета под влиянием Ca^{2+} и уменьшением эластичности мембраны эритроцитов из-за увеличения в ней соотношения холестерол/фосфолипиды снижает деформируемость эритроцитов [69, 109, 129, 139, 280].

В целом угнетение активности ферментов гликолиза, пентозо-фосфатного пути, антиоксидантной защиты и увеличение микро-вязкости клеточных мембран обуславливают несостоятельность Ca^{2+} -АТФазы и дефицит АТФ, что непременно завершается накоплением Ca^{2+} в цитозоле [74, 158]. Показано, что сиаловые кислоты гликопротеинов не только предохраняют эритроциты от непосредственной утилизации макрофагами РЭС, но и выполняют функцию кальций-связывающих компонентов на внешней поверхности клеточной мембраны, поэтому слущивание этих структур при старении эритроцитов может сопровождаться ростом ионной проницаемости плазмалеммы для кальция [152].

Известны случаи наследственно обусловленного дефицита ферментов, среди которых наиболее частым является сцепленный с полом дефицит Г-6-ФДГ и недостаточность пируваткиназы, сочетающаяся с макроцитозом эритроцитов и дефицитом калия в них [97, 255]. Однако самой распространенной ферментопатией эритроцитов является сцепленный с полом наследственный дефицит Г-6-ФДГ, которым страдают до 2% мужского населения в России, до 25% – в Азербайджане и странах Африки, до 62% – в Израиле [97] и более 400 млн человек в мире [200]. Фермент участвует в образовании НАДФН, необходимого для восстановления глутатиона, а его недостаточность обуславливает свободнорадикальное повреждение эритроцитов при употреблении окислителей с развитием гемолитического криза [82, 200].

В условиях физиологического старения эритроцитов окислительная модификация белковых структур клетки способствует деградации протеинов цитоскелета (фракции 4.1, 4.2, 6 и 7), а также агрегации белка полосы 3, который является анионным переносчиком и обеспечивает фиксацию цитоскелета в мембране эритроцитов [74, 173]. Врожденные аномалии цитоскелета эритроцитов описаны как наследственный сфероцитоз, обусловленный генетически

детерминированным дефектом спектрина, анкирина, белка полос 3, 4.2, и как наследственный эллиптоцитоз, связанный с дефектом спектрина, анкирина или гликофорина С [97, 141].

Изменение формы клеток красной крови также характерно для гемоглобинопатий, в основе которых лежит наследственно обусловленная качественная (серповидно-клеточная анемия) или количественная (талассемии) аномалия синтеза гемоглобина. Образование дрепаноцитов в первом случае и мишеневидных клеток во втором существенно снижает деформируемость таких эритроцитов [82, 97].

При этом известно, что форма двояковогнутого диска эритроцитов является оптимальной для их деформируемости, поскольку обеспечивает максимальную поверхность клетки при заданном объеме и возможность изменения формы без изменения объема клетки [3, 94, 129]. В ходе физиологического эритродиереза и истощения ферментных систем геометрия клетки неизбежно меняется: снижается соотношение поверхность/объем, т.е. происходит сферуляция эритроцитов [69, 129, 139, 280]. Одновременно имеет место уменьшение поверхности и объема клеток красной крови, что связано с удалением части поврежденной мембраны эритроцитов клетками РЭС или самими эритроцитами путем образования микровезикул [54, 69, 74, 132]. Уменьшение объема стареющего эритроцита при неизменном содержании гемоглобина в клетке ведет к увеличению вязкости цитоплазмы, что вместе с нарастанием микровязкости мембраны, деградацией и увеличением сродства белков цитоскелета, а также утратой дисковидной формы клетки снижает ее деформируемость [69].

Между тем способность эритроцитов к упругой деформации необходима для успешного прохождения через узкие фенистры «селезеночного фильтра», образованного ретикулярными клетками, ретикулярными волокнами, макрофагами, дендритными и эндотелиальными клетками. Задерживаясь в синусоидах селезенки, эритроциты пребывают в условиях умеренного закисления окружающего пространства, что служит дополнительным экстрацеллюлярным фактором, потенцирующим снижение их деформируемости, в результате чего они теряют способность проникать через выходные отверстия синусоидов [69, 97]. Ригидные эритроциты

(стареющие и поврежденные) подвергаются эритрофагоцитозу или ремоделированию эндотелиальными клетками венозных синусов и селезеночными макрофагами. При гиперспленизме интенсивность внутриклеточного гемолиза нарастает даже в отсутствие первичной патологии эритроцитов, что обусловлено гиперплазией эндотелиальных и иммунных элементов селезенки вследствие инфекционных заболеваний и нарушений иммунитета, а также появлением в ней метастазов опухолей и очагов внекостномозгового кроветворения [132, 219].

Примечательно, что клеточные элементы красной пульпы селезенки имеют уникальные антигенные характеристики и обладают подвижностью, что позволяет им иммунологически тестировать и фагоцитировать аномальные, старые эритроциты, покрытые антителами или несущие собственные модифицированные детерминанты [132, 295]. Так, при естественном старении клеток красной крови происходит образование агрегатов белка полосы 3, которые становятся носителями неоантигенов и обуславливают образование и связывание с ними иммуноглобулинов класса G [74, 220]. Данный процесс, как и микровезикуляция эритроцитов, усиливается при свободнорадикальном повреждении мембранных структур клетки [69, 74]. Иммунный механизм элиминации аномальных эритроцитов также активируется при гемобластозах, что связано с изменением антигенных свойств этих клеток, образованных при опухолевой трансформации кроветворной ткани [120].

Важно отметить, что даже в случае патологического усиления внутриклеточного гемолиза содержимое эритроцитов практически не поступает в плазму крови, аккумулируясь в клетках РЭС, где происходит катаболизм липидов и белков (включая глобиновую часть гемоглобина) по обычному для них пути, а гем метаболизируется с образованием железа, которое вновь используется организмом [97, 219].

Внутрисосудистый гемолиз, напротив, сопровождается поступлением в циркуляцию биологически активных компонентов цитоплазмы и мембраны эритроцитов, что оказывает системное действие на организм и требует включения более сложных механизмов утилизации продуктов деградации клеток красной крови [255].

1.2.2. Активация внутрисосудистого гемолиза при патологии

Еще в середине прошлого века было установлено, что в процессе внутрисосудистого гемолиза эритроциты проходят ряд стадий: прегемолитическую – сферуляция эритроцитов; осмотический гемоглобинолиз – распад и выход части гемоглобина в плазму, что связано с достижением эритроцитом критического объема (146% от первоначального) и увеличением размера пор в мембране более 6 нм; химический гемоглобинолиз – изменение химического состава (электрохимических и коллоидно-осмотических свойств) эритроцитов с полным отщеплением гемоглобина; полное разрушение клеточной структуры [3, 17]. При этом внутрисосудистая деструкция эритроцитов чаще всего обусловлена механическим повреждением или иммунными механизмами, реже – паразитарной инвазией.

Примером механического гемолиза служит маршевая гемоглобинурия – появление гемоглобина в моче при длительной ходьбе (беге) по твердой поверхности, что объясняется близостью капиллярной сети к поверхности стоп, где клетки крови подвергаются механическому воздействию [97]. В настоящее время основной категорией лиц, подверженных механическому гемолизу, являются больные с протезированными сосудами или клапанами сердца, эритроциты которых находятся в условиях турбулентного потока при прохождении через небольшой (меньший, чем в норме) просвет искусственного клапана. Показано, что деструкция эритроцитов особенно велика, если завихрения потока крови локализованы в области ее контакта с поверхностью протеза [4, 74, 383]. Также механическая гемолитическая анемия отмечена при гемолитико-уремическом синдроме, злокачественной гипертонии, метастатическом раке, ангиосаркомах [97].

В основе иммунных механизмов инициации внутрисосудистого гемолиза лежит перфорация клеточной мембраны эритроцитов мембраноатакующим комплексом комплемента, индуцирующая ионный дисбаланс клетки и ее осмотический лизис [76, 97]. Между тем, активация системы комплемента возможна как по классическому пути с участием антител, так и в отсутствие таковых – по альтернативному и лектиновому механизмам [92]. При этом антиэритроцитарные антитела появляются в крови ввиду нескольких причин. Изоиммунные антитела попадают в организм человека извне и

опосредуют посттрансфузионные гемолитические реакции при переливании крови, несовместимой по эритроцитарным антигенам. Гетероиммунные антитела нарабатываются на гаптены (химические вещества, вирусы), взаимодействующие с белками эритроцитов, аутоиммунные – на собственные не измененные антигены эритроцитов. Образование транsimмунных антител имеет значение только в неонатологии, поскольку они являются причиной внутрисосудистого гемолиза у плода вследствие поступления антител через плаценту от матери, больной аутоиммунной гемолитической анемией [97, 120].

Кроме того, активация системы комплемента без участия антител возможна при повышенной чувствительности клеток красной крови к его литическому действию. Так, приобретенный дефицит гликозилфосфатидилинозитола, фиксирующего молекулы-ингибиторы системы комплемента CD55 и CD59 в мембране эритроцитов, определяет манифестацию пароксизмальной ночной гемоглобинурии [259]. Появление гемоглобина в моче отмечается в ночное время, когда развивается незначительный физиологический ацидоз, активирующий систему комплемента и комплемент-зависимый лизис эритроцитов [97, 261]. Кроме того, дефицит CD55 имеет место при малярии и хронической почечной недостаточности, требующей проведения гемодиализной терапии [292, 336].

Таким образом, физиологический процесс разрушения эритроцитов достаточно динамичен и его патологическое усиление связано с действием множества факторов. При сочетанном их воздействии механизм интенсификации гемолиза значительно усложняется, что имеет место во время операций с искусственным кровообращением и после их завершения.

Глава 2

ИНТЕНСИВНОСТЬ ГЕМОЛИЗА И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЭРИТРОЦИТОВ У КАРДИОХИРУРГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

2.1. Состояние периферического звена эритрона при атеросклерозе коронарных артерий, предшествующее реваскуляризации миокарда

В настоящее время доказано, что такая высокоспециализированная клетка, как эритроцит, не только вовлекается в патологический процесс при гематологических заболеваниях, но и претерпевает серьезные изменения структуры и функции при болезнях разного генеза [73, 74]. Поэтому важно понимать, что выполнение операций коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения осуществляется на фоне предсуществующих структурно-метаболических перестроек в клетках красной крови, уже сформированных в процессе прогрессирования атеросклероза коронарных артерий.

Доподлинно известно, что для больных ИБС свойственно высокое содержание холестерина (ХС) в мембране эритроцитов (вследствие дислипопроотеинемии) и изменение фосфолипидного и жирнокислотного спектра последней: уменьшение содержания полиненасыщенных жирных кислот и фосфатидилхолина (ФХ) при увеличении доли фосфатидилсерина (ФС) и соотношения холестерол/фосфолипиды (ХС/ФЛ). Это обуславливает нарушение стабильности и структурной организации эритроцитарной мембраны, характеризующееся повышением микровязкости липидного бислоя, текучести зон белок-липидных контактов (анулярных липидов), увеличением числа структурных перестроек мембранных белков и повышением полярности внутренних гидрофобных областей мембраны [10, 45, 49, 52, 74, 100, 125, 275]. Дезорганизация эритроцитарной мембраны потенцируется значительным усилением процессов липопероксидации в сочетании с депрессией антиоксидантного потенциала эритроцитов, кото-

рые связаны с угнетением активности СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и снижением уровня восстановленного глутатиона, числа белковых SH-групп и содержания α -токоферола в эритроцитах [22, 63, 64, 188]. Возрастает скорость химического окисления гемоглобина, а, следовательно, содержание метгемоглобина и мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах [44]. Итогом нарушения организации липидной фазы мембраны эритроцитов и модификации ее белковых структур является дисфункция Ca^{2+} -АТФазы и Na^+/K^+ -АТФазы. Степень выраженности последней зависит от типа гиперлипидпротеинемии и нарастает с увеличением тяжести заболевания, как и соотношение ХС/ФЛ, являясь причиной прогрессивного углубления ионного дисбаланса клетки [10, 45, 49, 73, 125].

Кроме того, установлена взаимосвязь содержания ХС в мембране эритроцитов со степенью их анизоцитоза, величина которого является надежным независимым предиктором смертности у больных ИБС [274, 385]. Известно, что размер и форма эритроцитов являются важными факторами поддержания структуры потока крови в коронарных сосудах. Нарушения архитектоники мембраны эритроцитов при ИБС проявляются увеличением количества трансформированных клеток за счет повышения численности субпопуляций переходных (эллипсы, плоские диски, дискоциты с одним выростом, с гребнем, с множественными выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды) и необратимо измененных предгемолитических (сферические, куполообразные эритроциты и эритроциты в виде спущенного мяча) форм [45, 136]. По сравнению со стабильным течением ИБС при остром инфаркте миокарда увеличивается содержание ХС в мембране эритроцитов и число необратимо деформированных клеток (стоматоцитов и сфероцитов), повышается их агрегируемость [6, 129, 136, 386]. Выраженность этих изменений возрастает с глубиной поражения миокарда [6, 311].

В настоящее время предполагается участие эритроцитов в патогенезе атеросклероза и эволюции атеромы. Известно, что в процессе атерогенеза происходит ремоделирование сосудистой стенки, включающее ее неоваскуляризацию в области формирования бляшки, ядро которой содержит высокореактивную среду, что способствует микрокровоизлияниям в нее из *vasa vasorum* [300]. Поступившие в атерому

эритроциты, с одной стороны, фагоцитируются макрофагами, усиливая накопление ХС (в эритроцитах его в 1,5–2 раза больше, чем в других клетках организма), а с другой – привлекают нейтрофилы в очаг атероматоза, так как несут на своей поверхности IL-8 [342]. При этом уровень IL-8, связанного с мембраной эритроцитов, у больных с нестабильной стенокардией выше, чем при стабильной форме [387]. Кроме того, распад эритроцитов в условиях высокореактивной среды атеромы ведет к высвобождению гемоглобина, который под влиянием гидропероксидов липидов и пероксида водорода, образуемого фагоцитами, окисляется до метгемоглобина (Fe^{3+}) и феррилгемоглобина (Fe^{4+}). Первый легко теряет глобин, после чего гидрофобный гем внедряется в липидное ядро атеромы, где освобождает железо, которое в качестве иона с переменной валентностью обуславливает дальнейшее окисление липидов атеросклеротической бляшки. Второй – стимулирует эндотелиоциты к экспрессии адгезивных белков для лейкоцитов и, являясь нестабильным веществом, быстро восстанавливается до метгемоглобина, акцептируя электрон с тирозина α -цепи глобина. Это приводит к образованию тирозильного радикала в молекулах гемоглобина, их взаимодействию, формированию поперечных сшивок и мультимеров гемоглобина, наличие которых свидетельствует о том, что гидропероксид-опосредованное окисление липидов гемоглобином происходит в пределах повреждения [317, 354].

Вышеизложенное, наряду с верификацией в бляшках гликофорина А, экспрессируемого исключительно эритроидными клетками, и положительной корреляцией содержания ХС в мембране эритроцитов с объемом атеромы, подтверждает участие клеток красной крови в процессе атерогенеза [214, 342]. Вместе с тем, циркулирующие эритроциты в норме оказывают антиатерогенное действие, так как являются основным источником эпоксиэйкозатриеновых кислот (производные арахидоновой кислоты), которые высвобождаются из клеток через вновь образуемые поры в мембране при пассаже эритроцитов по микрососудам или при стимуляции пуриновых рецепторов, оказывая вазодилатирующее, профибринолитическое и противовоспалительное действие [247].

Следует отметить, что, несмотря на важное значение эритроцитов в развитии ИБС, многоплановое нарушение структурно-метаболических свойств клеток красной крови при данной патологии явля-

ется неспецифической клеточной реакцией на повреждение. Исследования последних 10 лет показали, что, независимо от патологии, этиологические факторы дисфункции эритроидных клеток инициируют универсальные механизмы их повреждения: дефицит энергопродукции, интенсификацию процессов свободнорадикального окисления и нарушение ионного гомеостаза клетки [73, 74, 210, 266].

Окислительная модификация мембранных структур и внутриклеточных белков эритроцитов сопровождается изменением механических свойств мембраны и эритроцитов в целом. Низкая деформируемость последних способствует их разрушению в сосудах микроциркуляции и кроверазрушающих органах. При этом активация перекисного окисления липидов (ПОЛ) играет роль триггерного механизма, обеспечивающего доступность липидно-белковых компонентов мембраны эритроцита соответственно для фосфолипаз и протеаз. Далее повреждение мембраны и ионный дисбаланс усиливают дефицит энергии, обусловленный свободнорадикальной модификацией ферментов гликолиза [33, 73]. Кроме того, уменьшение содержания макроэргов в эритроцитах сопровождается накоплением в клетках ионов Ca^{2+} , так как снижение уровня АТФ приводит к выключению ионных насосов и диффузии ионов Ca^{2+} из межклеточной среды. Накопление в эритроцитах ионов Ca^{2+} запускает активацию Ca^{2+} -зависимых фосфолипаз и протеаз, приводящих к дальнейшему нарушению структуры мембраны и повышению ее проницаемости, изменению метаболизма, ионного гомеостаза клетки, ее формы и функции [13, 45, 73, 129, 135, 154].

Неспецифические признаки вовлечения эритроцитарной мембраны в патологический процесс характеризуются снижением продолжительности жизни эритроцитов, которое сопряжено с нарушениями фосфолипидного спектра мембраны, снижением ее эластичности и метаболическими расстройствами, уменьшением содержания высокомолекулярных полипептидов, увеличением доли низкомолекулярных белков, а также изменением поверхностной архитектоники эритроцитов [73, 74, 129]. В крови увеличивается доля трансформированных форм красных клеток на фоне снижения содержания нормальных двояковогнутых дискоцитов, появление эндовизикул на мембране и (или) в примембранном пространстве клетки, а также отмечается агрегация белков [45].

Наряду с неспецифическими изменениями структурно-метаболического статуса эритроцитов при патологиях различного генеза отмечаются и некоторые особенности механизмов их реализации, ассоциированные с клиническим течением различных заболеваний, что актуально для пациентов с ИБС, имеющих сопутствующую патологию. Так, у больных сахарным диабетом неспецифическая дисфункция эритроцитов потенцируется хронической гипергликемией, которая индуцирует процессы свободнорадикального окисления и гликозилирование различных белков клетки, что лежит в основе угнетения деятельности ион-транспортирующих систем, гликолитических и антиоксидантных ферментов [45, 57, 73, 129]. При гипотиреозе отмечается нарастание полиморфизма циркулирующей эритроцитарной популяции клеток, что является признаком их ускоренного старения при недостатке гормонов щитовидной железы [45]. Гипертиреоз ассоциирован с усилением липопероксидации и дефицитом восстановленного глутатиона в эритроцитах на фоне активации ферментов антиоксидантной защиты клетки [304].

Эндогенная интоксикация вследствие механической желтухи сочетается с уменьшением радиуса центрального углубления эритроцитов, увеличением размеров и количества пор на их мембране и неравномерностью бифосфолипидного слоя, что коррелирует с длительностью желтушного периода [35]. По мере прогрессирования хронической почечной недостаточности усугубляется степень морфологической трансформации эритроцитов (преимущественно по сфероцитарному типу), микроцитоз и анемия, обеднение эритроцитарной мембраны ФЛ и ХС, увеличивается содержание лизофосфолипидов и нарастает ригидность клеток [13, 116]. При пороках клапанов сердца гипоксия, прогрессирующая в условиях нарастающей недостаточности кровообращения, обуславливает активацию эритропоэза и поступление в кровоток качественно неполноценных клеток, которые сравнительно быстро погибают в условиях аномального кровотока в области патологически измененных клапанов, а также при действии токсинов и ферментов стрептококка [45]. Длительная персистенция вирусных инфекций также сопровождается неспецифическими изменениями структурно-метаболического статуса эритроцитов, которые, однако, наблюдаются не только на фоне клинической манифестации инфекции, но и в отсутствие та-

ковой [45, 115]. При психопатологии признаки неспецифической дисфункции эритроцитов наиболее выражены при шизофрении, в меньшей степени – при экзогенно обусловленной умственной отсталости и еще менее – при невротических расстройствах [56, 74, 98]. Даже физиологическое старение человека сопровождается дезорганизацией липидного (и белкового) компонента эритроцитарной мембраны, аналогичной таковой при психических расстройствах старческого возраста – болезни Альцгеймера и сосудистой деменции, что связано с активацией фосфолипаз A_2 и D [53].

Таким образом, значительная модификация структурно-метаболических и функциональных свойств эритроцитов на фоне атеросклероза коронарных артерий и патологий иного генеза не вызывает сомнений. Подобные расстройства периферического звена эритрона до выполнения операции с ИК могут обуславливать высокую подверженность эритроцитов деструкции во время экстракорпорального кровообращения. Вместе с тем, многочисленные ограничения альтернативных способов реваскуляризации миокарда у больных ИБС не позволяют полностью отказаться от использования аппаратов ИК.

2.2. Феномен вариабельности внутрисосудистого гемолиза при операциях с искусственным кровообращением

Развитие внутрисосудистого гемолиза у кардиохирургических больных во время операций с ИК и после них является неизбежным компонентом постперфузионных реакций организма при хирургических вмешательствах на остановленном сердце [394, 407]. В ходе экстракорпоральной перфузии эритроциты подвергаются механической травме, действию низких и высоких температур, цитодеструктивному влиянию системы комплемента и свободных радикалов, инициирующих альтерацию и гибель клеток красной крови [25, 126, 310, 394, 395]. Чрезмерная интенсификация гемолитических реакций создает угрозу формирования почечной и дыхательной дисфункции, легочной и системной гипертензии, а при массивном гемолизе индуцирует внутрисосудистое свертывание крови и полиорганную недостаточность [25, 97, 192, 228, 246, 255].

Учитывая тяжесть клинических последствий массивного гемолиза, важно понимать причины и механизм его инициации. В современной литературе превалирует мнение об основополагающей

роли в развитии интраоперационного гемолиза типа перфузионного оборудования и условий перфузии [24, 25, 310, 394, 407]. Однако степень выраженности гемоглобинемии, очевидно, зависит не только от вида применяемых перфузионных систем и длительности ИК, но и от состояния пациента на момент хирургического вмешательства, а также структурно-функционального статуса эритроцитов. Подобное заключение позволяют сделать результаты выполненного в нашей лаборатории исследования, посвященного изучению структурно-метаболических и микрореологических свойств эритроцитов у больных ИБС с умеренной и выраженной гемоглобинемией после коронарного шунтирования в условиях ИК, проведенного с использованием идентичного перфузионного оборудования¹. Экстракорпоральная перфузия осуществлялась на аппарате ИК «Stokert» (Sorin Group Deutschland, Германия), оснащенный роликовыми насосами, с применением одноразовых мембранных оксигенаторов «Quadrox» (MAQUET AG, Германия). Для заполнения первичного объема аппарата ИК использовали физиологический раствор в объеме 1 200 мл и 400 мл полиглюкина. Объемная скорость перфузии рассчитывалась исходя из перфузионного индекса $2,5 \text{ л}/(\text{мин} \cdot \text{м}^2)$ и площади поверхности тела пациента. Основной этап операции выполнялся в условиях нормотермии и антеградной кровяной кардиоплегии (400 мл холодного раствора «Кустодиол» (Dr. F. Koehler Chemie GmbH, Германия) и венозная кровь в соотношении 1 : 4).

¹ Параметры структурно-метаболического статуса эритроцитов, их микрореологические свойства и показатели периферической крови исследовали у 150 больных (136 мужчин и 14 женщин) в возрасте от 49 до 72 лет с ишемической болезнью сердца, страдающих стенокардией напряжения III (реже II или IV) функционального класса и перенесших операцию коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения. Из исследования исключались пациенты с гематологическими заболеваниями, получавшие оксигенотерапию, препараты эритропоэтина или железа до операции и инфузию эритроцитарной массы во время перфузии, перенесшие сочетанные с коронарным шунтированием операции или продленное ИК (более 240 мин). Группу контроля составили 30 человек, находившиеся в состоянии относительного здоровья, не имеющие клинически верифицированной патологии кардиоваскулярной системы и системы крови, жалоб соответствующего характера и сопоставимые по полу и возрасту с группами больных ИБС ($56,38 \pm 2,14$ года).

Ретроспективно больные с ИБС были распределены на две группы, сформированные в зависимости от концентрации свободного гемоглобина в плазме крови через 1 ч после завершения перфузии: с умеренным гемолизом (гемоглобинемия менее 40 мг/дл, 98 человек) и с выраженным гемолизом (гемоглобинемия 40 мг/дл и более, 52 человека), исходя из того, что при гемоглобинемии свыше 40 мг/дл наблюдаются клинические проявления внутрисосудистого гемолиза (прежде всего, желтуха) [29]. При этом обращает на себя внимание тот факт, что клинический статус пациентов и характер медикаментозной терапии у больных ИБС групп сравнения в дооперационном периоде несколько отличались: среди лиц с умеренной гемоглобинемией чаще регистрировались² заболевания почек и применение эналаприла, в то время как у пациентов с выраженным гемолизом – патологии легких, назначение фозиноприла и метопролола (табл. П.1, П.2).

Результаты исследования показали, что концентрация свободного гемоглобина³ в плазме крови у больных ИБС обеих групп сравнения превышала контрольные значения⁴ не только после операции, но и до ее проведения (табл. П.3). Последнее, видимо, отражает

² Рассчитывали частоту встречаемости качественных признаков в популяции: w – выборочную долю и Sw – среднюю ошибку выборочной доли (%). Проверку гипотезы о равенстве долей в двух исследуемых выборках проводили методом угловой трансформации, основанным на ϕ -преобразовании Фишера, с введением поправки Йейтса на непрерывность. Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

³ Концентрацию свободного гемоглобина в плазме крови измеряли бензидиновым методом [48].

⁴ Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ Statistica for Windows (2000, версия 8.0). Результаты представляли как $\bar{X} \pm m$, где \bar{X} – среднее арифметическое, m – ошибка среднего. Проверку нормальности распределения количественных показателей выполняли с использованием теста Шапиро–Уилка. Для оценки достоверности различия выборок, подчиняющихся нормальному распределению, применяли t -критерий Стьюдента. Для оценки выборок с распределением вариантов, отличающихся от нормального закона распределения, использовали непараметрический критерий Манна–Уитни (для независимых выборок) и тест Вилкоксона (для зависимых выборок). Различия считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

дисфункцию эритроцитов на фоне атеросклероза, ведущую к ускоренной их гибели и компенсаторной активации эритропоэза. Известно, что избыточное содержание холестерина в мембране эритроцитов при атеросклерозе сопровождается повышением ее микровязкости, что затрудняет функционирование систем трансмембранного ионного транспорта, подвергающихся частичной деградации при действии большого количества свободных радикалов, генерируемых в эритроцитах в условиях дефицита эндогенных антиоксидантов [73, 74, 107, 210, 266]. В целом это определяет снижение деформируемости эритроцитов и еще до операции обуславливает их гибель путем внутриклеточного гемолиза при прохождении клеток через селезеночный фильтр [97, 195]. Однако развитие внутриклеточного гемолиза не сопровождается поступлением свободного гемоглобина в плазму крови [97, 106, 120], поэтому гемоглобинемия у больных ИБС обеих групп исследования до операции можно расценивать как признак внутрисосудистого гемолиза, который в большей степени проявляется у лиц с выраженной постперфузионной гемоглобинемией. Причиной этого может быть как травма эритроцитов с пониженной механической резистентностью в условиях аномального тока крови в непосредственной близости от атеросклеротической бляшки, так и комплемент-зависимый лизис клеток на фоне чрезмерной активации системы комплемента. Тем не менее, основным путем эритродиализа в дооперационном периоде является внутриклеточный гемолиз, так как до операции дефицит гаптоглобина⁵ в крови, который характерен для интенсивного внутрисосудистого лизиса эритроцитов [97, 106, 120, 195], не регистрировался (табл. П.3).

После операции степень выраженности гемоглобинемии у больных ИБС обеих групп исследования еще более нарастала по сравнению с исходными значениями на фоне снижения концентрации гаптоглобина в крови (табл. П.3), что свидетельствует об интенсификации внутрисосудистого гемолиза во время ИК. Последнее

⁵ Содержание гаптоглобина в плазме крови оценивали иммунотурбидиметрическим методом с помощью коммерческого набора Haptoglobin (Sentinel Diagnostics, Италия) согласно инструкции производителя.

традиционно связывают с механической травмой эритроцитов, обусловленной формированием турбулентного потока крови с критической величиной деформации сдвига, действием струйных сил, сил гидродинамического удара и поверхностного натяжения, влиянием повышенного давления в насосах аппарата ИК и отрицательного давления в коронарном отсосе [25, 310, 394, 407]. Кроме того, негативное влияние на гемолитическую стойкость эритроцитов во время ИК оказывают гипероксемия и активация системы комплемента [51, 194, 208, 392].

При этом важным фактором, определяющим степень интраоперационного гемолиза, является длительность ИК [24, 25, 394, 407]. Следует отметить, что время ИК у больных с выраженным гемолизом было лишь на 23% больше, чем у пациентов с умеренной гемоглобинемией (табл. П.4), в то время как уровень постперфузионной гемоглобинемии оказался выше такового в 2,6 раза (см. табл. П.3). Более того, вычисление нормализованного индекса гемолиза⁶ (НИГ), учитывающего гемодилюцию и длительность ИК и, соответственно, нивелирующего их влияние на выраженность постперфузионного гемолиза [24, 256], обнаружило почти трехкратное превышение данного показателя у кардиохирургических больных с выраженным постперфузионным гемолизом по сравнению с пациентами с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.3). Следовательно, массивный лизис эритроцитов нельзя объяснить только большей продолжительностью экстракорпоральной перфузии.

К подобному выводу пришли И.И. Дементьева и соавт. (2010), которые установили, что при нормотермическом ИК время перфузии оказывает неравнозначное влияние на выраженность гемолиза: при непродолжительном (менее 60 мин) экстракорпоральном кровообращении НИГ не превышает допустимых значений (до 0,050 мг/дл), в то время как при длительном (более 60 мин) ИК зна-

⁶ Нормализованный индекс гемолиза (мг/дл) вычисляли по формуле [24, 256]: $\text{НИГ} = \Delta \text{Нб}_{\text{св}} \cdot V \cdot (1 - \text{Нст}/100) \cdot 100 / (Q \cdot t)$, где $\Delta \text{Нб}_{\text{св}}$ – прирост свободного гемоглобина в плазме крови за время ИК, мг/дл; V – объем заполнения аппарата ИК, л; Нст – средний гематокрит во время ИК, %; Q – объемная скорость перфузии, л/мин; t – время ИК, мин.

чения этого индекса возрастают практически в 2 раза. Тем не менее, в пределах временного диапазона от 60 до 240 мин увеличение длительности ИК не сопровождается достоверным повышением НИГ, и отмечается только после 240-й мин перфузии [24].

Исходя из вышеизложенного и учитывая, что одним из критериев исключения больных из настоящего исследования являлось время ИК более 240 мин, а средняя его продолжительность в группах кардиохирургических больных составляла 100–120 мин, можно с уверенностью заключить, что длительность экстракорпоральной перфузии не может являться причиной столь значимых различий в интенсивности гемолитических реакций у обследованных групп пациентов. Это же подтверждается и результатами статистического анализа, которые демонстрируют слабую положительную корреляционную связь⁷ между временем ИК и концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после операции ($r = 0,39$; $p < 0,05$), при этом двухфакторный дисперсионный анализ показывает, что лишь 10,8% ($p < 0,05$) вариабельности постперфузионной гемоглобинемии обусловлено вариацией времени ИК.

Как известно, другими факторами экстракорпоральной перфузии, индуцирующими интраоперационное разрушение эритроцитов, являются функционирование коронарного отсоса и степень оксигенации крови во время хирургического вмешательства [51, 310, 394]. Между тем, скорость работы коронарного отсоса и средние (за операцию) значения парциального давления кислорода в артериальной крови (pO_2) были сопоставимыми в группах кардиохирургических пациентов (см. табл. П.4), а значит, не могли повлиять на интенсивность внутрисосудистого гемолиза. Отмечено, что у больных с выраженной гемоглобинемией максимальное значение pO_2 в крови во время операции превышало на 11% аналогичный

⁷ Для оценки взаимосвязей между количественными показателями вычисляли коэффициент корреляции Спирмена, для качественных признаков рассчитывали коэффициент ассоциации. С целью определения вклада изучаемых факторов в вариабельность результативного признака использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ. Коэффициенты корреляции, ассоциации и результаты дисперсионного анализа считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$.

показатель у пациентов с умеренным гемолизом (см. табл. П.4). Однако различие по этой величине между группами пациентов было небольшим, чтобы вызвать столь значимое изменение (в 2,6 раза, см. табл. П.3) уровня постперфузионной гемоглобинемии. К тому же максимальное значение pO_2 в крови, как и длительность ИК, слабо коррелировало с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после операции ($r = 0,41$; $p < 0,05$), а дисперсионный анализ подтвердил низкий вклад этой величины в вариабельность постперфузионного гемолиза – всего 13,4% ($p < 0,05$). Кроме того, сочетанное влияние обоих факторов (времени ИК и максимального значения pO_2 в крови) на интенсивность разрушения эритроцитов во время операции не было статистически значимым (8,92%; $p > 0,05$), т.е. они не потенцируют друг друга.

Резюмируя вышеизложенное, можно констатировать, что даже при использовании одинакового оборудования особенности перфузиологического этапа операции не могут объяснить формирование выраженной гемоглобинемии у 35% оперированных лиц (см. табл. П.1). Следовательно, у части больных ИБС до операции, вероятно, имеет место качественный дефект эритроцитов, снижающий их гемолитическую стойкость во время ИК, что может быть связано с нарушением микрореологических свойств эритроцитов, их антиоксидантного статуса или структурной организации мембраны клеток красной крови.

Глава 3

ВЛИЯНИЕ МИКРОРЕОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭРИТРОЦИТОВ НА ВЫРАЖЕННОСТЬ ГЕМОЛИЗА ПОСЛЕ ИСКУССТВЕННОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ

3.1. Современные представления о механической травме эритроцитов и нарушении их микрореологических свойств в ходе экстракорпоральной перфузии

Причины постперфузионного гемолиза, обусловленные техническими особенностями аппаратов ИК, были определены Е. Peirce еще в 1969 г. Это механическое воздействие насоса, силы поверхностного натяжения в пузырьковых оксигенаторах, силы сдвига вследствие резких изменений площади поперечного сечения канюль и трубок, а также струйные силы, возникающие при высокой скорости движения клеток крови [25]. Позже J. Mulholland и его коллеги (2000) перечислили основные динамические силы, приводящие к травме клеток крови: положительное и отрицательное давление, напряжение сдвига, силы гидродинамического удара. Кроме того, не-эндотелизированная поверхность экстракорпорального контура и интерфаза «кровь – газ» также служат дополнительными факторами травмы клеток крови [310].

Форменные элементы крови особенно восприимчивы к воздействию напряжения сдвига, которое является тангенциальной силой [231]. Способность эритроцитов сохранять свою целостность в условиях экстремальной сдвиговой деформации зависит от стабильности их мембраны, которая определяется состоянием белкового цитоскелета и структурой липидного матрикса цитолеммы. Насыщенные жирные кислоты оказывают большее сопротивление сжатию, чем ненасыщенные, но обеспечивают меньшее растяжение бислоя; холестерол увеличивает не только сопротивление сжатию, но и препятствует разрыву мембраны. Между тем, при температурах выше фазового перехода фосфолипидный бислой не обладает жесткостью, поэтому поведе-

ние эритроцитов как упруго твердого тела, в основном, обусловлено состоянием цитоскелета. При этом увеличение сродства его компонентов друг к другу повышает стабильность мембраны и тем сильнее, чем больше количество Ca^{2+} , поступившего в клетку во время сдвиговой деформации [109]. Однако избыток этого катиона индуцирует ряд деструктивных процессов в клетке – активацию скрэблазы и фосфолипаз, потерю калия и эриптоз [19].

Традиционно считается, что кардиотомный отсос является самой травматичной для клеток крови частью экстракорпорального контура, и при попадании воздуха в линию отсоса интенсивность гемолиза возрастает примерно в три раза [407]. J. Mulholland с коллегами (2000) показали, что механическое повреждение клеток крови за счет поступательного продвижения аспирата по трубке кардиотомного отсоса не имеет основного значения. Максимальный прирост свободного гемоглобина они обнаружили при сочетанном воздействии на кровь интерфейсы «воздух – кровь» и отрицательного давления, чем при действии этих факторов в отдельности. При этом скорость движения клеток крови не является ведущим фактором в развитии травмы форменных элементов. Решающее значение имеет высокая скорость поступления воздуха в линию отсоса [310].

Разрушение эритроцитов под действием выраженных напряжений сдвига происходит в тех частях экстракорпорального контура, где наблюдаются высокие линейные скорости потока, при которых происходит нарушение ламинарного движения крови с переходом его в турбулентное течение. Это наблюдается в местах сужений экстракорпорального контура, например, в катетерах и канюлях. Показано, что в стандартных артериальных канюлях с внутренним диаметром 6–8 мм невозможно поддерживать ламинарный поток крови уже при объемной скорости потока более 3 л/мин. Однако при скоростях перфузии до 5 л/мин граница перехода ламинарного потока в турбулентный превышает незначительно [407]. При этом уровень сдвиговой деформации может достигать как порога сублетальных повреждений клеток красной крови (свыше 43 Н/м²), так и гемолитического порога (более 150 Н/м²) [378, 394]. Не исключено, что существенный вклад в появление гемолиза вносит перееливание отмытых аутоэритроцитов из дренажной крови или крови, излившейся в операционную рану. Это, по-видимому, связано

с нарушением свойств мембраны эритроцита в процессе аппаратной обработки [25, 412].

Механическая травма эритроцитов становится причиной непосредственного повреждения клеток в перфузионных системах. Кроме того, проведение ИК сопряжено и с рядом других факторов, индуцирующих опосредованную альтерацию эритроцитов путем изменения их реологических характеристик, определяющих гемолитическую стойкость клеток красной крови в условиях нефизиологического кровотока. Как известно, основными параметрами, модулирующими реологические свойства крови, являются вязкость плазмы, агрегационная способность и деформируемость эритроцитов. Последние два фактора, наряду со стабильностью мембраны, не влияющей на текучесть крови, регламентируют поведение этих клеток в потоке и преимущественно реализуются в различных компартментах кровеносного русла. Агрегация эритроцитов проявляется при низкой скорости движения крови, что в пределах организма имеет место в капиллярах и емкостных сосудах [60, 94]. Биологическая роль деформируемости заключается в оксигенации тканей, поэтому ее значение наиболее важно в микроциркуляторном русле при умеренной скорости движения крови. Стабильность мембраны эритроцитов обеспечивает сохранение целостности клеток в магистральных артериях, где эритроциты не участвуют в газообмене, а их главной задачей становится выживание при высокой скорости потока [109].

Проводя аналогию с организмом человека, в аппарате ИК проявление агрегируемости эритроцитов наиболее вероятно в кардиотомном резервуаре, где собирается кровь пациента из венозной магистралей и дренажей; проявление деформируемости клеток – в оксигенаторе, имитирующем легочную капиллярную сеть; реализация стабильности мембраны – в артериальном насосе, магистральных, канюлях, вакуумных дренажах, которые имеют малый просвет и ассоциированы с воздействием высокого давления [65, 108].

Об изменении деформируемости эритроцитов после ИК имеется достаточно много сведений, демонстрирующих как снижение этого показателя [238, 416], так и варьирование его в пределах дооперационных значений [378]. Деформируемость эритроцитов представляет собой способность клеток видоизменять свою форму в

сдвиговом потоке, сохраняя объем и площадь поверхности на исходном уровне, чему способствует дисковидная форма эритроцита, обусловленная наличием цитоскелета [3, 93, 129, 139]. Фиксация белковой сети цитоскелета к внутренней поверхности липидного бислоя осуществляется благодаря взаимодействию спектрина с анкирином, аддуцином или белком полосы 4.1, которые связаны либо с цитоплазматическими доменами интегральных белков мембраны (белок полосы 3, гликофорины А, С и D), либо непосредственно с фосфатидилсерином [109, 167, 211].

В отношении модуляции агрегируемости эритроцитов при операциях с ИК сведения немногочисленны. Поскольку во время ИК содержание белковых компонентов плазмы крови, необходимых для межклеточного взаимодействия, снижается вследствие гемодилюции, то агрегация эритроцитов после экстракорпоральной перфузии имеет аналогичную тенденцию [221, 308]. Благоприятное значение этого феномена предопределило недостаточный интерес исследователей к изучению агрегируемости эритроцитов при операциях на остановленном сердце. В то же время известно, что агрегация эритроцитов при низкой скорости кровотока (*in vivo* имеет место в сосудах венозного русла) определяет около 60% периферического сопротивления [169]. Последнее приобретает особое значение во время операции, поскольку горизонтальное положение больного и воздействие общей анестезии способствуют замедлению кровотока в периферических сосудах на 50%, что создает благоприятные условия для максимального проявления гемореологических расстройств [54, 68, 416].

Следует отметить, что в отличие от агглютинации, агрегация эритроцитов обратима и существует в физиологических условиях. При достижении определенной величины напряжения сдвига в кровотоке агрегаты клеток разрушаются, после чего эритроциты циркулируют изолированно друг от друга [60, 70, 94, 169, 251]. Однако если прочность агрегатов велика, что характерно для патологической агрегации, то деструкция конгломератов происходит при более высоких скоростях потока крови и поэтому может сопровождаться нарушением целостности мембраны эритроцитов, особенно в области межклеточных контактов, опосредованных фибриногеном, где даже в покое формируется локальное выпячивание цитоплазмы клетки [69, 130]. Кроме того, нарушение агрегационных

свойств эритроцитов модифицирует упорядоченность их в кровеносном русле, способствуя превращению ламинарного течения крови в турбулентное и усугубляя тем самым механическую травму эритроцитов в составе конгломератов или свободно расположенных клеток [94]. Некоторыми авторами было показано, что в процессе агрегации эритроцитов из них могут высвобождаться АДФ и другие компоненты цитоплазмы [131].

Несомненно, важным аспектом в механизмах нарушения агрегируемости и деформируемости эритроцитов на фоне ИК является ионный дисбаланс. Установлено, что проведение экстракорпоральной перфузии повышает содержание Na^+ и Ca^{2+} в клетках красной крови, снижая уровень внутриклеточного K^+ [238, 416]. Высокая проницаемость мембраны эритроцитов для катионов вызвана уменьшением плотности упаковки липидного бислоя при сдвиговой деформации [109]. При этом на долю дисбаланса Na^+/K^+ -соотношения приходится примерно 20% постперфузионного повышения ригидности клеток красной крови, а ведущая роль принадлежит прогрессивному накоплению Ca^{2+} в эритроцитах [238]. Избыток данного катиона обеспечивает тесное взаимодействие белков цитоскелета между собой за счет кальмодулин-зависимой активации аддуцина, снижая деформируемость эритроцитов, и индуцирует открывание Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, выход ионов K^+ , воды и нарастание вязкости цитоплазмы [87, 99, 109].

Кроме того, деформируемость эритроцитов сильно зависит от вязкостно-эластических свойств липидного бислоя, которые определяются соотношением ХС/ФЛ и содержанием ненасыщенных жирных кислот в мембране [74, 109, 129, 235]. В условиях физиологических температур фосфолипидный бислой представляет собой жидкокристаллическую структуру, однако претерпевая фазовый переход, который для многих насыщенных жиров находится в области $+18...25^\circ\text{C}$, поверхностное натяжение в мембране сильно нарастает, что чревато ее электрическим пробоем и деструкцией клетки [2]. Между тем, действие низких температур на клетки крови при ИК свойственно не только гипотермическим перфузиям, но и нормотермическим, так как пассаж холодного ($+4...12^\circ\text{C}$) кардиоплегического раствора по сердцу завершается поступлением его в правое предсердие и общий контур экстракорпоральной циркуляции [65,

127]. Ввиду того, что ненасыщенные жирные кислоты претерпевают фазовый переход при более низких температурах, чем насыщенные, уменьшение их содержания в мембране снижает резистентность эритроцитов не только к механическому, но и к термическому воздействию.

Таким образом, изменения деформируемости, агрегируемости и поверхностной архитектоники эритроцитов непосредственным образом влияют на способность этих клеток перемещаться в просвете капилляров и противостоять сдвиговой деформации в аппарате ИК. Вследствие увеличения агрегационной способности или снижения деформируемости эритроцитов вязкость крови нарастает, а высокое сопротивление току крови требует большего градиента давления [60], что может привести к альтерации форменных элементов крови при экстракорпоральной перфузии.

3.2. Факторы агрегации эритроцитов при умеренном и выраженном постперфузионном гемолизе

Изучение агрегационных свойств эритроцитов показало⁸, что коэффициент их агрегации у больных ИБС с умеренной гемоглибинемией до и после ИК соответствовал норме, а у пациентов с выраженной гемоглибинемией превышал таковую (см. табл. П.5). При этом размер агрегатов (количество эритроцитов в агрегате) у больных обеих групп не отличался от значений этого параметра у здоровых доноров вне зависимости от этапа исследования (см. табл. П.5).

Увеличение агрегируемости эритроцитов (или тенденция к ее повышению) у больных ИБС связано, очевидно, с течением основного и наличием сопутствующих заболеваний. Показано, что агрегационная активность эритроцитов значительно возрастает при ИБС, гипертонической болезни, ишемическом инсульте, сахарном диабете, а также при онкологических, воспалительных, инфекционных и аутоиммунных заболеваниях, неотложных состояниях, обусловленных травмой, и при хирургических вмешательствах [71,

⁸ Агрегационную способность клеток красной крови исследовали микроскопическим методом, оценивая долю эритроцитов, участвующих в агрегации (коэффициент агрегации), и среднее количество клеток, включенных в агрегат [60].

81, 95, 142, 375]. Универсальность этого явления при патологии, вероятно, объясняется широким спектром модулирующих его факторов, таких как поверхностный заряд мембраны эритроцитов, их морфологические свойства, содержание фибриногена и иммуноглобулинов в плазме крови, а также контакт крови с инородными поверхностями [74, 94].

Интересно, что в послеоперационном периоде агрегационная активность эритроцитов как у больных с умеренным, так и с выраженным гемолизом принципиально не изменялась, хотя отмечалась отчетливая тенденция к увеличению коэффициента агрегации относительно дооперационного этапа (см. табл. П.5). Следует отметить, что в литературе нет единого мнения о влиянии ИК на агрегируемость клеток красной крови. По мнению одних авторов, агрегационная способность эритроцитов после экстракорпоральной перфузии снижается вследствие гемодилюции [221, 308], по данным других – усиливается на фоне снижения деформируемости эритроцитов после оперативного вмешательства [54, 68, 416].

Тем не менее, у больных с выраженным гемолизом агрегационная способность эритроцитов оказалась повышенной и до операции и после нее, в основе чего могут лежать различные механизмы. Известно, что агрегируемость эритроцитов обратно пропорциональна величине их поверхностного заряда. В норме мембрана эритроцитов имеет отрицательный электрический заряд, создающий ζ -потенциал (разность потенциалов между эритроцитом и плазмой), величина которого определяется в основном наличием на поверхности клеток различных макромолекул: с одной стороны, электроотрицательных сиаловых кислот, а с другой – белков, адсорбированных из плазмы и экранирующих заряд [54, 60, 94, 133]. Таким образом, агрегационная энергия между соседними эритроцитами определяется балансом между энергией объединения за счет макромолекул, адсорбированных на клетках, и дезагрегационной энергией, создаваемой напряжением сдвига и электростатическим отталкиванием.

На поверхности эритроцитов сиаловые кислоты содержатся в составе гликофоринов – самых многочисленных белков эритроцитарной мембраны (10^6 молекул на клетку), экстраклеточные домены которых богаты полисахаридами и придают поверхности сильный отрицательный заряд [77, 105]. Так, определение в крови эритроци-

тов, экспрессирующих гликофорины⁹ А и В, позволило выявить их низкое относительное содержание у больных ИБС с умеренным гемолизом до операции с последующей нормализацией этих параметров после хирургического вмешательства (см. табл. П.5). У больных с выраженным гемолизом величина данных показателей находилась в пределах контрольных значений независимо от этапа исследования (см. табл. П.5). Ввиду этого можно заключить, что повышенная агрегируемость эритроцитов у этой категории лиц, очевидно, не связана с экспрессией гликофоринов и, вероятно, обусловлена иными механизмами.

Причиной неравнозначной численности гликофорин-позитивных эритроцитов у пациентов с умеренным и выраженным гемолизом, по всей видимости, является различное количество молодых форм клеток (ретикулоцитов) в циркуляции, так как в силу морфофункциональных особенностей зрелые эритроциты неспособны к синтезу белка и липидов, поэтому все компоненты мембраны и внутриклеточного содержимого они приобретают только в процессе эритропоэза [74, 132, 213]. По данным литературы, гликофорин В (CD235b) экспрессируется на эритроидных клетках с момента проявления ими морфологических свойств вплоть до зрелых эритроцитов [287]. Раннее созревание ретикулоцитов сопровождается избирательным удалением некоторых мембранных белков – рецепторов трансферрина (CD71), CD98, β 1-интегринов путем эндо- и экзоцитоза. Позднее созревание ретикулоцитов, напротив, характеризуется интернализацией плазматической мембраны и генерацией на цитоплазматической поверхности мембраны крупных везикул, содержащих гликофорин А, которые перед экзоцитозом сливаются с аутофагосомами [224]. Показано, что при созревании ретикулоцитов в эритроциты происходит значительное уменьшение содержания многих интегральных белков в клеточной мембране, таких как гликофорин А,

⁹ Экспрессию гликофоринов А и В на мембране эритроцитов оценивали с помощью метода прямой поверхностной иммунофлуоресценции, используя комплементарные моноклональные антитела, меченные флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) фирмы Santa Cruz Biotechnology, INC (США) согласно инструкции по иммуногистохимии, изложенной на официальном сайте производителя. Результат выражали как процент положительных клеток из общего числа эритроцитов.

молекулы межклеточной адгезии 4-го типа, CD47, антигенные детерминанты систем групп крови Kell и Duffy и др. [287]. В дальнейшем, по мере старения эритроцитов экспонирование сиаловых кислот и гликофоринов продолжает уменьшаться, что сопровождается нейтрализацией поверхностного заряда и служит сигналом к разрушению клеток макрофагами ретикулоэндотелиальной системы [105, 325]. Кроме того, снижение электрического заряда мембраны клеток красной крови обнаруживается при различной патологии. В частности, снижение содержания сиаловых кислот в мембране эритроцитов ассоциировано с высокой концентрацией триацилглицеролов в сыворотке крови и регистрируется у пациентов с гиперхолестеролиемией [90].

Учитывая изложенное, изменение численности гликофорин-позитивных клеток в популяции циркулирующих эритроцитов, по всей видимости, определяется ее возрастными характеристиками и отражает динамику содержания молодых клеточных форм (ретикулоцитов) в крови. Так, анализ суправитально окрашенных мазков периферической крови показал, что при исходно (до операции) повышенном содержании ретикулоцитов в крови у больных ИБС обеих групп исследования, у пациентов с выраженным гемолизом доля ретикулоцитов в крови была еще большей, чем в группе сравнения (см. табл. П.3). Данный факт отражает усиление эритропоэтической функции костного мозга на фоне ИБС и сопутствующей недостаточности кровообращения, которая выявлялась у 100% оперированных лиц (см. табл. П.1). Как известно, развитие атеросклероза сопровождается глубокой дисфункцией клеток красной крови и ускоренной их гибелью, что в сочетании с циркуляторной гипоксией индуцирует активацию эритропоэза и поступление в кровоток большого количества молодых форм эритроцитов [69, 74, 196, 264]. Поэтому вполне закономерно, что подобная компенсаторно-приспособительная реакция оказалась более выраженной у больных с высоким дооперационным уровнем гемоглобинемии (т.е. у пациентов с выраженным постперфузионным гемолизом, см. табл. П.3). Следовательно, исходно нормальное содержание гликофорин A⁺ и B⁺ эритроцитов у больных с выраженным постперфузионным гемолизом, вероятно, обусловлено циркуляцией в крови более молодой (чем у больных с умеренной гемоглобинемией) популяции эритроцитов.

В ходе реваскуляризации миокарда содержание ретикулоцитов в крови у больных ИБС в настоящем исследовании увеличивалось вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (см. табл. П.3). Поступление ретикулоцитов в кровоток в столь короткие сроки (через 6–7 ч от начала операции и кровопотери) нельзя объяснить интраоперационной активацией эритропоэза, что требует около 3–4 сут [97, 106, 120]. Вероятно, во время ИК происходит мобилизация костномозгового пула клеток красной крови, в результате чего в периферическую кровь поступают депонированные ретикулоциты, которые после образования еще в течение 36–44 ч остаются в костном мозге, затем покидают пределы кроветворной ткани и на протяжении последующих 24–30 ч созревают в периферической крови [97]. Увеличение численности ретикулоцитов в крови после операции с применением ИК было зарегистрировано также и другими исследователями [183].

Следует отметить, что увеличение содержания ретикулоцитов в крови после хирургического вмешательства зависела от выраженности постперфузионного гемолиза: у пациентов с умеренным гемолизом показатель возрастал на 87%, а при выраженной гемоглобинемии – на 30% (см. табл. П.3). Учитывая, что до операции содержание ретикулоцитов в крови определялось повышенным именно у последней категории пациентов (см. табл. П.3), подобная реакция, видимо, отражает сокращение костномозгового резерва молодых форм эритроцитов перед операцией вследствие ускоренной их элиминации в ответ на чрезмерную деструкцию зрелых клеток (гемоглобинемию) до хирургического вмешательства (см. табл. П.3). Вероятно, этим было обусловлено отсутствие положительной динамики численности гликифорин-положительных клеток у больных ИБС с выраженным гемолизом (см. табл. П.5). У пациентов с умеренной гемоглобинемией костномозговой резерв эритроцитов, по всей видимости, оказался сохранным, определив более чем 2-кратный профицит ретикулоцитов после хирургического вмешательства (см. табл. П.3).

Послеоперационное увеличение (до нормы) содержания гликофорин А⁺ и гликофорин В⁺ эритроцитов в крови у кардиохирургических больных с умеренным гемолизом (см. табл. П.5), очевидно, имеет благоприятное значение, так как может снижать агрегацию

клеток между собой и взаимодействие их с синтетическими поверхностями экстракорпорального контура. При этом дефицит гликофорин-положительных клеток до операции у данной категории лиц, вероятно, отражает ускоренное старение эритроцитов на фоне атерогенеза и является одним из механизмов их гибели при ИБС. У больных с выраженным гемолизом ускоренная гибель эритроцитов до операции уравнивается более интенсивной регенерацией красного ростка, что обуславливает нормальное содержание гликофорин А⁺ и гликофорин В⁺ эритроцитов в крови в до- и послеоперационном периоде. Следовательно, экспрессия данных молекул не влияет на формирование выраженной гемоглобинемии после ИК и высокую агрегируемость эритроцитов. Возможно, причина данного явления кроется в избыточной сорбции на клетках красной крови плазменных белков, экранирующих отрицательный заряд гликофоринов.

Согласно принципам гемореологии, агрегация эритроцитов опосредуется высокомолекулярными соединениями, в том числе белковыми молекулами: фибриногеном, а также иммуноглобулинами и альбумином [60, 95, 113, 142, 375]. В частности, синергичное проагрегантное действие фибриногена, иммуноглобулинов и альбумина имеет место лишь в том случае, если в плазме имеется повышенная концентрация данного прокоагулянта. Если же содержание фибриногена уменьшается, то альбумин начинает оказывать дезагрегантный эффект, а действие иммуноглобулинов нивелируется [155]. Интересно, что помимо неспецифической сорбции фибриногена на эритроцитах происходит и его специфическое связывание. Например, у крыс количество подобных специфических сайтов для взаимодействия с фибриногеном составляет в среднем более 1800 участков на один эритроцит. Даже если содержание фибриногена находится в пределах нормы, то около 80% эритроцитарных сайтов связывания занято фибриногеном [288]. Кроме того, продукты деградации фибриногена также способны взаимодействовать с мембранами эритроцитов. При этом количество связанного фибриногена пропорционально его концентрации в суспензионной среде (при концентрациях от 3,0 до 10 г/л) и в норме не зависит от содержания других белков плазмы или Ca²⁺ [353].

Определение концентрации фибриногена¹⁰ в плазме крови кардиохирургических больных показало высокое его содержание только у пациентов с выраженной постперфузионной гемоглобинемией и только в дооперационном периоде (см. табл. П.5). Учитывая, что аналогичное отклонение было характерно и для количества гаптоглобина в крови (см. табл. П.3), подобное состояние можно расценивать как проявление системной воспалительной реакции, которая имеет место при ИБС и сопровождается синтезом белков острой фазы [172, 397]. Фибриноген и гаптоглобин относятся к одной группе реактантов острой фазы, достаточно инертных по своей кинетике синтеза гепатоцитами. Концентрация этих протеинов существенно увеличивается (в 2–5 раз) под влиянием провоспалительных цитокинов (преимущественно IL-6) и зависит не только от интенсивности воспаления, но и от объема повреждения тканей [11, 163, 321]. Подобные изменения белкового состава плазмы крови в дооперационном периоде у больных ИБС с выраженным гемолизом могут быть обусловлены большей (чем в группе сравнения) площадью атеросклеротического поражения сосудов и (или) более глубоким нарушением функционального состояния печени. Так, заболевания печени и желчевыводящих путей регистрировались в 42% случаев у кардиохирургических больных при выраженном гемолизе и только у 25% пациентов с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.1).

Сопоставляя результаты исследования, можно констатировать, что повышенный до операции уровень фибриногена в плазме крови у больных с выраженным гемолизом сочетался с гиперагрегацией эритроцитов, в то время как отсутствие его отклонений от нормы у пациентов с умеренной гемоглобинемией – с нормальной агрегируемостью клеток красной крови (см. табл. П.5). Следовательно, избыточная агрегация эритроцитов у больных ИБС до операции опосредована гиперфибриногенемией. Это полностью укладывается в концепцию «мостиковой» теории агрегации эритроцитов (или модели макромолекулярного связывания), согласно которой установление жестких связей между клетками возникает в том случае,

¹⁰ Содержание фибриногена в крови регистрировали при анализе клинических карт пациентов, оценка которого входила в стандартную программу обследования больных ИБС и производилась коагулометрическим методом по Клаусу.

если силы взаимодействия между ними преодолевают эффективный радиус двойного электрического слоя. Как правило, размеры нитей фибрина или иммуноглобулинов превышают эту величину и при сорбции высокомолекулярных белков на двух соседних клетках образуется «мостик», а мембрана эритроцита выпячивается, напоминая псевдоподию [60, 69, 94]. При этом среди полипептидов плазмы крови фибриноген занимает исключительные позиции: инкубация эритроцитов с аутологичной сывороткой снижает их агрегируемость в 3 раза по сравнению с инкубацией в аутологичной плазме крови [113].

Следует отметить, что в настоящее время существует и другая точка зрения на процесс агрегации эритроцитов, где фибриноген также играет ключевую роль. С позиции сторонников гипотезы «истощенного слоя», эритроциты объединяются в агрегаты вследствие того, что вблизи клеточной поверхности образуется истощенный (в сравнении с объемной фазой) по макромолекулам слой, который формирует осмотический градиент, способствующий сближению и взаимодействию клеток. Объединение эритроцитов в агрегаты происходит лишь тогда, когда потенциальная энергия разности осмотического давления превышает энергию электростатического отталкивания, обусловленную мембранными макромолекулами [151, 236, 376]. При любом варианте биофизического описания процессов агрегации, ее начальный этап (сближение эритроцитов) связан с действием гидродинамических сил: агрегация нарастает в условиях замедления кровотока, но формирование собственно агрегатов осуществляется с участием фибриногена, концентрация которого определяет их прочность [94].

После окончания ИК у пациентов с ИБС вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза концентрация фибриногена в плазме крови снижалась, что сочеталось с формированием отчетливого дефицита гаптоглобина, очевидно, вследствие возрастающей во время операции гемоглобинемии (см. табл. П.3, П.5). Так как основной функцией гаптоглобина является акцепция молекул свободного гемоглобина, предотвращающая их элиминацию через гломерулярный фильтр [278, 365], то недостаток этого реактанта острой фазы вполне объясним и выражен тем сильнее, чем выше интенсивность внутрисосудистого гемолиза. Кроме того, дополнительным фактором депрессии послеоперационного уровня

гаптоглобина в плазме крови может служить гемодилюция, которая, по-видимому, является основным механизмом снижения плазменной концентрации фибриногена после операции у больных ИБС с выраженным гемолизом и аналогичной тенденцией у пациентов с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.5). Однако не исключено, что в последнем случае интраоперационная скорость синтеза данного белка гепатоцитами может быть несколько выше, чем у больных с выраженным гемолизом.

Тем не менее, после ИК концентрация фибриногена в плазме крови у больных ИБС с различной степенью выраженности гемолитических реакций была сопоставимой и варьировала в пределах нормы и, следовательно, не могла служить причиной гиперагрегации эритроцитов у пациентов с выраженным гемолизом (см. табл. П.5). Этот феномен связан, вероятно, с послеоперационным увеличением содержания морфологически измененных форм эритроцитов у данной категории больных в отличие от нормального показателя у пациентов с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.6).

В целом морфологический анализ эритроцитов¹¹ выявил недостаточное содержание дискоцитов в крови до операции у больных обеих групп исследования (см. табл. П.6), что соответствует полученным ранее данным об изменении поверхностной архитектоники клеток красной крови на фоне атеросклероза и ИБС [74]. При этом у больных с умеренным гемолизом количество клеток дисковидной формы после операции нормализовалось, очевидно, за счет мобилизации костномозгового пула молодых форм эритроцитов. Следует отметить, что вне зависимости от этапа исследования доля эхиноцитов у них составляла 60% от общего числа морфологически измененных клеток. Развитию выраженного гемолиза, напротив, предшествовало преобладание эритроцитов с неэхиноцитарной трансформацией

¹¹ Морфологию эритроцитов изучали путем анализа их изображений на микротограммах, полученных в ходе микроскопии мазков периферической крови (окраска по Нохту) с помощью светового микроскопа МС 200АТ (Micros, Австрия), оснащенного цифровой видеокамерой и компьютерным блоком для обработки информации. В мазках крови подсчитывали количество различных морфологических форм эритроцитов (дискоцитов, эхиноцитов, акантоцитов, стоматоцитов, овалоцитов, сфероцитов, дегмацитов, шистоцитов, мишеневидных и каплевидных клеток), приходящееся на 200 клеток, и выражали в процентах [88].

(элиптоцитов, шистоцитов и каплевидных клеток). Именно у данной категории лиц численность дисковидных клеток после ИК снижалась на фоне увеличения доли эхиноцитов (см. табл. П.6), обладающих высоким агрегационным потенциалом. Это усугублялось появлением в крови лизированных форм клеток и фрагментов их мембран (в виде увеличения доли эритроцитов с незехиноцитарной трансформацией, см. табл. П.6), образующихся в ходе внутрисосудистого гемолиза и в силу своей неправильной конфигурации легко агрегирующих друг с другом [97, 120].

Полученные результаты совпадают с данными Ю.А. Морозова и коллег (2007), установивших, что у кардиохирургических больных во время операции и в первые часы после нее в крови выявляется большое количество эхиноцитов, однако вязкость крови в целом уменьшается за счет снижения гематокрита. Показано, что ключевым кренирующим агентом, индуцирующим появление спикул на поверхности эритроцитов, служит избыток Ca^{2+} в цитоплазме. Формирование выпячиваний и складок на мембране клеток красной крови увеличивает площадь контактирующих поверхностей при агрегатообразовании, а возникающие агрегаты обладают повышенной механической прочностью [68].

Более того, в последние годы было показано, что агрегация эритроцитов не является пассивным процессом, зависящим только от поверхностных свойств и факторов экстрацеллюлярного матрикса, но имеет и активный компонент, связанный с изменением гомеостаза клетки под влиянием различных стимулов (катехоламинов, ацетилхолина, простагландинов). Так, обнаружен феномен адренореактивности агрегационных свойств эритроцитов, который реализуется через β - и α -адренорецепторы посредством неизвестных до сих пор механизмов, инициирующих увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , что ведет к изменению морфологических свойств эритроцитов и активации Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов [70, 113]. На фоне операционного стресса, особенно в условиях ИК, когда концентрация катехоламинов резко возрастает, данный феномен приобретает патофизиологическое значение и должен учитываться клиницистами [54, 68]. Было показано, что во время операций с применением ИК адренергическая агрегация эритроцитов носит волнообразный характер с максимальным ее подъемом перед

началом перфузии и последующим линейным снижением, а затем повышением до уровня предоперационных значений. Длительная перфузия (более 90 мин) сопровождается резким снижением адренергической агрегации эритроцитов; короткая гипотермическая перфузия приводит к ее уменьшению, а нормотермическое ИК – к повышению агрегационной активности эритроцитов в ответ на стимуляцию норадреналином [68].

Поскольку в настоящем исследовании осуществлялась нормотермическая перфузия с продолжительностью ИК более 90 мин (см. табл. П.4), а при патологии адренореактивность эритроцитов снижается по сравнению с нормой [113], то какое-либо влияние адренергических веществ на агрегационные свойства этих клеток у больных с выраженным гемолизом маловероятно. Тем не менее, для подтверждения данной точки зрения необходимо располагать сведениями о концентрации катехоламинов в крови после операции.

Подводя итог изучению процессов агрегации эритроцитов у кардиохирургических больных с различной степенью выраженности гемолитических реакций после ИК, можно заключить, что постперфузионная гемоглобинемия более 40 мг/дл, в отличие от умеренного гемолиза, ассоциирована с гиперагрегацией эритроцитов как до хирургического вмешательства, так и после него. При этом повышенная агрегируемость клеток красной крови у больных с выраженным гемолизом обусловлена избыточным содержанием фибриногена в плазме крови до операции, а после ее проведения – морфологической трансформацией эритроцитов преимущественно по эхиноцитарному типу (см. табл. П.6). Экспрессия гликофоринов А и В на мембране эритроцитов у кардиохирургических больных, очевидно, не влияет на формирование их гиперагрегационного статуса, так как число гликофоринов А⁺ и В⁺ клеток оказывается пониженным лишь у пациентов с умеренной гемоглобинемией и только до операции. При нормальной экспрессии гликофоринов на эритроцитах у больных с выраженным гемолизом отрицательный заряд клеток, вероятно, экранируется адсорбированными в избытке на их поверхности белками плазмы крови (фибриногеном, иммуноглобулинами).

Вполне очевидно, что агрегация эритроцитов негативно отражается на их деформируемости: морфологическая трансформация клеток, как и чрезмерная сорбция белков и липопротеинов низкой

плотности на их мембране, угнетают способность клеток к упругой деформации, потенцируя реологические расстройства в тканях [74, 135, 216, 252, 417]. Кроме того, при усиленной агрегации эритроцитов численность свободных клеток, обладающих деформируемостью, закономерно уменьшается и нарастает количество эритроцитарных агрегатов, лишенных данного свойства [251], что в целом может снижать резистентность клеток красной крови к механическому воздействию и повышать риск развития гемолитических реакций.

3.3. Деформируемость и механическая резистентность эритроцитов при постперфузионном гемолизе различной степени выраженности

Известно, что наряду с деформируемостью, эритроциты обладают стабильностью мембраны, определяемой как способность клеток сохранять свою целостность при высоких напряжениях сдвига [109, 211]. Сочетание этих свойств регламентирует поведение клеток в кровотоке.

Результаты проведенного нами исследования показали, что у пациентов с выраженной гемоглобинемией вне зависимости от этапа исследования деформируемость¹² эритроцитов оказалась пониженной (индекс ригидности эритроцитов превышал норму) по сравнению со значениями этого показателя в группе здоровых доноров и больных с умеренным гемолизом (см. табл. П.7). Низкая механическая резистентность¹³ эритроцитов (т.е. большая доля гемолизированных клеток при механическом воздействии *in vitro*), напротив, до операции была характерной только для пациентов с умеренной гемоглобинемией, а после операции определялась уже в обеих группах больных ИБС (см. табл. П.7). Следовательно, фактором, предрасполагающим к развитию умеренного гемолиза, является

¹² Деформируемость красных клеток крови оценивали, вычисляя индекс ригидности эритроцитов (величина, обратная деформируемости) при фильтрации клеточной суспензии через мелкопористую ацетатцеллюлозную мембрану с диаметром пор 2,8–5,0 мкм (ЗАО НТЦ «Владипор», г. Владимир) [61].

¹³ Механическую резистентность эритроцитов, отражающую стабильность мембраны, определяли как % гемолиза в эритроцитарной суспензии после длительной ее ротации при высоких напряжениях сдвига [18].

исходно низкая стабильность мембраны эритроцитов, в то время как формирование выраженной постперфузионной гемоглобинемии сопряжено с низкой деформируемостью клеток красной крови.

Данное предположение подтверждается результатами корреляционного анализа. Так, в отношении механической резистентности эритроцитов до операции определялась положительная взаимосвязь доли лизированных клеток при механическом воздействии *in vitro* с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после перфузии ($r = 0,41$; $p < 0,05$), но только для группы больных с умеренным гемолизом (рис. 1, а). Зависимость гемоглобинемии после ИК от деформируемости эритроцитов до операции была достаточно тесной ($r = 0,66$; $p < 0,05$) и устанавливалась в объединенной группе пациентов (рис. 1, б), что не только свидетельствует об универсальности данного механизма деструкции эритроцитов во время перфузии, но и позволяет прогнозировать уровень постперфузионной гемоглобинемии.

Деформируемость и стабильность эритроцитов отражают их механические свойства, но проявляются в различных условиях. При высоком напряжении сдвига на уровне магистральных артерий в липидном бислое мембраны эритроцитов формируются участки пониженной плотности упаковки фосфолипидов, через которые в больших количествах поступает Ca^{2+} («деформационный стресс»), взаимодействующий с кальмодулином, что обеспечивает аддуцин-зависимое включение двух дополнительных молекул спектрина в спектрин-актиновый комплекс. В итоге увеличивается сродство белков цитоскелета друг к другу и нарастает стабильность мембраны на фоне увеличения вязкости внутриклеточной среды вследствие открывания Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, что обеспечивает сохранение целостности клеток в условиях турбулентного потока крови [10, 109, 113, 313, 409]. Параллельно избыток Ca^{2+} индуцирует активацию Ca^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы. Последнее обуславливает фосфорилирование белков цитоскелета, что снижает их сродство друг к другу, а уменьшение внутриклеточного уровня Ca^{2+} до субмикромольных концентраций ингибирует опосредованное аддуцином связывание спектрина с актином. Поэтому в норме клетка по мере продвижения к микроциркуляторному руслу утрачивает стабильность и приобретает свойство деформируемости, необходимое для оксигенации тканей [70, 109, 211, 287].

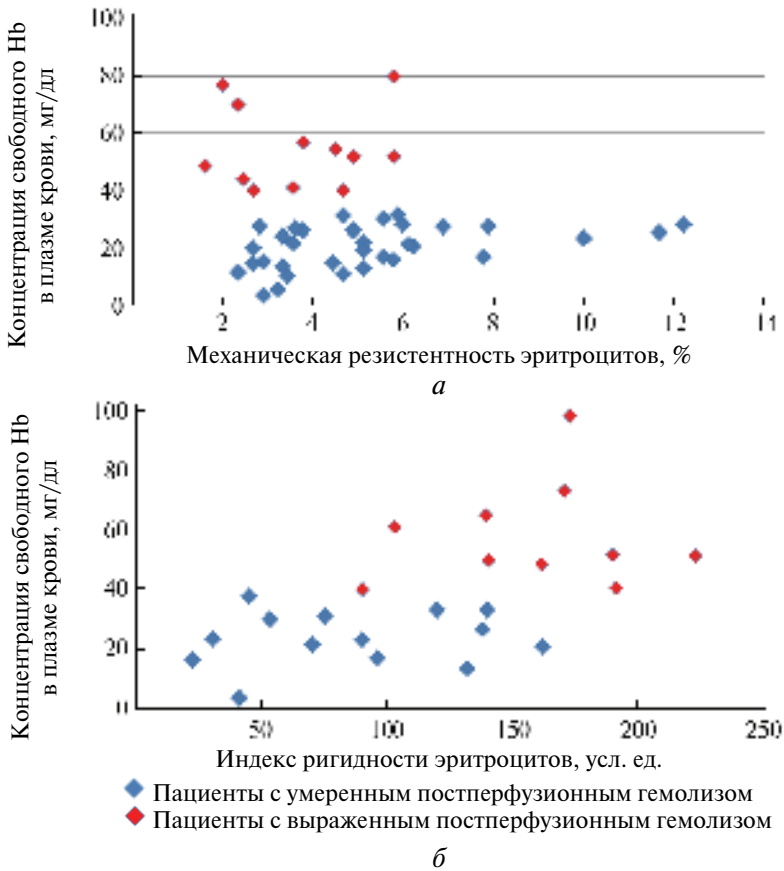


Рис. 1. Зависимость степени выраженности постперфузионной гемоглобине-
мии у больных ишемической болезнью сердца от механической резистентности
(а) и деформируемости (б) эритроцитов до операции в условиях искусственного
кровообращения

Исходя из вышеизложенного, снижение деформируемости и стабильности мембраны эритроцитов у больных ИБС может быть вызвано тремя группами факторов: повышением вязкости внутриклеточной среды (определяется концентрацией гемоглобина в клетке), нарушением вязкостно-эластических свойств мембраны (зависят от содержания холестерина и ненасыщенных фосфолипидов),

дисфункцией белков цитоскелета (их дефектом, избытком Ca^{2+} или недостаточным фосфорилированием) [19, 74, 93, 109, 129, 158, 313].

Интерпретируя полученные данные, можно заключить, что низкую деформируемость эритроцитов до операции у больных ИБС с выраженным гемолизом нельзя объяснить увеличением вязкости цитоплазмы, так как при равном среднем объеме эритроцитов у пациентов обеих групп исследования до ИК (см. табл. П.13) содержание гемоглобина в крови у пациентов с выраженной гемоглобинемией было даже несколько меньшим, чем в группе сравнения (см. табл. П.15). Между тем, в послеоперационном периоде увеличение вязкости цитоплазмы эритроцитов вполне возможно, так как степень гемоглобинизации клеток красной крови после операции априори не изменяется вследствие отсутствия у них белоксинтезирующей функции [74, 97, 132, 211], но уменьшается средний объем клеток (см. табл. П.13). Подобная реакция скорее характерна для пациентов с умеренным гемолизом, у которых средний объем эритроцитов после ИК уменьшался в большей степени, чем при выраженном гемолизе, а низкая деформируемость клеток, тем не менее, отмечалась именно у пациентов с высокой активностью гемолитических процессов. Следовательно, в основе нарушения механических свойств эритроцитов, определяющих вариабельность постперфузионной гемоглобинемии, лежит не модуляция вязкостных характеристик внутриклеточного содержимого клеток красной крови, а дисфункция цитоскелета или изменение структурной организации их мембраны.

Процессы формирования цитоскелета эритроцитов, как и другие атрибуты эволюции эритроидных клеток-предшественниц, могут существенно нарушаться в условиях напряженного эритропоэза, в результате чего клетки приобретают качественную неполноценность [6, 38, 69, 74, 125, 133, 168, 262]. Ускоренная дифференцировка эритрокариоцитов сопровождается сокращением генерационного времени, необходимого для синтеза белковых молекул, а также миграцией в кровоток ретикулоцитов ранней степени зрелости [97, 224]. В норме процессы самосборки и организации цитоскелета завершаются на стадии поздних форм ретикулоцитов (до поступления их в кровоток), благодаря чему последние приобретают способность к упругой деформации и покидают костный мозг через узкие просветы эндотелиальной выстилки синусоидов [137, 287]. По данным

некоторых авторов, в цитоплазме молодых форм ретикулоцитов, преждевременно покинувших кроветворную ткань при кровопотере, обнаруживаются молекулы спектрина в свободном состоянии и интенсивно фосфорилированный белок полосы 4.1, что указывает на незавершенность процессов формирования цитоскелета и объясняет пониженную деформируемость клеток [109, 287].

Учитывая повышенное содержание ретикулоцитов в крови до операции у больных ИБС с выраженным гемолизом, превышающее значения этого показателя у пациентов группы сравнения (см. табл. П.3), вполне возможно, что именно нарушение функционирования белков цитоскелета лежит в основе пониженной деформируемости эритроцитов у больных с выраженной гемоглобией. Интересно, что содержание ретикулоцитов в крови было повышенным до операции и у больных с умеренным гемолизом (но в меньшей степени), у которых индекс ригидности эритроцитов соответствовал норме (см. табл. П.7). В данном случае незначительная дисфункция цитоскелета эритроцитов вследствие их незрелости, возможно, компенсировалась избытком эритропоэтина (ЕРО) в крови, чего не отмечалось у пациентов с выраженным гемолизом. Эритропоэтин, контролируя ионный баланс эритроцитов, позитивно влияет на их деформируемость, в связи с чем улучшает микрореологические свойства незрелых форм ретикулоцитов и даже старых клеток красной крови после кровопотери [109, 271, 273]. Последнее объясняет некоторую тенденцию к снижению индекса ригидности эритроцитов в послеоперационном периоде у больных ИБС независимо от выраженности постперфузионного гемолиза (см. табл. П.7), что также может быть следствием поступления в кровоток молодых форм эритроцитов, имеющих низкий индекс сферичности (отношение толщины диска к его диаметру) и, соответственно, большую деформируемость по сравнению со зрелыми и старыми клетками [94, 417].

Между тем, в послеоперационном периоде индекс ригидности эритроцитов, по-прежнему, оставался повышенным у пациентов с выраженным гемолизом при равном и даже несколько меньшем содержании ретикулоцитов в крови по сравнению с другой группой пациентов (см. табл. П.3, П.7). Названное обстоятельство при выраженной гемоглобемии предполагает либо интраоперационную миграцию в кровоток крайне неполноценных (вследствие напря-

женного эритропоэза) ранних форм ретикулоцитов, либо инициацию во время ИК метаболических путей ингибирования деформируемости эритроцитов, которые будут проанализированы ниже. На данном этапе важно отметить лишь то, что у пациентов с выраженным гемолизом как до операции, так и после нее содержание АТФ в эритроцитах было пониженным в отличие от его нормального уровня у больных с умеренной гемоглобинемией (см. рис. 5). Энергетическое истощение клеток красной крови при выраженном гемолизе, очевидно, потенцирует дефект белковой сети их цитоскелета. В норме молекулы белков полос 3, 4.1, 4.9, спектрина, анкирина и аддуцина подвергаются фосфорилированию, в структуру которых включается до трех остатков фосфорной кислоты, в результате чего они теряют сродство к друг другу, при этом стабильность мембраны снижается, обеспечивая проявление деформируемости [70, 109, 211, 287].

Еще одним фактором, способным влиять на деформируемость эритроцитов и стабильность их мембраны, является структурная организация липидной фазы эритроцитарной мембраны. Общеизвестно, что ее вязкостно-эластические свойства во многом определяются качественным составом бислоя липидов: микровязкость плазмолеммы прямо пропорциональна удельному содержанию ХС в ней и обратно пропорциональна количеству ФЛ и степени ненасыщенности их жирных кислот [10, 74, 128, 129, 158]. При этом отличие в структуре полярных групп молекул ФЛ различных типов не оказывает существенного влияния на величину модуля поверхностного сжатия мембраны [109].

Интересно, что у больных с выраженным гемолизом, эритроциты которых обладают низкой деформируемостью и нормальной механической резистентностью, соотношение ХС/ФЛ в мембране клеток до операции оказалось повышенным всего на 30%, а у пациентов с умеренной гемоглобинемией, имеющих нормальную деформируемость эритроцитов и низкую механическую резистентность, – на 45% (см. табл. П.7, П.8). Очевидно, что увеличение отношения ХС/ФЛ в мембране эритроцитов не может быть причиной снижения деформируемости эритроцитов у кардиохирургических больных, но, вероятно, определяет недостаточную стойкость клеток к высокой сдвиговой нагрузке.

При этом, с одной стороны, известно, что избыток ХС в мембране придает ей жесткость и нарушает микрореологические свойства

эритроцитов [10, 74, 129], что согласуется с данными настоящего исследования о низкой механической резистентности эритроцитов при высоком значении ХС/ФЛ (см. табл. П.7, П.8). С другой стороны, в эксперименте было показано, что увеличение доли ХС в структуре липосом определяет их большую сжимаемость и препятствует разрыву, придавая липосомам механическую прочность за счет увеличения плотности упаковки молекул в мембране и энергии когезии в веществе. Однако эта прямо пропорциональная зависимость имеет место только при содержании ХС менее 55% [109]. В настоящем исследовании значение отношения ХС/ФЛ в мембране эритроцитов превышало 55% (т.е. более $55 : 45 = 1,22$; см. табл. П.8) независимо от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования. Поэтому немаловажную роль в модуляции микрореологических свойств эритроцитов у больных ИБС, вероятно, играет фосфолипидный и жирнокислотный состав липидного бислоя.

При изучении механических свойств липосом, сформированных из ФЛ с различной структурой жирнокислотных остатков, установлено, что снижение степени ненасыщенности жирных кислот в составе ФЛ опосредует высокое сопротивление бислоя сжатию, но меньшее растяжение и быстрый разрыв липосом [109]. Ввиду этого основной причиной сниженной механической резистентности клеток до операции у больных с умеренным гемолизом, возможно, является не рост отношения ХС/ФЛ в мембране эритроцитов, а уменьшение степени ненасыщенности жирных кислот в бислое мембраны более старой популяции клеток, чем у лиц с выраженным гемолизом, у которых зарегистрировано высокое содержание молодых форм эритроцитов (ретикулоцитов в крови (см. табл. П.3)). Это связано с тем, что максимальное число ненасыщенных связей в молекулах жирных кислот мембраны свойственно молодым эритроцитам и прогрессивно снижается по мере их старения, а также при активации ПОЛ [74, 129, 373]. Последний механизм, по-видимому, обуславливает снижение механической резистентности эритроцитов в послеоперационном периоде у больных с выраженным гемолизом (см. табл. П.7).

Таким образом, общеизвестный феномен нарушения способности эритроцитов к упругой деформации на фоне ИБС и атеросклероза у кардиохирургических больных с различной степенью выраженности

постперфузионного гемолиза реализуется неоднозначно, определяя интенсивность гемолитических реакций при операциях с ИК. Развитию умеренного гемолиза предшествует снижение стабильности клеточной мембраны эритроцитов до операции, очевидно, вследствие уменьшения степени ненасыщенности жирных кислот и резкого увеличения отношения ХС/ФЛ в ней, что обусловлено атерогенезом. При этом умеренная активации эритропоэза до операции, вероятно, сопровождается незначительным дефектом белковой сети цитоскелета, не вызывая снижения деформируемости эритроцитов, так как компенсируется высоким содержанием ЕРО в плазме крови и осуществляется при нормальном уровне АТФ в эритроцитах. Формирование выраженного постперфузионного гемолиза предопределяется низкой способностью эритроцитов к сдвиговой деформации в дооперационном периоде, которая, вероятно, обусловлена грубым дефектом структуры цитоскелета незрелых форм эритроцитов (количество которых повышено), образующихся в условиях напряженного эритропоэза, и усугубляется дефицитом АТФ в клетках. Между тем, стабильность мембраны эритроцитов до операции существенно не страдает ввиду умеренно повышенного соотношения ХС/ФЛ и, предположительно, нормального содержания числа ненасыщенных связей в молекулах жирных кислот в мембране эритроцитов, составляющих молодую популяцию клеток. Уменьшение стабильности мембраны эритроцитов при выраженной гемоглобинемии инициируется только во время ИК, что вместе с исходно низкой деформируемостью клеток определяет массивную интраоперационную их деструкцию, в отличие от умеренного гемолиза, обусловленного лишь недостаточной механической стойкостью эритроцитов.

При экстремальных величинах усилия сдвига в условиях экстракорпорального контура или при несостоятельности белковой сети цитоскелета возможен разрыв клеточной мембраны в местах взаимодействия молекул спектрина с фосфолипидным бислоем, что ведет к ее фрагментации или деструкции эритроцитов [109, 211]. При этом важным фактором модуляции микрореологических свойств клеток, барьерной функции цитолеммы и гемолитической стойкости эритроцитов в целом являются процессы свободнорадикального окисления мембранных структур.

Глава 4

РОЛЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ В МОДУЛЯЦИИ ГЕМОЛИЗА ПРИ ИСКУССТВЕННОМ КРОВООБРАЩЕНИИ

4.1. Феномен активации свободнорадикального окисления при искусственном кровообращении

Общеизвестным является факт увеличения содержания продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и снижения ее антиокислительной активности во время ИК, особенно в момент снятия зажима с аорты. Это позволяет рассматривать реперфузию ишемизированного миокарда как основной источник образования свободных радикалов и продуктов ПОЛ [44, 138, 244, 333, 334]. Кроме того, потенцирующее влияние оказывает артериальная гипероксемия, необходимая для компенсации снижения газотранспортной функции крови в результате интраоперационной гемодилюции, для чего в оксигенатор подается воздушная смесь с повышенным содержанием кислорода [51]. При этом наибольшее значение гипероксемии приобретает в условиях гипотермии, когда возрастают растворимость кислорода в плазме крови и сродство гемоглобина к кислороду, в результате чего кислород аккумулируется в эритроцитах, инициируя процессы свободнорадикального окисления [21, 51, 194].

Взаимодействуя с основным белком эритроцитов – гемоглобином (Fe^{2+}), кислород опосредует неферментативное его окисление до метгемоглобина (Fe^{3+}) с образованием супероксидного радикала ($\text{O}_2\cdot^-$). Однако, благодаря функционированию метгемоглобинредуктазы, метгемоглобин в норме восстанавливается при участии молекул НАДН в гемоглобин, а супероксид-радикал с помощью СОД, восстанавливается до пероксида водорода (H_2O_2). Последний менее активен, чем $\text{O}_2\cdot^-$, но служит источником образования высокореакционного гидроксил-радикала ($\text{HO}\cdot$). Кроме того, генерация свободных радикалов также возможна в реакциях с участием молекулярного

кислорода и ионов металлов с переменной валентностью (Cu^{2+} , Fe^{2+}) [16, 55, 74, 210, 344].

Влиянию свободных радикалов особо подвержены ненасыщенные жирные кислоты клеточной мембраны, ненасыщенные углеводороды и стерины, а также ароматические аминокислотные остатки белков, которые, отдавая водород свободным радикалам, изменяют собственную структуру [111, 344]. Даже в норме производство активных форм кислорода (АФК) в эритроцитах происходит постоянно и с достаточно высокой скоростью, поэтому клетки обладают мощной системой антиоксидантной защиты, к основным ферментам которой относят СОД, каталазу, глутатионпероксидазу и глутатионредуктазу [55, 111, 335, 344].

О кинетике СОД во время ИК единого представления не существует. По данным разных авторов, активность фермента в эритроцитах и плазме крови может как повышаться [333, 334], так и снижаться на всех этапах операции независимо от температурного режима перфузии [51, 194], либо вообще не изменяться [244]. СОД является «первой линией защиты» эритроцитов от АФК и принадлежит к группе металлоферментов, поскольку в качестве кофермента содержит в своем составе атомы Cu , Zn или Mn . СОД превращает супероксидные анионы в пероксид водорода, чем обеспечивается протекция клеточных структур от действия анион-радикалов и HO^\bullet , которые могут образовываться из супероксидного радикала кислорода [55, 344]. Утилизация менее цитотоксичного пероксида водорода происходит с помощью двух ферментов – глутатионпероксидазы и каталазы. Несмотря на то что активность каталазы в эритроцитах превышает таковую в других клетках и в тканях, ключевая роль в регуляции свободнорадикального окисления принадлежит глутатионпероксидазе и системе глутатиона в целом [55].

При операциях с ИК активность ферментов обмена глутатиона (глутатионтрансферазы, глутатионредуктазы) и уровень восстановленного глутатиона в эритроцитах или существенно не меняются [51, 242], или снижаются на протяжении экстракорпоральной перфузии и после нее [21, 138, 244]. Глутатионпероксидаза – это негемовый селен-содержащий фермент, катализирующий реакцию восстановления пероксида водорода или гидропероксида жирной кислоты (ROOH) за счет окисления восстановленного глутатиона (G-SH).

В результате образуются соединения, не обладающие цитотоксическими свойствами, такие как вода, органические спирты и окисленный глутатион. Восстановление последнего происходит с помощью НАДФН-зависимой глутатионредуктазы [33, 55, 69, 74]. При этом основным источником НАДФН является пентозофосфатный путь, в котором важную роль играет Г-6-ФДГ, катализирующая реакцию превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфат-глюконолактон с образованием одной молекулы НАДФН. Данный фермент обеспечивает функционирование всей системы глутатиона и, как следствие, поддержание жизнеспособности эритроцитов [74, 335]. Имеются сведения о том, что у больных с недостаточностью Г-6-ФДГ отмечается высокий уровень гемоглобинемии после операции с ИК, обуславливающий развитие тяжелой анемии и выполнение частых гемотрансфузий [180, 212].

Активность каталазы при ИК в условиях умеренной гипотермии (до +26 °С) меняется неоднозначно в зависимости от этапа операции. По одним данным, она повышается [21, 138, 333, 334], по другим – происходит снижение активности фермента во время перфузии [242]. Каталаза осуществляет восстановление H_2O_2 до двух молекул воды, при этом донором электронов является сам пероксид водорода [28, 55, 266]. На фоне глубокой гипотермии (+21...25 °С) активность каталазы и других ферментов антиоксидантной защиты эритроцитов угнетается, что способствует активации ПОЛ [21, 51].

Интенсификация процессов свободнорадикального окисления во время ИК становится важным механизмом повреждения молекул интрацеллюлярного матрикса (повышается содержание метгемоглобина) и мембранных структур эритроцитов, доказательством чего служит увеличение в клетках мембранно-связанного гемоглобина вследствие погружения триптофановых остатков этого белка в фосфолипидный слой в области анкирина [21, 44]. В итоге нарастает микровязкость липидного бислоя, повышается ригидность клетки, что для эритроцита означает снижение деформируемости, механической резистентности и гемолиз [41, 93, 344, 401]. Кроме того, деструкция мембраны эритроцитов в результате активации ПОЛ приводит к усилению физиологического процесса микровезикуляции, который становится патологическим. Поврежденные участки мембраны выпячиваются с образованием везикулы и затем сливаются [69, 93].

Таким образом, структурно-функциональные свойства эритроцитов при активации ПОЛ значительно изменяются, влияя на их гемолитическую стойкость в условиях ИК, и причиной этому может служить атака эритроцитарной мембраны молекулами АФК, находящимися как в плазме крови, так во внутриклеточном матриксе.

4.2. Окислительно-антиокислительный баланс плазмы крови при умеренном и выраженном постперфузионном гемолизе

Е.В. Ройтманом и соавт. (2001) было показано, что при невысоком прооксидантном потенциале плазмы крови эритроциты проявляют некоторую устойчивость к окислительному стрессу [93]. Чрезмерное увеличение степени окисленности сыворотки крови *in vitro* сопровождается уменьшением осмотической резистентности и деформируемости эритроцитов, повышением проницаемости мембраны, агрегации и деструкции клеток [44, 93]. В связи с этим изменение окислительно-антиокислительного баланса плазмы крови потенциально может детерминировать вариабельность постперфузионного гемолиза у кардиохирургических больных.

Анализ содержания ТБК-активных продуктов (продуктов перекисного окисления липидов, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК)) и диеновых конъюгатов¹⁴ (ДК) в плазме крови у больных ИБС до операции выявил повышенные значения данных показателей по сравнению с нормой вне зависимости от степени выраженности постперфузионного гемолиза (см. табл. П.9). Вероятно, это является следствием избыточного поступления в кровотоки АФК и продуктов ПОЛ из ишемизированных кардиомиоцитов и других клеток организма, находящихся в состоянии гипоксии при кардиогенной недостаточности кровообращения [42, 55, 397].

Как известно, при ишемии миокарда формируется парадоксальная ситуация: снижение содержания кислорода приводит к

¹⁴ Концентрацию ТБК-активных продуктов в плазме крови и эритроцитах определяли путем колориметрии (при 532 нм) окрашенного комплекса, образующегося при взаимодействии малонового диальдегида с ТБК. Содержание диеновых конъюгатов регистрировали по поглощению липидным экстрактом плазмы крови и эритроцитов монохроматического светового потока с длиной волны 233 нм [40].

генерации цитотоксичного супероксид-анион радикала и других АФК. Это происходит вследствие того, что ишемизированный миокард инфильтрируется нейтрофилами, активация которых продуктами фосфолиполиза и протеолиза запускает «респираторный взрыв», сопровождающийся гиперпродукцией АФК и усилением ишемического повреждения миокарда [323]. Кроме того, типовой реакцией митохондрий на гипоксию служит их набухание с последующим разобщением процессов окислительного фосфорилирования, что проявляется дефицитом АТФ и чрезмерным накоплением продуктов его распада – аденизиндифосфата, аденозинмонофосфата и гипоксантина [111, 162, 332]. Дефицит АТФ, в свою очередь, опосредует перегрузку клеток ионами кальция, которые индуцируют частичный протеолиз ксантиндегидрогеназы и ее конверсию до ксантиноксидазы [83, 362]. Последняя метаболизирует избыток гипоксантина, используя молекулярный кислород в качестве косубстрата (в отличие от ксантиндегидрогеназы, использующей НАДН) и образуя супероксид-анион, что способствует интенсификации ПОЛ клеточных мембран [37, 301, 303, 328]. Итогом сложного комплекса биохимических реакций при гипоксии является деструкция мембран внутриклеточных органелл и плазмолеммы ишемизированных клеток, в результате чего в межклеточное пространство высвобождаются продукты ПОЛ, что объясняет увеличение их уровня в плазме крови у больных ИБС до операции (см. табл. П.9).

В послеоперационном периоде концентрация ТБК-активных продуктов в плазме крови у кардиохирургических больных еще более нарастала вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза на фоне сохраняющегося избытка ДК (см. табл. П.9). Это свидетельствует об интраоперационной интенсификации ПОЛ в тканях при экстракорпоральной перфузии вследствие артериальной гипероксии и централизации кровообращения [1, 23, 394, 413]. Усугубление ишемии тканей во время ИК усиливает энергодефицит, разобщение окислительного фосфорилирования и конверсию ксантиндегидрогеназы, имевшие место у больных ИБС еще до хирургического вмешательства. В то же время интраоперационный избыток кислорода в адекватно перфузируемых тканях модулирует его метаболизм. В условиях гипероксии одноэлектронное восстановление кислорода усиливается пропорционально увеличению

уровня pO_2 в крови [332]. Кроме того, возобновление коронарного кровотока после кардиopleгии сопровождается реперфузионным повреждением миокарда и поступлением в кровь большого количества продуктов ПОЛ [37, 240, 390, 413].

В условиях интраоперационной аккумуляции продуктов ПОЛ в плазме крови ее исходно низкая общая антиокислительная активность¹⁵ (АОА) у больных ИБС после операции прогрессивно уменьшалась вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (см. табл. П.9). Как известно, при интенсивной генерации АФК антиокислительный потенциал плазмы крови истощается, что имело место до операции и усугублялось во время ИК. Кроме того, в послеоперационном периоде дефицит антиоксидантов потенцируется значительной гемодилюцией (согласно уровню гематокрита, см. табл. П.3).

Таким образом, анализ окислительно-антиокислительного баланса плазмы крови у больных ИБС показал, что неоднозначная выраженность цитолиза эритроцитов во время ИК не может быть следствием равного по величине накопления прооксидантов во внеклеточном пространстве, как и равного недостатка антиоксидантов в плазме крови (см. табл. П.9). Поэтому о причастности процессов свободнорадикального окисления к формированию выраженной гемоглобинемии можно говорить лишь в том случае, если источником генерации АФК во время операции является интрацеллюлярный матрикс эритроцитов.

4.3. Перекисное окисление липидов мембраны эритроцита как причина выраженного гемолиза в кардиохирургии

Изучение активности процессов липопероксидации позволило выявить повышенное содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах у больных ИБС обеих групп исследования по сравнению со значениями показателя у здоровых доноров как до операции, так и после нее (см. табл. П.10). Это свидетельствует об интенсификации

¹⁵ Общую антиокислительную активность плазмы крови оценивали по кинетике окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндифенола в реакционной смеси, содержащей и не содержащей плазму крови [102].

ПОЛ в эритроцитарной мембране при ИБС, что согласуется с данными литературы [44, 74, 129, 153, 184, 188, 422].

Считается, что высокое содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах – это результат образования АФК непосредственно в клетке, а также поступления их из плазмы крови. Генерация супероксид-аниона в эритроцитах происходит постоянно при окислении гемоглобина в метгемоглобин, что имеет место в норме и усиливается при патологии [51, 74, 332]. Кроме того, гемоглобин служит катализатором образования более токсичных радикалов HO^\bullet , которые вытесняют атомы водорода из жирных кислот и белков, опосредуя их свободнорадикальную модификацию. Протоны, в свою очередь, соединяясь с гидроксильными группами, формируют молекулы воды в гидрофобном слое мембраны, опосредуя дестабилизацию липидного бислоя и увеличение его проницаемости [37, 111, 133].

Существует также мнение, что в условиях сохранной структуры биомембраны составляющие ее липиды недоступны для действия АФК, а следовательно, избыточная липопероксидация в мембране эритроцитов обусловлена фоновыми (ранее сформированными) нарушениями структуры липидного бислоя с пространственной дезориентацией ее белково-липидных комплексов [74]. В связи с этим, выявленный избыток ТБК-активных продуктов в эритроцитах у больных ИБС обеих групп исследования до операции (см. табл. П.10) свидетельствует, вероятно, об индуцированной атерогенезом модуляции структуры липидного бислоя мембраны красных клеток крови, влекущей за собой активацию ПОЛ. Механизм подобных нарушений может реализовываться через каскад причинно-следственных взаимосвязей: накопление ХС в мембране эритроцитов, повышение ее микровязкости, угнетение функционирования активного ионного транспорта, внутриклеточная аккумуляция Ca^{2+} , активация фосфолипазы A_2 . Результатом последней реакции является накопление в эритроцитах лизофракций ФЛ и свободных жирных кислот, обеспечивающих доступность мембранных структур для повреждающего действия АФК [167, 326]. Не исключается и прямое электростатическое взаимодействие Ca^{2+} с молекулами кислых фосфолипидов (фосфатидилинозитолом, фосфатидилсеринем), что может приводить к изменению их физического состояния [74]. Кроме того, воздействие гипоксантина (образуется при ишемии тканей в больших

количествах) на эритроциты *in vitro* само по себе вызывает интенсификацию ПОЛ, если активность каталазы и глутатионпероксидазы в клетках красной крови снижена [303].

После операции концентрация ТБК-активных продуктов в эритроцитах возрастала по сравнению с дооперационным периодом только у больных с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.10), что свидетельствует об усилении процессов липопероксидации во время экстракорпоральной перфузии у данной категории пациентов в отличие от больных с умеренным гемолизом. Кроме того, именно при выраженной гемоглобинемии в послеоперационном периоде отмечалась положительная корреляция ($r = 0,58$; $p < 0,05$) между ее уровнем и концентрацией ТБК-активных продуктов в эритроцитах (рис. 2). Следовательно, свободнорадикальное повреждение молекулярных структур эритроцитов лежит в основе патогенеза массивного гемолиза и не свойственно пациентам с умеренной гемоглобинемией.

Механизм цитопатического действия АФК и продуктов ПОЛ на эритроциты заключается в увеличении проницаемости и микровязкости мембраны эритроцитов, ингибировании активности мембран-ассоциированных АТФаз и цитозольных ферментов, потенцировании эффекта фосфолипаз, дезорганизации белков цитоскелета. При этом весь комплекс реакций инициируется образованием в мембране эритроцитов первичных продуктов ПОЛ (гидропероксидов липидов, ДК), снижающих плотность упаковки ФЛ в мембранном бислое, и вторичных продуктов (ТБК-активных), которые реагируют с аминокислотами белков и образуют поперечные сшивки в структуре полипептидов [10, 33, 74, 83, 111, 153, 326, 347].

При анализе уровня ДК в эритроцитах у больных ИБС было обнаружено его снижение вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования (см. табл. П.10). Известно, что содержание ДК зависит от количества ненасыщенных связей в мембране, которые являются субстратом для свободнорадикального окисления [10, 40, 111, 153, 161]. Поскольку на фоне атеросклероза имеет место длительная интенсификация ПОЛ, что подтверждается результатами настоящего исследования (см. табл. П.9, П.10) и данными литературы [44, 74, 129, 153, 184, 188, 422], то усиленная пероксидация липидов эритроцитарной мембраны приводит, вероятно,

к сокращению числа ненасыщенных связей в молекулах жирных кислот и меньшему, чем в норме, образованию ДК.

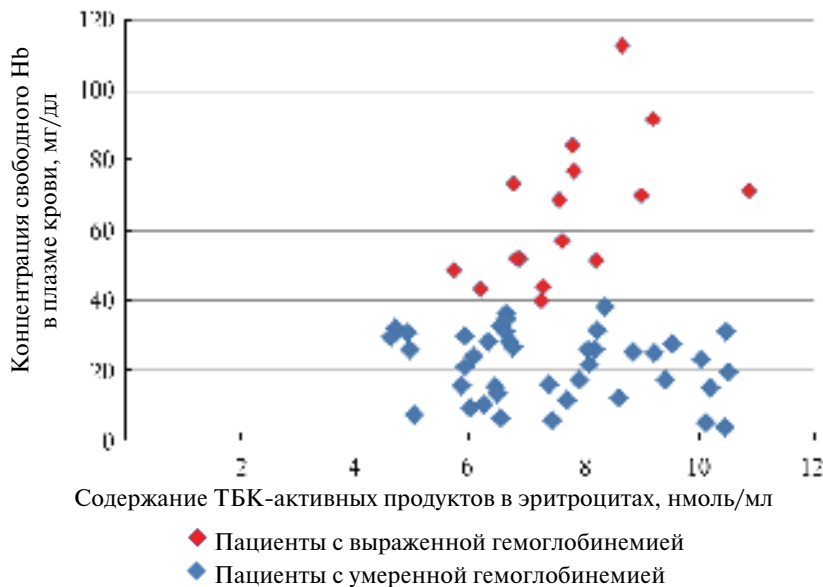


Рис. 2. Зависимость степени выраженности постперфузионной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца от содержания ТБК-активных продуктов в эритроцитах после операции в условиях искусственного кровообращения

Неустойчивые и короткоживущие ДК представляют собой достаточно лабильный пул молекул, размер которого зависит от скорости их образования и включения в последующие реакции липопероксидации: эти вещества способны как превращаться во вторичные продукты ПОЛ, так и разлагаться с образованием гидропероксидов жирных кислот, которые в норме восстанавливаются глутатинопероксидазой с образованием нерадикального продукта – соответствующего органического спирта, не обладающего цитотоксичностью [59]. При этом гидропероксиды липидов, находящиеся в растворимом компартменте клетки, метаболизируются цитозольной глутатионпероксидазой эритроцитов, а гидропероксиды ФЛ, локализованные в мембранном бислое, восстанавливаются с помощью глутатион-

пероксидазы фосфолипидов. Данный фермент предохраняет ФЛ клеточных мембран от перекисного окисления и участвует в восстановлении радикалов витамина Е [37, 55, 150].

В виду того, что в эритроцитах здоровых доноров активность глутатионпероксидазы априори не нарушена, образование избытка вторичных продуктов ПОЛ из ДК не происходит. Между тем, в эритроцитах больных ИБС имеется недостаточность ферментов антиоксидантной защиты [22, 63, 64, 188, 263, 422] и ДК, которые, по всей видимости, практически полностью метаболизируются до вторичных продуктов ПОЛ, обуславливая избыток ТБК-активных веществ в эритроцитах (см. табл. П.13).

В зависимости от активности и продолжительности процессов свободнорадикального окисления система антиоксидантной защиты клеток претерпевает двухэтапную модуляцию: сначала в ответ на интенсификацию процессов окисления происходит увеличение антиокислительной активности (стадия адаптации), затем – ее постепенное снижение до нормальных значений и дальнейшее угнетение (стадия истощения) [37]. Учитывая данную закономерность и тот факт, что длительность клинически верифицированной ИБС у кардиохирургических пациентов обеих групп исследования составила более 5 лет (см. табл. П.1), вполне объяснимо равнозначное снижение активности СОД¹⁶ в эритроцитах у этих больных (см. табл. П.10).

Известно, что СОД представляет собой индуцируемый фермент, активность которого меняется в зависимости от парциального давления кислорода в среде [55, 343]. Возможно, у кардиохирургических пациентов с ИБС, из которых 100% страдали недостаточностью кровообращения (см. табл. П.1), циркуляторная гипоксия наряду с пролонгированным истощением системы антирадикальной защиты вследствие атерогенеза способствовала снижению активности СОД. В пользу данной точки зрения свидетельствуют эксперименты, установившие ингибирование СОД и усиление ПОЛ в эритроцитах при адаптации животных к гипоксической гипоксии [343, 419]. Поскольку в 30% случаев патология легких сочетается с артериальной

¹⁶ Активность супероксиддисмутазы в эритроцитах определяли по ее способности замедлять реакцию автоокисления адреналина до адренохрома при рН = 10,2 [104].

гипоксемией [74], а заболевания данных органов (хроническая обструктивная болезнь легких, пневмофиброз, хронический бронхит) у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом встречались в 3 раза чаще, чем у лиц с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.1), то очевидно, что активность СОД в эритроцитах до операции у этих пациентов имела более выраженную тенденцию к снижению, чем у лиц с умеренным гемолизом (см. табл. П.10). Во время ИК гипоксическая гипоксия устраняется путем создания артериальной гипероксии [1, 394, 413], что, вероятно, и объясняет положительную динамику активности СОД в эритроцитах у пациентов с выраженной, но не с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.10).

Другим фактором, обуславливающим неоднозначное изменение активности СОД в эритроцитах у больных двух групп исследования после операции, является различная степень оксигенации крови в ходе ИК. Между тем, средние за операцию значения pO_2 в артериальной крови оказались сопоставимыми и в группах кардиохирургических пациентов, но максимальные значения pO_2 в крови были зарегистрированы у пациентов с выраженным гемолизом (см. табл. П.4). Подобная перфузиологическая тактика могла быть продиктована как патологией легких у данной категории больных, так и нарушением газотранспортной функции самих эритроцитов. Во время перфузии pO_2 в крови поддерживается на уровне, необходимом для 100%-го насыщения гемоглобина кислородом [1, 413]. Учитывая, что равная величина этого показателя во время операции в обеих группах больных достигалась различными режимами оксигенации крови (при равном гематокрите, см. табл. П.4), нельзя исключить снижение сродства гемоглобина к кислороду у пациентов с выраженным гемолизом.

В литературе имеются единичные сведения о преимуществах плавной оксигенации перфузата над одномоментным повышением pO_2 в крови во время ИК [357]. Показано, что двухчасовое вдыхание чистого кислорода у здоровых лиц не сопровождается изменением активности СОД в эритроцитах [209]. Вероятно, в основе интраоперационной активации СОД в эритроцитах у кардиохирургических больных с выраженным гемолизом лежит не гипероксемия (она отмечалась и у больных с умеренным гемолизом), а редукция более глубокой дооперационной гипоксии либо эпизоды сверхпороговой

гипероксемии (более 200 мм рт. ст., см. табл. П.4) во время ИК, кратковременно активирующие фермент.

В любом случае при выраженной гемоглобинемии интраоперационная активация СОД в клетках красной крови (до уровня таковой у больных с умеренной гемоглобинемией) если и влияет на выраженность гемолиза, то незначительно: при выполнении корреляционного анализа обнаружена слабая зависимость уровня постперфузионной гемоглобинемии от максимального значения pO_2 в крови во время ИК ($r = 0,41$; $p < 0,05$) и данный показатель определял лишь 13% вариабельности интраоперационного гемолиза ($p < 0,05$). Кроме того, активность СОД в эритроцитах после операции была сопоставимой в группах оперированных лиц (см. табл. П.10), что дает основания предполагать недостаточность других ферментов антиоксидентной защиты эритроцитов, обуславливающих формирование выраженной гемоглобинемии.

Известно, что СОД катализирует дисмутацию супероксид-аниона с образованием пероксида водорода, который разлагается до воды каталазой и глутатионпероксидазой. Функционирование последней осуществляется при участии восстановленного глутатиона, образование которого зависит от активности ферментов пентозофосфатного шунта в эритроцитах, в частности от Г-6-ФДГ [37, 55, 74, 347, 422]. При исследовании активности каталазы и Г-6-ФДГ в эритроцитах¹⁷ отмечен низкий ее уровень (по сравнению с нормой) у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом на всех этапах исследования, в отличие от нормальных значений у пациентов с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.10).

Как известно, содержание антиоксидантов в клетках снижается при активации свободнорадикального окисления. Окисление липидов приводит к резкому нарушению физико-химической структуры мембраны и дезактивации ряда ферментов (Г-6-ФДГ, лактатдегидрогеназы, каталазы) [43, 74, 263, 347, 422]. Между тем, низкую активность каталазы и Г-6-ФДГ в эритроцитах до операции у больных

¹⁷ Активность каталазы оценивали по способности фермента разлагать пероксид водорода, образующий окрашенный комплекс с солями молибдата аммония [50]; активность Г-6-ФДГ – кинетическим методом с помощью коммерческого набора «G6P-DH» (Sentinel Diagnostics, Италия) согласно инструкции производителя.

с выраженным гемолизом нельзя объяснить истощением или повреждением этих ферментов вследствие высокой активности свободнорадикального окисления в клетках, так как содержание продуктов ПОЛ в эритроцитах до операции у пациентов обеих групп исследования было сопоставимым (см. табл. П.10).

Принимая во внимание тот факт, что до операции у больных с выраженным гемолизом количество ретикулоцитов в крови было большим (см. табл. П.3), чем в группе сравнения, дефицит антиоксидантов у этой категории лиц не укладывается в традиционное представление о высокой функциональной активности молодых форм эритроцитов, обладающих максимальным запасом метаболически активных молекул (в том числе и антиоксидантов) [69, 74, 97, 213, 287, 324]. По всей видимости, у пациентов с выраженным гемолизом имеет место функциональная неполноценность механизмов антиокислительной защиты клеток красной крови, продуцированных в условиях более напряженного (чем у пациентов с умеренным гемолизом) эритропоэза. Так, Ю.А. Лакомой (2006) показано, что старение эритроцитов, образованных в ходе напряженного эритропоэза, сопровождается более быстрым снижением активности Г-6-ФДГ, чем в норме [58]. Кроме того, нельзя исключать и недостаточный синтез молекул каталазы и Г-6-ФДГ в клетках красной крови при ускоренной дифференцировке эритрокариоцитов. Данное предположение наиболее вероятно, так как в норме активность каталазы не зависит от числа молодых форм эритроцитов в крови и не изменяется при созревании ретикулоцита в эритроцит, в отличие от закономерного в этом процессе уменьшения активности Г-6-ФДГ, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и содержания восстановленного глутатиона [361].

После операции у больных с умеренным гемолизом активность каталазы в эритроцитах оставалась в пределах нормы, при этом активность Г-6-ФДГ даже возрастала по сравнению с дооперационными значениями (см. табл. П.10), что объясняется, вероятно, мобилизацией в кровь костномозгового резерва ретикулоцитов, обладающих высоким содержанием Г-6-ФДГ [58, 69, 213, 287, 324, 361]. У больных с выраженной гемоглобинемией активность каталазы и Г-6-ФДГ в эритроцитах после ИК, по-прежнему, регистрировалась ниже нормы, проявляя даже негативную тенденцию по отношению

к дооперационным значениям (см. табл. П.10). Последнее можно объяснить как элиминацию из костного мозга не полноценных ретикулоцитов, характеризующихся дефицитом каталазы и Г-6-ФДГ, что, вероятно, усугубляется интраоперационным повреждением данных ферментов вследствие активации свободнорадикального окисления (согласно увеличению содержания ТБК-активных продуктов в эритроцитах после операции, см. табл. П.10).

На основании сказанного, интенсификация ПОЛ в эритроцитах после операции у больных с выраженным гемолизом сочетается не просто с дефицитом каталазы и Г-6-ФДГ в клетках, а с достоверно меньшей активностью этих ферментов по сравнению с таковой у пациентов группы сравнения (см. табл. П.10), что позволяет предположить недостаточную утилизацию в клетках пероксида водорода, который индуцирует липопероксидацию при выраженной гемоглобинемии. При этом неполная дисмутация супероксид-аниона на фоне его повышенной генерации в условиях интраоперационной гипероксемии и низкой активности СОД в эритроцитах вряд ли имеет отношение к активации ПОЛ при выраженном гемолизе, так как недостаточная активность фермента имела место и при умеренной гемоглобинемии, а величина pO_2 в крови в процессе ИК определяет лишь 13,3% ($p < 0,05$) варибельности уровня послеоперационной гемоглобинемии, в то время как низкая активность каталазы и Г-6-ФДГ – 15,2% ($p < 0,05$) и 24,7% ($p < 0,05$) соответственно (в сумме 39,9%). Следовательно, исходная недостаточность данных ферментов в эритроцитах является ведущим механизмом интенсификации свободнорадикального повреждения эритроцитов при выраженном гемолизе.

Интересно, что до операции недостаточность активности каталазы и Г-6-ФДГ в клетках красной крови у больных с выраженной постперфузионной гемоглобинемией не манифестировала (активность ПОЛ в эритроцитах была равной таковой у пациентов с умеренным гемолизом, имевших нормальную активность этих ферментов), очевидно, ввиду отсутствия провоцирующего стимула (гипероксемии). В обсуждаемом аспекте уместно заметить, что наследственно обусловленный дефицит Г-6-ФДГ в эритроцитах также не проявляется в отсутствие окислителей в крови [82, 97, 200]. Наряду с этим у больных с умеренным гемолизом, помимо отсутствия дефецита каталазы

и Г-6-ФДГ в эритроцитах, отмечалось повышенное содержание ХС в клеточной мембране до операции (большее, чем при выраженной гемоглобемии). Данное обстоятельство можно расценивать как протективный фактор в отношении активации ПОЛ, поскольку ХС обладает свойством структурного антиоксиданта, ограничивающего подвижность жирнокислотных остатков фосфолипидов, что делает их более устойчивыми к действию свободных радикалов [74, 153].

Таким образом, эритроциты больных ИБС характеризуются низкой активностью СОД вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза, но у пациентов с умеренной гемоглобемией это обстоятельство сочетается с нормальной активностью каталазы и Г-6-ФДГ, определяя эффективную антиоксидантную защиту клеток в условиях интраоперационной гипероксемии. Развитие выраженного гемолиза, напротив, связано с предсуществующей недостаточностью этих ферментов вследствие функциональной неполноценности молодой популяции эритроцитов, что ведет к усилению ПОЛ и массивной деструкции клеток во время ИК на фоне увеличения активности СОД до значений, не превышающих соответствующий показатель в группе больных с умеренным гемолизом. Тем не менее, некоторое повышение активности СОД во время ИК увеличивает образование пероксида водорода, который при низкой активности каталазы и Г-6-ФДГ, очевидно, не разлагается и индуцирует свободнорадикальное повреждение эритроцитов, влекущее реорганизацию липидного бислоя их мембраны и снижение гемолитической стойкости клеток.

4.4. Изменение состава липидной фазы мембраны эритроцитов при постперфузионном гемолизе различной степени выраженности

Плазматическая мембрана является важнейшей структурой красных клеток крови, поскольку определяет все разнообразие антигенных, транспортных и механических характеристик эритроцитов. При этом одним из главных компонентов липидной фазы мембраны эритроцитов является ХС, большая часть молекулы которого располагается преимущественно внутри гидрофобного слоя фосфолипидов, а гидроксильная группа взаимодействует с водной фазой.

Благодаря этому ХС способен модулировать физико-химические свойства клеточной мембраны, уменьшая силы притяжения между углеводородными цепями жирных кислот ФЛ, сглаживая фазовые переходы, а также способствуя вытягиванию углеводородных цепей ФЛ и опосредуя увеличение микровязкости при снижении проницаемости мембраны. В качестве второго основного компонента плазмолеммы эритроцитов выступают ФЛ, представленные сфингомиелином (СФМ) и глицерофосфолипидами, которые включают в себя фосфатидилэтаноламин (ФЭА), фосфатидилсерин (ФС), фосфатидилинозитол (ФИ), фосфатидилхолин (ФХ), лизофосфатидилхолин (лФХ) и фосфатидную кислоту (ФК). При этом СФМ и ФХ расположены преимущественно во внешнем монослое липидов, в то время как большая часть ФЭА и ФС (вместе с малыми фракциями ФИ) находится во внутреннем компартменте бислоя. Важно отметить, что данная асимметрия ФЛ характерна исключительно для живой клетки и утрачивается при ее гибели. В сумме ФЛ и ХС составляют 90% липидной фазы мембраны эритроцитов (в соотношении 1 : 1), 10% которой приходится на гликолипиды (т.е. гликосфинголипиды – нейтральные и кислые) [74, 109, 128, 307].

В результате изучения состава липидной фазы цитолеммы эритроцитов было установлено, что содержание ХС и соотношение ХС/ФЛ¹⁸ в эритроцитарной мембране у больных ИБС обеих групп исследования оказались повышенными как до операции, так и после нее (см. табл. П.8), что свойственно заболеваниям, в основе которых лежит атеросклероз и вполне согласуется с данными литературы [74, 107, 128, 129, 274, 275]. В условиях гиперлипидемии и гиперхолестеролемии эритроциты активно сорбируют ХС на своей

¹⁸ Общее содержание холестерина и фосфолипидов в мембране клеток красной крови определяли в липидных экстрактах теней эритроцитов, выделенных путем гипосмотического гемолиза по методу J.T. Dodge et al. (1963) [197]. Липидный экстракт мембран эритроцитов получали с применением хлороформ-метаноловой смеси по J. Folch et al. (1957) [202], в равных объемах которого после полного испарения растворителя оценивали содержание холестерина ферментативным методом с помощью коммерческого набора «Новохол-А» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) и количество фосфолипидов по содержанию липидного фосфора [40], относя полученные величины к концентрации белка в рабочей взвеси выделенных мембран.

поверхности, в связи с чем его содержание в мембране зависит от липидного состава сыворотки крови [49, 252]. Так, рядом авторов установлена прямая корреляционная связь содержания ХС в мембране эритроцитов как с уровнем общего ХС, триацилглицеролов, ХС липопротеинов низкой плотности в сыворотке крови, так и со скоростью прогрессирования острого коронарного синдрома [342, 420]. Существует мнение, что связывание неэстерифицированного ХС плазмы крови эритроцитарной мембраной осуществляется благодаря СФМ в ее структуре, выполняющему роль ловушки ХС [385, 386].

Следует отметить, что у больных с выраженным гемолизом содержание ХС и соотношение ХС/ФЛ в мембране эритроцитов оказались ниже, чем у пациентов с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.8) при равной и даже несколько большей концентрации общего ХС в плазме крови (см. табл. П.1). Данное обстоятельство позволяет полагать, что неоднозначное нарушение липидного спектра мембраны эритроцитов у больных ИБС с различной степенью выраженности гемоглобинемии обусловлено не особенностями липидного профиля плазмы крови, а временем нахождения отдельного эритроцита в кровотоке, что правомочно предположить ввиду неспособности зрелых клеток красной крови к поддержанию реакций цикла трикарбоновых кислот.

До операции у пациентов с выраженным гемолизом регистрировался более высокий, чем в группе сравнения, уровень гемоглобинемии и ретикулоцитоза (см. табл. П.3), что свидетельствует о быстром обновлении популяции эритроцитов в периферической крови. В этом случае эритроциты за короткий период жизни, видимо, не успевают сорбировать на своей поверхности такое количество ХС, как длительно циркулирующие клетки больных с умеренным гемолизом. К тому же содержание ХС в мембране ретикулоцитов ниже, чем в зрелых клетках эритроидного ряда [287].

После операции увеличение численности ретикулоцитов в крови у пациентов с умеренной гемоглобинемией происходило на 87% от дооперационного значения (в отличие от 30% при выраженном гемолизе, см. табл. П.3), что определяло тенденцию к снижению содержания ХС в мембране эритроцитов у данной группы больных (см. табл. П.8). При этом величина соотношения ХС/ФЛ в мембране эритроцитов после операции подвергалась реципрокным изме-

нениям: при умеренном гемолизе она уменьшалась по сравнению с дооперационным значением, а при выраженной гемоглобинемии, напротив, возрастала, превышая в итоге показатель ХС/ФЛ больных группы сравнения (см. табл. П.8). Подобное обстоятельство при отсутствии достоверных послеоперационных изменений содержания ХС в мембране эритроцитов у больных обеих групп исследования могло быть связано с неоднозначной динамикой количества ФЛ в цитолемме.

Результаты исследования показали, что до операции общее содержание ФЛ в мембране эритроцитов у больных ИБС было пониженным вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (см. табл. П.8). По данным литературы, дефицит ФЛ в плазмолемме на фоне атеросклероза объясняется активацией процессов липопероксидации, облегчающих доступность мембранных ФЛ для действия фосфолипаз, активность которых при атеросклерозе также повышена [33, 73, 171, 302, 326, 358, 415]. В послеоперационном периоде общее содержание ФЛ в мембране эритроцитов у больных ИБС достоверно не изменялось, несколько снижаясь у пациентов с выраженным гемолизом и незначительно возрастая у больных с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.8). Тем не менее, сочетание разнонаправленной тенденции в изменении уровня мембранных ФЛ после операции с противоположной тенденцией количества ХС обусловило формирование статистически значимых различий по величине отношения ХС/ФЛ в мембране эритроцитов после ИК между пациентами двух групп (см. табл. П.8).

Несмотря на одинаковое содержание общих ФЛ в мембране эритроцитов в периоперационном периоде у больных ИБС с различной степенью выраженности гемолиза, ее фосфолипидный спектр¹⁹ суще-

¹⁹ Фосфолипидный спектр мембраны эритроцитов изучали методом тонкослойной хроматографии на пластинках Silufol UV 254 (Чехия), разделяя фракции фосфолипидов в смеси растворителей «хлороформ : метанол : вода» [66]. Идентификацию фракций фосфолипидов осуществляли с использованием соответствующих стандартов (Sigma, США). Количественную оценку отдельных фракций фосфолипидов проводили по содержанию липидного фосфора в элюатах, полученных из фрагментов пластинки в области расположения соответствующего стандарта [40], принимая за 100% суммарное содержание всех фракций на данной пластинке.

ственно различался. Так, до операции у больных с умеренной гемоглобинемией было выявлено высокое относительное содержание ФС в мембране эритроцитов при увеличении абсолютного количества лФХ и снижении концентрации ФИ, ФХ и ФЭА (см. табл. П.11). Подобные изменения удельного содержания различных фракций ФЛ в мембране эритроцитов согласуются с концепцией типовой реакции клеток на повреждение при патологиях различного генеза [74].

Наиболее активно и в норме, и при патологии, окислению подвергаются полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав преимущественно ФХ и ФЭА, содержание которых в мембране снижается по мере старения клетки [74, 345, 389]. Между тем, эритроциты обладают способностью сорбировать ФХ из плазмы крови, используя в качестве его источника липопротеины высокой плотности, в связи с чем содержание этого ФЛ в старых и длительно циркулирующих клетках у здоровых доноров может быть даже повышенным [367]. ФИ также расходуется в процессе жизни зрелых клеток эритроидного ряда, выполняя роль субстрата для фосфолипазы С, которая при активации эритроцита катализирует гидролиз ФИ с образованием вторичных месенджеров (диацилглицерола и инозитолтрифосфата) [171, 302, 312]. Закономерно, что при истощении содержания других ФЛ в эритроцитах доля ФС возрастает, индуцируя при его экстернации гибель клеток красной крови [248, 270]. По мере старения эритроцитов отмечается планомерное накопление в мембране лФХ, который образуется при гидролизе ФХ фосфолипазой A_2 и дестабилизирует бислои ФЛ, повышая неспецифическую проницаемость мембраны эритроцитов и угнетая деятельность ионотранспортирующих систем клетки [74, 161, 312].

Исходя из изложенного, выявленное нами по итогам проведенного исследования нарушение фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов до операции у больных с выраженным гемолизом вполне соответствует современным представлениям о модификации липидного бислоя при атеросклерозе, который способствует преждевременному старению клеток красной крови [10, 45, 49, 64, 74, 100, 107, 125, 275, 358, 415]. Следует отметить, что у больных ИБС с выраженным гемолизом, в отличие от пациентов с умеренной гемоглобинемией, фосфолипидный спектр эритроцитарной мембраны в дооперационном периоде соответствовал таковому в группе здоро-

вых доноров (см. табл. П.11), что само по себе удивительно при наличии клинически верифицированного атеросклероза коронарных артерий. Вероятно, это обусловлено циркуляцией в крови пациентов данной группы большего, чем у больных с умеренной гемоглобинемией, числа ретикулоцитов (см. табл. П.3) и молодых эритроцитов.

После хирургического вмешательства на фоне неизменно низкого содержания общих **ФЛ** в мембране эритроцитов (см. табл. П.8) у больных ИБС обеих групп исследования, фосфолипидный спектр плазмолеммы претерпевал существенные изменения (см. табл. П.11): при умеренной гемоглобинемии абсолютное содержание **ФИ** и доля **ФС** нормализовались при аналогичной тенденции со стороны количества **лФХ**; при выраженном гемолизе абсолютное содержание **ФИ** и **ФХ** снижалось на фоне увеличения доли **лФХ**. Избыточное содержание **ФК** в мембране эритроцитов после операции отмечалось независимо от интенсивности гемолитических реакций (см. табл. П.11), что обусловлено, по всей видимости, активацией фосфолипаз **C** и **D**. Так, при участии фосфолипазы **C** образуется диацилглицерол, который с помощью диацилглицероллипазы может быть гидролизован в моноацилглицерол и свободные жирные кислоты или подвергается фосфорилированию диацилглицеролкиназой с образованием **ФК**. Фосфолипаза **D** осуществляет гидролиз **ФХ**, при этом продуктами реакции являются **ФК** и холин [171, 312, 345].

Между тем, у больных с умеренным постперфузионным гемолизом содержание **ФХ** и **ФИ** в мембране эритроцитов после операции не только не снижалось, но даже несколько возрастало (см. табл. П.11), что, видимо, связано с невысокой активностью фосфолипаз **C** и **D** в клетках и (или) с интенсивной миграцией костномозгового пула молодых форм эритроцитов. Этим же можно объяснить нормализацию исходно повышенного удельного содержания **ФС** в эритроцитарной мембране у данной категории больных в послеоперационном периоде (см. табл. П.11). У пациентов с выраженной гемоглобинемией ввиду предсуществующего истощения костномозгового резерва молодых форм эритроцитов прирост их числа после ИК был менее значимым и в целом не компенсировал усиленный гидролиз **ФХ** и **ФИ** (см. табл. П.11), что также могло быть следствием чрезмерной активации фосфолипаз **C** и **D** в эритроцитах.

Помимо вышеописанной реакции, формирование выраженной гемоглобинемии после ИК, в отличие от умеренной, ассоциировано еще и с активацией фосфолипазы A_2 , осуществляющей деградацию ФЛ с образованием лизофракций [171, 326, 358], послеоперационное увеличение уровня которых (в частности лФХ) в эритроцитах было отмечено только у больных с выраженным гемолизом (см. табл. П.11). Поскольку фосфолипаза A_2 гидролизует преимущественно ФХ, а фосфолипаза D обладает исключительной специфичностью к этому ФЛ [302, 345], то сочетанная активация данных ферментов могла опосредовать значительное снижение уровня ФХ в мембране эритроцитов после операции у пациентов с выраженным гемолизом не только по сравнению с нормой и дооперационным этапом, но и по сравнению со значениями этого показателя у больных группы сравнения (см. табл. П.11).

Кроме того, потенцирующее влияние на гидролиз ФХ оказывает свободнорадикальная модификация его молекул, богатых ненасыщенными двойными связями и выступающих в роли главного субстрата для ПОЛ [74, 161, 389]. Фосфолипиды, имеющие в составе гидропероксиды жирных кислот, особенно активно гидролизуются фосфолипазой A_2 [171, 345, 358]. В этом аспекте важно заметить, что интенсификация ПОЛ в эритроцитах после операции была характерна лишь для пациентов с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.10).

Усиленная деградация ФХ в эритроцитарной мембране во время экстракорпоральной перфузии подтверждается и данными литературы. Так, при моделировании условий ИК обнаружено увеличение содержания лизофосфатидов в мембранах липосом, которое авторы связали с гидролизом ФХ фосфолипазой A_2 [305]. Кроме того, у кардиохирургических пациентов было зарегистрировано интенсивное разрушение ФХ в мембране красных клеток крови в период реперфузии [207] и активация фосфолипазы A_2 после ИК, коррелирующая со степенью гидролиза ФЛ мембраны эритроцитов [319]. По данным A.L. Heiner и соавт. (2008), скорость гидролиза ФЛ фосфолипазой A_2 обратно связана с количеством ХС в мембране эритроцитов, который способствует формированию доменов, ограничивающих доступность ФЛ для фермента. Поэтому превышение уровня ХС в мембране эритроцитов у больных с умеренным гемоли-

зом над аналогичным показателем другой группы пациентов до операции (см. табл. П.8), вероятно, играет роль протективного фактора в патогенезе интраоперационного гемолиза.

Интересно, что доля СФМ и ФЭА в мембране эритроцитов соответствовала значениям нормы вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования (см. табл. П.11). При этом недавние исследования показали, что относительное содержание данных ФЛ в мембране эритроцитов у больных ИБС с окклюзией коронарной артерии более 50% и менее 50% достоверно не различалось [249]. Вероятно, при атеросклерозе и во время экстракорпоральной перфузии СФМ и ФЭА в меньшей степени подвергаются гидролизу, чем ФХ и ФИ.

Последствия интраоперационной модификации фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов у больных ИБС следует расценивать как неблагоприятные не только при выраженном, но и при умеренном гемолизе. Фосфатидная кислота мембраны эритроцитов, образуемая в больших количествах во время перфузии, обладает способностью связывать комплекс факторов комплемента C5b6, что, с одной стороны, сдерживает гиперактивацию системы комплемента, а с другой – повышает адгезивность эритроцитов [299] и способствует перемещению ФС во внешний слой мембраны красных клеток крови [331]. Экспонирование ФС на поверхности мембраны еще более усиливает агрегационную способность эритроцитов, активирует систему гемостаза и запускает процессы естественной гибели эритроцитов путем внутриклеточного гемолиза [19, 273, 331]. Последнее особенно важно при том, что у больных ИБС на фоне атеросклероза уже в дооперационном периоде отмечаются нарушения мембранной асимметрии ФЛ мембраны красных клеток крови [74, 249].

Между тем, развитие гемолитических реакций высокой степени выраженности (в отличие от умеренной) сопровождается формированием в мембране эритроцитов дефицита ФИ и ФХ, также способных удерживать C5b6 комплекс комплемента [299]. Более того, расщепление ФЛ с их последующей деградацией и образование лФХ приводит к повышению микровязкости и проницаемости мембраны эритроцитов [74, 337]. Выявленная в результате проведенных нами исследований отрицательная взаимосвязь уровня постперфузионной

гемоглобинемии с относительным количеством ФХ в мембране эритроцитов после операции ($r = -0,66$; $p < 0,05$) подтверждает важную роль структурной организации липидного бислоя в реализации гемолитической стойкости эритроцитов к факторам экстракорпоральной перфузии. При этом дефекты липидной фазы эритроцитарной мембраны, очевидно, не определяют низкую деформируемость клеток у больных с выраженным гемолизом, поскольку незначительные нарушения ее структуры у этой категории лиц до операции (небольшое увеличение показателя ХС/ФЛ и нормальное соотношение фракций ФЛ) сочетаются с почти двукратным увеличением индекса ригидности клеток (см. табл. П.7, П.8, П.11).

Таким образом, развитию умеренного гемолиза предшествует значительное нарушение фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов до операции в виде избыточного содержания лФХ, ФС и дефицита ФИ, уровень которых после ИК нормализуется (в отношении лФХ определяется отчетливая тенденция к нормализации), что объясняется поступлением в кровоток большого количества молодых форм эритроцитов и, вероятно, низкой активностью фосфолипаз. Формирование выраженной гемоглобинемии ассоциировано с нормальным соотношением фракций ФЛ в мембране эритроцитов до операции, что после ИК сменяется увеличением доли лФХ при формировании недостатка ФИ и ФХ, отражающих, по-видимому, интраоперационную активацию фосфолипаз, преимущественно А₂-типа. Содержание ФК в мембране эритроцитов после операции возрастает независимо от выраженности гемолиза и может быть проявлением высокой активности фосфолипаз С и D в эритроцитах как при выраженном, так и при умеренном гемолизе. В целом изменение состава липидной фазы мембраны эритроцитов может модифицировать ее проницаемость, которая также определяется степенью активации системы комплемента.

Глава 5

СИСТЕМА КОМПЛЕМЕНТА И МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ОБЪЕМА ЭРИТРОЦИТА ПРИ ОПЕРАЦИЯХ НА ОСТАНОВЛЕННОМ СЕРДЦЕ

5.1. Активация системы комплемента при операциях с искусственным кровообращением и ее роль в патогенезе гемолиза

Ввиду непосредственного контакта крови с чужеродной поверхностью экстракорпорального контура и воздушной фазой проведение ИК индуцирует активацию системы комплемента и гемолиза [25, 392]. Так, экспериментально доказано свойство синтетических поверхностей, в частности биodeградируемых покрытий на основе природного полисахарида хитозана, вызывать гемолиз эритроцитов после контакта с нативной кровью. При этом если степень активации тромбоцитов и гранулоцитов зависит от наличия и вида покрытия перфузионных систем, то на активацию системы комплемента данный факт оказывает неоднозначное влияние [126]. По одним данным, степень активации системы комплемента одинакова в покрытых и непокрытых системах [126, 198], по другим – она меньше в покрытых системах [226, 285] и вид покрытия значения не имеет [245, 330].

Нахождение крови в неэндотелизированной перфузионной системе, которая лишена естественных ингибиторов комплемента, индуцирует спонтанный гидролиз тиоэфирной связи в молекуле C3-компонента, вследствие чего запускается альтернативный путь активации комплемента, приводящий к формированию C3а и C5а [76, 92]. Нейтрализация гепарина в конце ИК стимулирует классический механизм запуска системы комплемента с появлением в плазме C4а и дальнейшим ростом концентрации C3а [208, 341, 392]. Содержание последнего остается высоким и после проведения ИК, положительно коррелируя с его длительностью и риском послеоперационных

осложнений [267, 400]. Кроме того, транслокация эндотоксинов через ишемизированную стенку кишечника во время ИК активирует систему комплемента как по классическому, так и по лектиновому и альтернативному путям [15, 400].

Независимо от механизма инициации каскада реакций в системе комплемента, он завершается формированием гидрофобного мембраноатакующего комплекса C5b-9, способного в виде порообразующей молекулы встраиваться в липидный бислой клетки, вызывая ее лизис за счет увеличения проницаемости мембраны и объема клетки до критической величины. Однако гемолитический эффект системы комплемента определяется не только степенью активации его компонентов. В норме мембрана эритроцитов содержит белки, обладающие протективным действием в отношении литической атаки системы комплемента, в связи с чем ее конечный деструктивный эффект зависит от соотношения белков индукторов и ингибиторов системы комплемента [76, 92, 339, 348].

Белок DAF (decay-accelerating factor – фактор, ускоряющий распад; он же CD55), несущий антигены системы Crome, прерывает ассоциацию C4b и C3b, а гликопротеин CD59 связывает компоненты комплемента C8 и C9, что предотвращает формирование мембраноатакующего комплекса. Оба белка удерживаются в мембране с помощью особой якорной структуры – гликозилфосфатидилинозитола. Рецептор комплемента CR1 (CD35), с которым ассоциированы антигены системы Knops, фиксирует компоненты комплемента C3b и C3d, прерывая как классический, так и альтернативный пути активации. При этом плотность молекул CR1 на поверхности эритроцитов в популяции сильно варьирует [76, 77, 339, 348].

Следует отметить, что в литературе отсутствует информация о динамике экспрессии данных структур на эритроцитах в процессе ИК и его влиянии на выраженность постперфузионного гемолиза. Однако имеются сведения о том, что покрытие экстракорпорального контура молекулами CD55 снижает степень активации системы комплемента в 2 раза [402]. Это дает основания полагать, что экспрессия CD55- и CD35-молекул на мембране эритроцитов, суммарная площадь поверхности которых крайне велика, может определять величину активации системы комплемента у кардиохирургических больных, детерминирующую гемолитический эффект перфузии.

5.2. Состояние путей активации системы комплемента и экспрессия ее ингибиторных молекул на эритроцитах у больных с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом

Комплемент-зависимый цитолиз относится к механизмам неспецифической резистентности организма, которая в норме не затрагивает собственные структуры, поскольку они несут естественные ингибиторы системы комплемента. Отсутствие подобных молекул на чужеродных поверхностях (микроорганизмах, модулях аппарата ИК и др.), как и недостаток таковых на клетках макроорганизма, индуцирует активацию системы комплемента, которая завершается образованием терминального комплекса комплемента (ТКК) и мембраноатакующего комплекса (МАК). Последний, представляя собой порообразующую молекулу цилиндрической формы с гидрофильным центром (рис. 3), опосредует повышение проницаемости мембраны клеток и их гибель [76, 92, 218, 379].

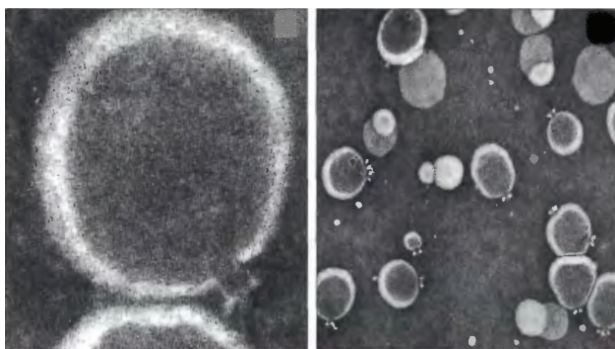


Рис. 3. Электронные микрофотографии лизирующего мембрану комплекса, демонстрирующие воронкообразный канал в липосомной мембране лицевинной природы при встраивании в нее комплекса C5b-9 человека (ув. $\times 234000$) [92]

В отличие от липидных пор, образование которых усиливается при активации ПОЛ и повышает проницаемость мембраны клеток для воды и ионов, относительно большие размеры МАК позволяют проникать в клетку также низкомолекулярным гидрофильным веществам. Представителем таковых является мочевины, которая, проникая в

цитозоль и будучи осмотически активной, опосредует поступление воды в клетку, вызывая ее сферуляцию и лизис. На этом основано изучение проницаемости мембраны эритроцитов с помощью мочевинового гемолиза: чем меньше концентрация мочевины, при которой отмечается цитоллиз 50% эритроцитов, тем выше проницаемость клеточной мембраны [67].

Оценка проницаемости мембраны эритроцитов²⁰ позволила установить, что у больных с умеренным постперфузионным гемолизом уровень 50%-го цитолиза этих клеток в растворе мочевины соответствовал норме до оперативного вмешательства и снижался после его завершения (см. табл. П.12), отражая интраоперационное увеличение проницаемости эритроцитарной мембраны. В то же время формированию выраженной постперфузионной гемоглобинемии предшествовало снижение показателя мочевинового гемолиза, которое сохранялось и в послеоперационном периоде (см. табл. П.12). Следовательно, проницаемость мембраны эритроцитов у этой категории лиц была повышенной еще до проведения ИК, потенцируя гибель клеток в этот период (до операции содержание свободного гемоглобина в плазме крови коррелировало с показателем мочевинового гемолиза $r = -0,39$; $p < 0,05$) и выполняя, вероятно, роль фактора, предрасполагающего к развитию выраженной гемоглобинемии после ИК.

Содержание ТКК в сыворотке крови²¹ до операции у больных ИБС групп сравнения превышало таковое у здоровых доноров (см. табл. П.12). По данным литературы, усиление активности комплемента при атеросклерозе действительно отмечается [62, 206, 239,

²⁰ Проницаемость мембраны эритроцитов для низкомолекулярных гидрофильных веществ изучали методом мочевинового гемолиза, инкубируя отмывые эритроциты в растворах с различной концентрацией мочевины и затем фотометрически определяя интенсивность гемолиза в каждом из них (по окраске надосадка после центрифугирования), после чего по графику «% гемолиза – % мочевины» определяли ту концентрацию мочевины в растворе, при которой гемолиз составляет 50% [67].

²¹ Содержание терминального комплекса комплемента определяли в сыворотке крови, полученной в стерильных условиях, методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора Human terminal complement complex (НВТ, Нидерланды) согласно инструкции производителя.

281]. Важную роль в этом процессе играет высокое содержание иммунных комплексов и С-реактивного белка (СРБ) в плазме крови, которые, связываясь с C1q, запускают классический путь активации комплемента [62, 352]. Кроме того, гипоксия способствует генерации C1q в ишемизированных тканях при ИБС [147, 239], а высокое содержание провоспалительных цитокинов усиливает продукцию компонентов комплемента [31, 92, 366].

Важно отметить, что у пациентов с выраженной постперфузионной гемоглобинемией содержание ТКК в сыворотке крови до операции незначительно превышало показатель у больных с умеренным гемолизом (см. табл. П.12). Является ли это причиной повышенной проницаемости мембраны эритроцитов у данной категории лиц и ускоренной комплемент-зависимой гибели клеток до операции – утверждать трудно, поскольку линейная зависимость между уровнем ТКК в сыворотке крови и дооперационной гемоглобинемией не обнаруживалась. Однако исключить данный механизм тоже нельзя, так как гидрофобный МАК (C5b-9), обладающий цитолитическим действием, не идентичен гидрофильному ТКК в сыворотке крови (C5b-9S), отражающему лишь степень активации системы комплемента [92, 218, 403]. При истощении в плазме крови витронектина, удерживающего комплекс C5b67 в жидкой фазе [76, 222, 224, 291], активация системы комплемента, по всей видимости, может завершаться интенсивным внедрением МАК в мембрану эритроцитов и гемолизом, не сопровождающимся значительным ростом уровня ТКК в крови.

После операции у кардиохирургических больных содержание ТКК в сыворотке крови многократно возрастало по отношению к исходным значениям вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (см. табл. П.12). Чрезмерная активация системы комплемента в условиях ИК – известный факт [15, 25, 208, 267, 340, 341, 392] и реализуется по вышеописанным механизмам. Вместе с тем, важно отметить, что содержание ТКК в сыворотке крови положительно коррелировало ($r = 0,61$; $p < 0,05$) с уровнем послеоперационной гемоглобинемии только у больных с умеренным гемолизом, в отличие от пациентов другой группы (рис. 4). Следовательно, формирование умеренной гемоглобинемии после ИК обусловлено комплемент-зависимым лизисом эритроцитов во время перфузии, и

данный механизм не играет ведущей роли в патогенезе выраженного гемолиза, что может указывать на участие других процессов (оксидативного стресса, механической травмы) в интраоперационной гибели эритроцитов у данной категории больных.

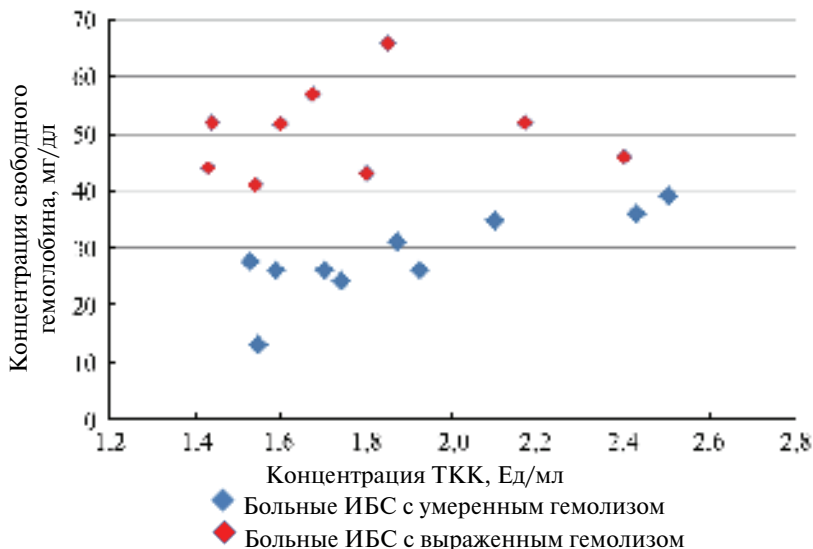


Рис. 4. Зависимость между концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови и концентрацией терминального комплекса комплемента в сыворотке крови после операции у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Существенное увеличение генерации ТКК во время операции является итогом стимулирующего влияния ИК на все три пути активации комплемента (классический, лектиновый, альтернативный), что служит причиной многочисленных органных нарушений в послеоперационном периоде [15, 147, 208, 267, 291, 392, 400]. При этом суммарное содержание факторов соответствующего пути в крови составляет его функциональную активность, т.е. суммарный резерв, способный включиться в каскадный механизм генерации ТКК при наличии характерного стимула, что следует отличать от понятия «активация пути комплемента», отражающего уже существующий процесс его инициации.

Функциональная активность классического пути комплемента²² до операции у кардиохирургических больных с умеренным постперфузионным гемолизом превышала норму, проявляя аналогичную тенденцию у пациентов с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.12). Подобные изменения, скорее всего, обусловлены процессом атерогенеза, который сопровождается гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6 и TNF- α) [62, 283, 366], индуцирующих в гепатоцитах, макрофагах и нейтрофилах наработку компонентов комплемента как белков острой фазы [76, 92, 193, 366]. В частности, у больных с умеренным послеоперационным гемолизом накануне хирургического вмешательства обнаруживался профицит TNF- α в плазме крови²³, чего не отмечалось у пациентов с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.3). Кроме того, до операции у больных с умеренным гемолизом была зарегистрирована положительная корреляционная связь между функциональной активностью классического пути системы комплемента и количеством ТКК в сыворотке крови ($r = 0,79$; $p < 0,05$), т.е. избыточное его образование до ИК, очевидно, происходит вследствие гиперпродукции факторов классического пути на фоне избытка TNF- α в плазме крови.

После ИК функциональная активность классического пути комплемента у кардиохирургических больных обеих групп сравнения оказалась ниже исходных значений, оставаясь при этом в пределах нормы (см. табл. П.12). Негативная динамика величины этого показателя объясняется, вероятно, гемодилюцией и потреблением факторов классического пути во время операции. Поскольку активация классического пути комплемента, согласно общебиологическим закономерностям, осуществляется при взаимодействии C1q-компонента с иммунными комплексами, содержание которых в крови

²² Функциональную активность классического пути комплемента определяли в сыворотке крови, полученной в стерильных условиях, методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора Wieslab Complement system Screen (BCM Diagnostics, США), принимая за 100%, по рекомендации производителя, активность классического пути комплемента у обследованных здоровых лиц.

²³ Концентрацию TNF- α в крови определяли методом иммуноферментного анализа с помощью набора «Альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции производителя.

снижается в ходе ИК [76, 134, 193, 239, 352], данный механизм вряд ли имеет существенное значение. Скорее всего, инициация пути происходит в конце ИК при нейтрализации гепарина протаминам сульфата, что стимулирует классический путь активации системы комплемента [208, 297, 341, 392].

В отличие от классического, функциональная активность альтернативного пути комплемента²⁴ до операции у больных ИБС существенно различалась: у пациентов с выраженным гемолизом величина данного показателя была сниженной по отношению к таковой как у здоровых лиц, так и у пациентов с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.12). Это было связано, вероятно, с дефицитом факторов альтернативного пути активации комплемента у больных с выраженным гемолизом, что возможно при недостаточном их синтезе либо при чрезмерном потреблении [92, 384]. Сопоставимое содержание ТКК в сыворотке крови у больных с выраженным и умеренным гемолизом до операции (см. табл. П.12) служит основанием для отвержения первой точки зрения. Более того, отрицательная корреляция между содержанием ТКК в сыворотке крови и активностью альтернативного пути комплемента ($r = -0,86$; $p < 0,05$) до операции у пациентов с выраженным гемолизом указывает на потребление его факторов вследствие гиперактивации. Таким образом, избыточное образование ТКК у больных ИБС до операции может происходить либо на фоне потребления факторов альтернативного пути комплемента, что больше свойственно пациентам с выраженной гемоглобинемией, либо на фоне гиперпродукции факторов классического пути, что наиболее характерно для лиц с умеренным гемолизом.

После операции у больных ИБС обеих групп исследования определялось резкое снижение функциональной активности альтернативного пути комплемента (см. табл. П.12), что, вероятно, отражает массивное потребление его факторов и свидетельствует о ведущей

²⁴ Функциональную активность альтернативного пути комплемента определяли в сыворотке крови, полученной в стерильных условиях, методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора Wieslab Complement system Screen (BCM Diagnostics, США), выражая результат, по рекомендации производителя, в процентах от активности классического пути комплемента у обследованных здоровых лиц, принятой за 100%.

роли этого пути в активации комплемента при экстракорпоральной перфузии. Как известно, взаимодействие крови с синтетическими компонентами аппарата ИК, не обладающими естественными ингибиторами комплемента, стимулирует альтернативный путь активации последнего [297, 327, 341, 392], поскольку усиливает спонтанный гидролиз тиоэфирной связи в нативной молекуле С3, что имеет место *in vivo*, но в норме сдерживается ингибиторами [76, 193, 327, 339]. Между тем, до операции у больных с выраженным гемолизом на роль чужеродной поверхности могут претендовать только бактериальные мембраны (при наличии инфекционных заболеваний). Последние, благодаря высокому содержанию остатков маннозы, фруктозы и глюкозамина, способны запускать также и лектиновый путь активации комплемента [76, 92, 193, 384]. На фоне существенных дооперационных различий в активности альтернативного пути комплемента у больных сравниваемых групп потенциал лектинового пути²⁵ отличался незначительно (см. табл. П.12), что не позволяет рассматривать микробный агент в качестве индуктора альтернативного пути до операции у больных с выраженным гемолизом. В послеоперационном периоде активность лектинового пути комплемента также оставалась в пределах нормы независимо от выраженности постперфузионной гемоглобинемии (см. табл. П.12), демонстрируя, очевидно, эффективность асептических условий операции и достаточность барьерной функции кишечной стенки оперируемых пациентов.

Анализируя данные о состоянии системы комплемента у кардиохирургических больных, можно заключить, что развитию выраженного постперфузионного гемолиза еще до операции предшествует гиперактивация комплемента, преимущественно, по альтернативному пути, которая не связана с инфекционными агентами. Данный факт сочетается с повышением проницаемости мембраны эритроцитов и не отмечается (до ИК) у пациентов с умеренной

²⁵ Функциональную активность лектинового пути комплемента определяли в сыворотке крови, полученной в стерильных условиях, методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора Wieslab Complement system Screen (BCM Diagnostics, США), выражая результат, по рекомендации производителя, в процентах от активности классического пути комплемента у обследованных здоровых лиц, принятой за 100%.

гемоглобинемией. Следовательно, избыточную активацию альтернативного пути комплемента до операции у пациентов с выраженным постперфузионным гемолизом трудно объяснить воздействием какого-либо внешнего фактора, поэтому не исключено наличие дисбаланса в системе регуляторных белков комплемента, в частности, нарушение их экспрессии на мембране эритроцитов как наиболее многочисленных клеток крови.

Среди мембран-ассоциированных ингибиторов комплемента на поверхности эритроцитов экспрессируются CD35-, CD55- и CD59-молекулы. Первые две регулируют степень активации комплемента в крови, а третья предохраняет клетки от внедрения в цитолемму уже образовавшегося МАК [76, 77, 92, 140, 291]. По данным литературы, CD59 определяется на поверхности всех клеток организма [76]. Приобретенная недостаточность CD59 на клетках эритроидного ряда в обязательном порядке сопровождается развитием пароксизмальной ночной гемоглобинурии – редко встречающейся гемолитической анемии с яркими клиническими проявлениями [97, 259, 261], которая, как гематологическое заболевание, являлась критерием исключения больных из настоящего исследования. В связи с этим на поверхности эритроцитов у кардиохирургических больных оценивали экспрессию CD35- и CD55-молекул²⁶.

В результате было показано, что доля клеток, несущих CD35, имела сопоставимые значения у больных ИБС с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом и варьировала на уровне нормы на обоих этапах исследования (см. табл. П.12). Отсутствие каких-либо изменений этого показателя в динамике или его различий между группами больных, связано, вероятно, как с достаточно сильной вариабельностью экспрессии CD35 на эритроцитах в человеческой популяции [77], так и с важной ролью данной молекулы в механизмах иммунологической защиты, поскольку она также

²⁶ Экспрессию CD35- и CD55-молекул на эритроцитах оценивали по относительному количеству CD35- и CD55-позитивных клеток на мазках отмытых эритроцитов, фиксированных в холодном ацетоне, с помощью метода прямой поверхностной иммунофлуоресценции, используя комплементарные моноклональные антитела, меченные флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) фирмы Santa Cruz Biotechnology, Inc. (США) согласно инструкции по иммунофлуоресценции и гистохимии, изложенной на официальном сайте производителя.

экспрессируется на моноцитах, нейтрофилах, эозинофилах, лимфоцитах и дендритных клетках [76, 92, 140, 411].

Комплексные данные о роли CD35 в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и постперфузионных осложнений в литературе практически отсутствуют. Показано, что введение кардиохирургическим больным растворимой формы CD35 редуцирует негативные эффекты ИК на функциональное состояние миокарда в послеоперационном периоде [175], а у животных снижает интенсивность внутрисосудистого гемолиза в экспериментах с гемотрансфузиями АВ0-несовместимой крови [411]. Взаимодействие C3b-компонента комплемента с мембраной эритроцита может оказывать разнонаправленные эффекты на микрореологические свойства клеток: с одной стороны, осаждение C3b на CD35 инициирует фосфорилирование нитей спектрина в цитоскелете эритроцитов, повышая тем самым деформируемость клеток, с другой – его связывание с гликофоорином А, напротив, существенно снижает деформируемость клеток красной крови [216]. Последний механизм вряд ли мог повлиять на выраженность гемолиза, так как содержание эритроцитов в крови, экспрессирующих гликофорин А, после операции у больных с умеренным и выраженным гемолизом было равным и соответствовало норме (см. табл. П.5). Поэтому взаимодействие C3b с CD35 эритроцитов, скорее всего, имело благоприятное значение в изменении их микрореологических свойств при выраженной гемоглобинеми.

Численность CD55⁺-эритроцитов у больных с выраженным гемолизом (в отличие от пациентов с умеренной гемоглобинемией) не достигала нормальных величин как до операции, так и после нее (см. табл. П.12). Возможно, дефицит именно CD55-молекулы на поверхности эритроцитов является причиной дооперационной гиперактивации альтернативного пути комплемента в данной группе больных ИБС. Известно, что CD55 угнетает образование комплекса C3bBb (C3-конвертазы альтернативного пути) и ускоряет его диссоциацию в отличие от CD35-молекулы, которая обладает только вторым эффектом [76, 77, 140]. В связи с этим, недостаток экспрессии CD55, вероятно, потенцирует «холостую» (чужеродная поверхность отсутствует) сборку комплекса C3bBb, который образуется с участием фактора D и стабилизируется фактором Р (пропердином) [92, 193]. По данным литературы, оба фактора имеют очень низкую

концентрацию в сыворотке крови (1 и 25 мкг/мл соответственно против 1200 мкг/мл для С3 и 500 мкг/мл для С4 [76]) и поэтому, возможно, первыми истощаются при длительной активации комплемента, вызванной дефицитом CD55. Поскольку факторы D и P непосредственно не участвуют в классическом и лектиновом путях активации комплемента, образуя лишь петлю усиления [92, 193], то поэтому, видимо, функциональная активность данных механизмов у пациентов с выраженным гемолизом до операции не снижалась (см. табл. П.12).

Экспрессия молекул-ингибиторов комплемента максимальна на молодых клетках красной крови и уменьшается в процессе циркуляции эритроцитов в кровеносном русле [140]. Тем не менее, дефицит CD55⁺-эритроцитов определялся у больных с выраженным гемолизом, у которых содержание ретикулоцитов в крови до операции было наибольшим (см. табл. П.3). Ввиду того, что зрелые клетки эритроидного ряда не способны к синтезу белка [69, 74, 97, 287], недостаточная экспрессия CD55 на мембране эритроцитов, скорее всего, обусловлена нарушением образования этой молекулы в ходе напряженного эритропоэза. Показано, что длительная стимуляция красного ростка при малярии, опосредует снижение данного показателя, в отличие от его увеличения на фоне кратковременного введения эритропоэтина больным с предсуществующей депрессией эритропоэза (при хронической почечной недостаточности). В обоих случаях экспрессия CD35 не изменяется [292, 336].

Молекула CD55, как и CD59, представляет собой белок, удерживаемый в мембране эритроцитов с помощью своеобразной якорной структуры – гликозилфосфатидилинозитола, выраженный дефицит которого был установлен у больных с пароксизмальной ночной гемоглобинурией [97, 259, 261]. Кроме того, при системной красной волчанке также предполагается нарушение синтеза данного вещества или неправильное прикрепление белковой части молекулы к мембране в эритрокариоцитах, что сопровождается развитием гемолитической анемии [140]. Некоторые авторы считают, что именно дефицит CD59 на эритроцитах ответственен за развитие массивного внутрисосудистого гемолиза у больных пароксизмальной ночной гемоглобинурией, а молекула CD55 имеет второстепенное значение [261, 292]. Учитывая отсутствие интенсивного гемоли-

за до операции у больных ИБС обеих групп исследования, экспрессия CD59 на эритроцитах, видимо, не была нарушена.

Между тем, в экспериментальных исследованиях на мышах было показано, что значительный дефицит молекул CD55 и CD59 на эндотелии ускоряет развитие выраженного атеросклероза, в том числе и коронарных артерий [281, 408]. В связи с этим недостаточность CD55 на мембране эритроцитов у пациентов с высоким уровнем постперфузионной гемоглобинемией также может способствовать развитию более глубоких атеросклеротических изменений сосудистой стенки.

В послеоперационном периоде численность CD55⁺-эритроцитов в крови у больных ИБС обеих групп исследования оставалась на уровне дооперационных значений, проявляя отчетливую тенденцию к увеличению у больных с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.12). Подобная динамика объясняется миграцией в кровотоки костномозгового пула молодых форм эритроцитов, который, вероятно, редуцирован у больных с выраженным гемолизом в виду усиленной элиминации ретикулоцитов до операции при напряженном эритропоэзе. Сохраняющийся после ИК дефицит CD55⁺-эритроцитов данной группы пациентов, тем не менее, не приводит к более интенсивной интраоперационной активации системы комплемента и ее альтернативного пути, в частности, (см. табл. П.12), поскольку основным индуктором этого механизма во время ИК служит синтетическая поверхность аппарата, полностью лишенная CD55-молекул и других естественных ингибиторов комплемента.

Таким образом, подводя итог оценке функционального состояния системы комплемента и ее ингибиторов у кардиохирургических больных, можно заключить, что вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза течение ИБС сопровождается нормальной экспрессией CD35-молекул на эритроцитах и чрезмерной активацией системы комплемента до операции (см. табл. П.12). У больных с умеренной гемоглобинемией данный процесс коррелирует с увеличением функциональной активности классического пути инициации комплемента, очевидно, вследствие гиперпродукции его компонентов при повышенном содержании TNF- α в крови. Последний также способствует образованию витронектина, удерживающего ТКК в жидкой фазе [146, 222, 224], что, вероятно, предохраняет эритроциты от комплемент-зависимого лизиса и поддерживает

проницаемость их мембраны на уровне нормальных значений. У больных с выраженной гемоглобинемией чрезмерная генерация ТКК в сыворотке крови до операции является результатом гиперактивации системы комплемента по альтернативному пути, очевидно, ввиду дефицита экспрессии CD55-молекул на эритроцитах, что сочетается с нормальным уровнем TNF- α и, возможно, витронектина в плазме крови, который не обеспечивает должную акцепцию избытка ТКК, активно внедряющегося в мембрану эритроцитов и опосредующего увеличение ее проницаемости. Во время операции при соприкосновении крови с поверхностью экстракорпорального контура вне зависимости от выраженности гемоглобинемии происходит массивная активация системы комплемента, преимущественно по альтернативному пути, что на фоне недостатка витронектина (вследствие гемодилюции) определяет погружение МАК в мембрану эритроцитов, снижая исходно нормальную ее проницаемость при умеренном гемолизе и поддерживая низкие значения этой величины при выраженной гемоглобинемии. Вместе с тем, комплемент-зависимый лизис эритроцитов лежит в основе умеренного гемолиза и не является ведущим фактором в патогенезе выраженного лизиса клеток красной крови, что означает участие других механизмов (активации ПОЛ в эритроцитах) в реализации этой реакции.

5.3. Участие механизмов регуляции объема эритроцита в патогенезе умеренного и выраженного гемолиза у кардиохирургических больных после операции с искусственным кровообращением

Закономерным следствием нарастания неспецифической проницаемости мембраны эритроцитов служит поступление воды в клетки, их сферуляция и цитолиз [69, 74, 158]. В настоящем исследовании определение среднего объема эритроцита²⁷ у больных обеих групп исследования установило соответствие данной величины норме до операции и ее уменьшение после ИК (по отношению к дооперационному этапу) (см. табл. П.13). При этом негативная

²⁷ Средний объем эритроцита оценивали с помощью гематологического анализатора МЕК-6410 (Nihon Kohden, Япония).

динамика показателя была менее отчетливой у больных с выраженной гемоглобинемией, что реализовалось в статистически значимое преобладание среднего объема эритроцита у этих пациентов над таковым у больных с умеренным гемолизом после ИК (см. табл. П.13).

Сопоставление полученных данных обнаружило следующий феномен: различие в проницаемости мембраны эритроцитов у больных с умеренным и выраженным гемолизом до операции регистрировалось при равном объеме клеток, а различие в объеме клеток после ИК – при равной проницаемости цитолеммы (см. табл. П.12, П.13). Данный факт означает участие в регуляции объема эритроцитов компенсаторно-приспособительных механизмов: активного ионного транспорта, восстанавливающего концентрационные градиенты Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и белков цитоскелета, удерживающих форму клетки [10, 69, 74, 99, 139, 158, 280].

Согласно вышеописанным результатам, эритроциты у больных с выраженным постперфузионным гемолизом характеризуются функциональной и (или) структурной неполноценностью цитоскелета (увеличение индекса ригидности клеток, см. табл. П.7) на обоих этапах исследования. При этом до операции не происходит изменения объема клетки при повышенной проницаемости мембраны, но проявляется после ИК (см. табл. П.12, П.13). Данное обстоятельство позволяет предположить, что причина вариабельности объема эритроцитов и постперфузионной гемоглобинемии кроется именно в дисфункции ионного транспорта клеток. Важная роль указанных процессов в патогенезе гемолиза подтверждается положительной корреляцией среднего объема эритроцита после операции с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови в этот период ($r = 0,40$; $p < 0,01$).

Определение активности Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы²⁸ (АТФазы) в мембране эритроцитов у больных ИБС с умеренным

²⁸ Активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов определяли путем инкубации выделенных мембран в среде, содержащей АТФ в присутствии и отсутствии Na^+ , учитывая результат реакции по уровню накопленного неорганического фосфора (Pi), образующегося в результате гидролиза АТФ под действием АТФазы. Содержание неорганического фосфора регистрировали по его способности образовывать с молибденовым аммонием фосфомолибдат аммония, который восстанавливается аскорбиновой кислотой до молибденовой сини [39].

гемолизом установило низкие значения показателя до операции, которые оставались таковыми и после завершения ИК (рис. 5).

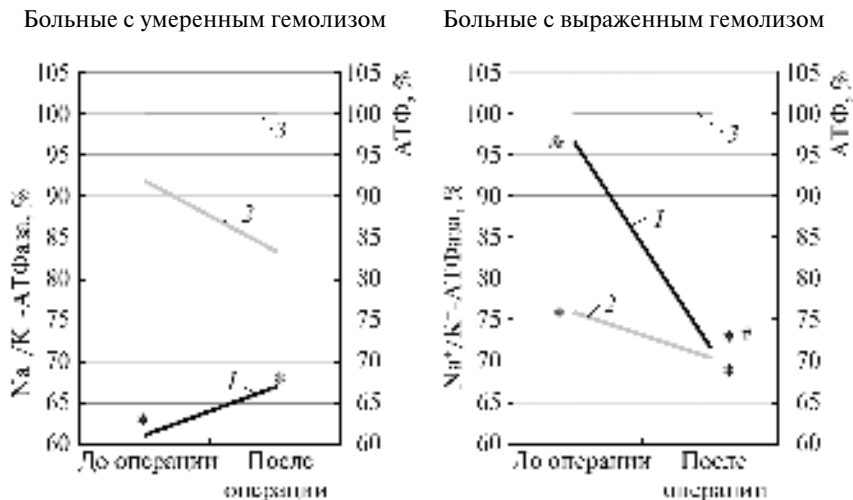


Рис. 5. Активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов и содержание АТФ в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения: 1 – активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов, % от значений у здоровых лиц; 2 – содержание АТФ в эритроцитах, % от значений у здоровых лиц; 3 – здоровые лица (100%); & – статистически значимые различия между показателями у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом на соответствующем этапе исследования; * – статистически значимые различия показателей у кардиохирургических больных по сравнению со здоровыми лицами; # – по сравнению с дооперационным этапом

Подобное состояние вполне укладывается в современные представления о патологии периферического звена эритрона при ИБС и других заболеваниях, ассоциированных с атеросклерозом [45, 52, 164, 165]. Эффекты влияния установленных нарушений структурно-метаболического статуса эритроцитов (избыток ХС и лФХ в мембране, активация ПОЛ) у данной категории лиц на активность Na^+/K^+ -АТФазы в клетках красной крови широко известны. В частности, интенсификация свободнорадикального окисления, накопление лФХ и деградация ФС в мембране эритроцитов непосредст-

венно угнетают деятельность Na^+/K^+ -АТФазы, поскольку заряженные боковые цепи фермента вступают в контакт с полярными головками ФЛ. Аккумуляция ХС и увеличение соотношения ХС/ФЛ повышают микровязкость мембраны эритроцитов в области анулярных липидов, затрудняя «флип-флоп» переходы АТФаз [10, 52, 74, 377]. Однако М. Broncel и соавт. (2007) предполагают возможность прямого взаимодействия молекулы Na^+/K^+ -АТФазы с ХС, что приводит к формированию менее активной конформации белка [165].

В свою очередь, снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцита приводит к избытку Na^+ и дефициту K^+ в клетках, что изменяет их объем. При этом высокие интрацеллюлярные концентрации Na^+ являются основным сигналом к увеличению активности Na^+/K^+ -АТФазы, если отсутствуют ингибиторные влияния [3, 368, 377]. Ввиду наличия у больных ИБС с умеренной гемоглобинемией нескольких факторов, ингибирующих фермент (накопление ХС, лФХ, активация ПОЛ (см. табл. П.8, П.10, П.11)), низкая активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов (см. рис. 5) вполне объяснима и сочетается с отчетливой тенденцией к увеличению среднего объема клеток до операции (см. табл. П.13). После перфузии стабильно низкая активность данного фермента у больных с умеренной гемоглобинемией (рис. 5) объясняется, вероятно, интеграцией разнонаправленных процессов в мембране. Повреждающее действие прооксидантов со стороны внеклеточного пространства (содержание ТБК-активных продуктов в плазме крови после операции возросло, см. табл. П.9), по-видимому, уравновешивалось поступлением в кровотоки молодых форм эритроцитов (см. табл. П.3), обладающих максимальной активностью Na^+/K^+ -АТФазы [287] и определяющих снижение соотношения ХС/ФЛ в липидном бислое по сравнению с дооперационным этапом (см. табл. П.8).

При развитии выраженного гемолиза активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов до операции, напротив, была нормальной (см. рис. 5), что, вероятно, связано с резко выраженным ретикулоцитозом у пациентов уже в дооперационном периоде (см. табл. П.3) и имеет, в общем, аналогичное объяснение: незначительное увеличение соотношения ХС/ФЛ в мембране (см. табл. П.8), ее нормальный фосфолипидный спектр (см. табл. П.11) и нативная (малоповрежденная в силу возраста клеток) конформационная структура фермента.

Возможно, нормальная активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов у больных с выраженным гемолизом компенсировала высокую проницаемость последней, в результате чего объем эритроцитов до операции не отличался от такового у пациентов с умеренной гемоглобинемией, у которых пониженная активность фермента сочеталась с нормальной проницаемостью мембраны эритроцитов (см. табл. П.12, рис. 5).

В послеоперационном периоде активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране клеток красной крови при выраженном гемолизе еще более снижалась, очевидно, вследствие интраоперационной активации механизмов свободнорадикального окисления в эритроцитах (по нарастанию ТБК-активных продуктов, см. табл. П.10), влекущих нарушение фосфолипидного спектра мембраны с накоплением лФХ (см. табл. П.11), увеличение соотношения ХС/ФЛ в ней (см. табл. П.8) и непосредственную окислительную модификацию самого фермента. Последнее превалирует над процессами пероксидации липидов цитолемы, поскольку, согласно результатам дисперсионного анализа, аккумуляция продуктов ПОЛ в эритроцитах у кардиохирургических больных после операции обуславливает 10,36% вариабельности ($p < 0,05$) постперфузионного гемолиза, в то время как недостаточность ферментов, участвующих в антиоксидантной защите клеток (каталаза и Г-6-ФДГ), в сумме – 39,88% данного эффекта ($p < 0,05$). Следовательно, неутилизированные АФК у больных с выраженным гемолизом, по всей видимости, оказывают свое повреждающее действие на эритроциты преимущественно путем деградации молекул нелипидной природы.

Общеизвестно, что наиболее чувствительны к свободнорадикальному окислению сульфгидрильные группы ($-\text{SH}$) мембранных белков: ферментов, ионных каналов и насосов [74, 83, 170, 373]. Было показано, что окислительная модификация Na^+/K^+ -АТФазы угнетает ее активность [286, 377], в том числе и у кардиохирургических больных при гипотермической перфузии [194, 286, 377, 416]. Кроме того, функционирование Na^+/K^+ -АТФазы может подавляться также в присутствии эндогенных ингибиторов – кальнактина, снижающего сродство фермента к K^+ при повышенных интрацеллюлярных концентрациях Ca^{2+} и убаин-подобного фактора, содержание которого возрастает в плазме крови на фоне стрессорного

воздействия любой этиологии [10, 27]. Однако информация об изменении концентрации этих веществ у кардиохирургических больных во время ИК в литературе отсутствует.

Несмотря на послеоперационное снижение, активность Na^+/K^+ -АТФазы в эритроцитах у больных с выраженным гемолизом соответствовала таковой у пациентов с умеренной гемоглобинемией после ИК (см. рис. 5), что само по себе не может объяснить вариабельность гемолитических реакций. Принимая во внимание особенности методики определения активности данного фермента в суспензии отмытых тений эритроцитов в присутствии экзогенного АТФ строго определенной концентрации [39], полученные результаты у кардиохирургических больных не учитывали внутриэритроцитарное содержание АТФ как субстрата для деятельности фермента [3, 286, 377]. Между тем, в эритроцитах был обнаружен дефицит содержания АТФ²⁹ у больных с выраженным постперфузионным гемолизом и нормальное содержание макроэрга у пациентов с умеренной гемоглобинемией вне зависимости от этапа исследования (см. рис. 5). Это вполне согласуется с неоднозначными данными литературы о модуляции энергетического метаболизма эритроцитов на фоне атеросклероза, демонстрирующими как недостаток АТФ в клетках красной крови [199], так и его нормальное количество [9, 80]. Среди возможных причин дефицита АТФ в эритроцитах у больных атеросклерозом рассматриваются несколько механизмов: нарушение активности гликолитических ферментов, повышенная утилизация глюкозы в реакциях пентозофосфатного пути с целью поддержания восстановительных процессов, расход АТФ и аденозинмонофосфата (АМФ) через повышение активности АМФ-деаминазы вследствие усиления оксидативного повреждения эритроцитов [80].

В дооперационном периоде интенсивность процессов ПОЛ в эритроцитах у больных обеих групп была одинаковой (см. табл. П.10), что позволяет исключить свободнорадикальный механизм

²⁹ Содержание АТФ в эритроцитах определяли в гемолизате, очищенном от гемоглобина 20%-й трихлоруксусной кислотой, разделяя АТФ, АДФ и аденозинмонофосфат методом тонкослойной хроматографии в смеси растворителей «диоксан : изопропанол : аммиак : вода» с последующей элюцией АТФ из соответствующей области хроматограммы (верифицировали с помощью реагента АТФ (Sigma, США)) в растворе 0,01N HCl [7, 36].

и предположить именно недостаточность ферментов гликолиза как причину дефицита АТФ в клетках у лиц с выраженным гемолизом, у которых к тому же был зафиксирован дефицит фермента пентозофосфатного шунта Г-6-ФДГ (см. табл. П.10). Последнее еще раз подчеркивает неполноценность молодой популяции эритроцитов, образуемой у больных этой группы на фоне напряженного эритропоэза, поскольку известно, что ферменты гликолиза в ретикулоцитах более активны, чем в старых клетках [69, 74, 158]. Кроме того, на содержание АТФ в эритроцитах негативное влияние может оказывать интенсивное функционирование АТФаз [10, 74, 381], в связи с чем пониженная активность Na^+/K^+ -АТФазы эритроцитарной мембраны у больных с умеренным гемолизом могла способствовать сохранению внутриклеточного пула АТФ в пределах нормы (см. рис. 5).

Известно, что роль АТФ в эритроцитах тесно связана с функционированием цитоскелета, при фосфорилировании белков которого деформируемость клеток возрастает [99, 109, 156]. Поэтому не исключено, что дефицит АТФ в клетках красной крови у больных с выраженным гемолизом способствовал увеличению ригидности (см. табл. П.7), обусловленному, предположительно, дефектом структуры спектрин-актиновой сети. С другой стороны, некоторые белки цитоскелета (β -спектрин, анкирин и белок полосы 3) участвуют в формировании мембранного пула АТФ, необходимого для функционирования АТФаз, а белок полосы 3 к тому же ассоциирован с ферментами гликолиза [10, 54, 149, 181]. За связь с данным белком конкурирует восстановленный гемоглобин, накапливающийся в эритроцитах на фоне периоперационной гипоксии или в условиях избытка 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), который в большом количестве содержится в молодых эритроцитах [69, 80, 132, 149, 158]. Учитывая высоковероятную дисфункцию белков цитоскелета и значительный ретикулоцитоз у больных с выраженным гемолизом, оба фактора могут способствовать истощению мембранного пула АТФ при его общем дефиците в клетке (см. рис. 5), опосредуя угнетение деятельности АТФаз, усугубление ионного дисбаланса и гемолиз. Следует отметить, что высокое содержание в эритроцитах 2,3-ДФГ (ввиду ретикулоцитоза), снижающего сродство гемоглобина к кислороду, вероятно, обуславливает чрезмерное увеличение pO_2 в крови у этих больных во время ИК (см. табл. П.4),

которое создается с целью 100%-го насыщения гемоглобина кислородом [65] и таким образом провоцирует манифестацию предсуществующего дефицита антиоксидантов (см. табл. П.10).

В послеоперационном периоде концентрация АТФ в эритроцитах больных ИБС обеих групп исследования изменялась не значительно (см. рис. 5), что продемонстрировано и другими авторами [9, 174]. В условиях экспериментального деформационного стресса в эритроцитах возрастает потребление АТФ, но при наличии глюкозы в инкубационной среде компенсаторно усиливаются и процессы его ресинтеза. Показано, что через 30–60 мин после начала сдвиговой нагрузки продукция АТФ в клетках становится больше исходных значений, постепенно снижаясь в последующем [99]. Данный факт объясняет зарегистрированную нами отчетливую тенденцию к снижению уровня АТФ в эритроцитах у кардиохирургических больных (см. рис. 5) через 100–120 мин ИК (см. табл. 4). При этом у пациентов с выраженным гемолизом сохраняющийся после операции дефицит АТФ в эритроцитах сочетается со снижением исходно нормальной активности Na^+/K^+ -АТФазы (см. рис. 5), что, видимо, опосредует увеличение объема клетки (по отношению к таковому у больных с умеренной гемоглобинемией, см. табл. П.13) и способствует быстрому лизису эритроцитов.

Другим механизмом, способным влиять на клеточный объем, является система Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов ($\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов), открытие которых при повышении внутриклеточных концентраций Ca^{2+} приводит к пассивному выходу ионов K^+ из клетки, что влечет за собой удаление Cl^- по электрохимическому градиенту и H_2O [117, 293, 414]. Это наиболее раннее событие в каскаде цитотоксических реакций, индуцированных ионами Ca^{2+} , благодаря чему при увеличении проницаемости мембраны объем клетки стабилизируется и может даже уменьшаться [3]. Данный механизм предохраняет эритроциты от осмотического лизиса при развитии микросфероцитоза и комплемент-зависимого повреждения [3, 45, 74, 86, 203].

Одним из способов оценки проводимости $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов служит регистрация Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа (ГПО) эритроцитов, который дает представление не только о состоянии $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов, но и косвенные сведения об активности Ca^{2+} -АТФазы мембраны эритроцитов [79, 86]. Так, изучение ГПО

эритроцитов³⁰ показало, что скорость гиперполяризации мембраны и амплитуда ГПО у больных ИБС соответствовали норме вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования (см. табл. П.13). Согласно данным литературы, эти показатели характеризуют суммарную проводимость $K^+(Ca^{2+})$ -каналов, которых в эритроците насчитывается несколько десятков, и функционируют они по принципу «все или ничего», т.е. могут находиться только в двух состояниях – либо полностью открыты, либо полностью закрыты [86, 293, 414]. Являясь пассивным ионным транспортером, $K^+(Ca^{2+})$ -каналы, по всей видимости, менее чувствительны к изменениям липидного спектра мембраны эритроцитов на фоне атеросклероза, чем АТФазы, что объясняет нормальные значения V_1 и ΔE у больных ИБС.

Кроме того, показано, что K^+ -проводимость мембраны эритроцитов при патологии может как снижаться (онкологические, воспалительные заболевания), представляя собой неспецифический ответ эритроцитов на повреждение, так и возрастать, являясь следствием ретикулоцитоза при гемолитических реакциях (микросфероцитоз) [86, 315]. Вероятно, у больных ИБС сочетание неспецифической альтерации эритроцитов на фоне атеросклероза с усилением их гибели и активацией эритропоэза определило в целом нормальные показатели открывания $K^+(Ca^{2+})$ -каналов.

В то же время у пациентов с выраженной гемоглобинемией отмечалось некоторое увеличение скорости гиперполяризации мембраны V_1 и амплитуды ΔE ГПО эритроцитов до операции (см. табл. П.13), что, предположительно, связано с высоким содержанием ретикулоцитов в крови (см. табл. П.3), так как молодые формы эритроцитов обладают большей проводимостью $K^+(Ca^{2+})$ -каналов [380]. В послеоперационном периоде была зарегистрирована отчетливая тенденция к снижению величины данных показателей (см. табл. П.13), что демонстрирует, очевидно, повреждение мембраны эритроцитов при

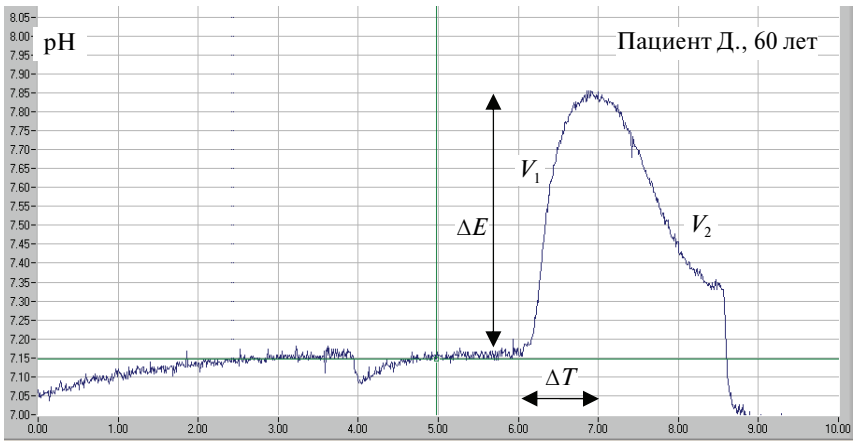
³⁰ Проводимость $K^+(Ca^{2+})$ -каналов эритроцитов оценивали методом регистрации мембранного потенциала при Ca^{2+} -индуцированном гиперполяризационном ответе клеток, в ходе которого мембранный потенциал эритроцитов при добавлении Ca^{2+} и кальциевого ионофора A23187 сначала возрастает (гиперполяризация), что обусловлено открыванием $K^+(Ca^{2+})$ -каналов, а затем восстанавливается до показателей нормы вследствие активации Ca^{2+} -АТФазы, удаляющей ионы Ca^{2+} из цитоплазмы и опосредующей закрывание этих структур [79, 86].

выраженном гемолизе. У пациентов с умеренной гемоглобинемией, напротив, скорость гиперполяризации мембраны эритроцитов даже несколько возрастала, что, вероятно, явилось следствием более значительного ретикулоцитоза (см. табл. П.3, П.13).

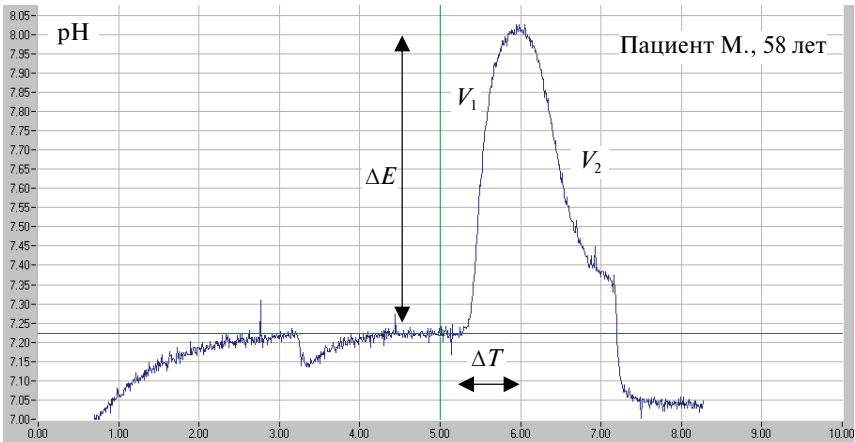
Несмотря на то, что показатели открывания $K^+(Ca^{2+})$ -каналов не отличались у больных сравниваемых групп, параметры закрывания этих структур оказались различными (см. табл. П.13). Скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов V_2 до операции у больных с умеренным гемолизом была существенно ниже, чем у пациентов с выраженной гемоглобинемией и у здоровых доноров (см. табл. П.13). Это согласуется с данными литературы об угнетении активности Ca^{2+} -АТФазы в мембране эритроцитов у лиц, страдающих атеросклерозом [64, 74]. Механизм ее ингибирования, очевидно, аналогичен таковому для Na^+/K^+ -АТФазы – увеличение соотношения ХС/ФЛ в мембране эритроцитов, нарушение ее ФЛ-спектра, активация ПОЛ, что показано нами для больных ИБС (см. табл. П.8, П.10, П.11). При этом нормальная дооперационная величина V_2 и, соответственно, активность Ca^{2+} -АТФазы (как и Na^+/K^+ -АТФазы) в эритроцитах у пациентов с выраженным гемолизом могут быть связаны с высоким содержанием ретикулоцитов в крови (см. табл. П.3), в которых активность ионных насосов выше, чем в старых клетках [143].

В послеоперационном периоде у кардиохирургических больных определялись реципрокные тенденции в изменении скорости восстановления мембранного потенциала: при умеренной гемоглобинемии она несколько снижалась, а при выраженной – существенно возрастала, превышая таковую у больных первой группы (см. табл. П.13). Время достижения максимального потенциала мембраны при ГПО эритроцитов ΔT у пациентов с выраженным гемолизом сокращалось менее нормы, чего не отмечалось у них до операции, а также у больных с умеренным гемолизом на обоих этапах исследования (см. табл. П.13).

Графическая регистрация Ca^{2+} -индуцированного ГПО эритроцитов у кардиохирургических больных после операции обнаружила неоднозначный характер кривой: при умеренном гемолизе ее форма характеризовалась округлой вершиной и плавным спуском, в случае выраженной гемоглобинемии – остроконечным максимумом и быстрым восстановлением мембранного потенциала (рис. 6).



а



б

Рис. 6. Примеры кривых изменения рН инкубационной среды при графической регистрации Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца с умеренным (а) и выраженным (б) гемолизом после операции с искусственным кровообращением: V_1 – скорость гиперполяризации мембраны эритроцитов; V_2 – скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов; ΔE – максимальное изменение мембранного потенциала при ГПО; ΔT – время, через которое отмечалась максимальная гиперполяризация мембраны эритроцитов при ГПО

При анализе подобных диаграмм становится очевидным, что площадь, ограниченная графиком и изолинией, у больных с выраженным гемолизом намного меньше таковой в группе сравнения (рис. 6). Это означает, что у больных с умеренной гемоглобинемией из-за пониженной активности Ca^{2+} -АТФазы в мембране эритроцитов реверсия внутриклеточной концентрации Ca^{2+} до квазистационарного состояния клетки происходит медленно, потому медленно закрываются $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы, благодаря чему из клетки удаляется большее количество ионов K^+ , а объем эритроцита сильно уменьшается, предохраняя его от цитолиза на фоне возросшей проницаемости мембраны во время ИК. В случае выраженного гемолиза ускоренная индукция Ca^{2+} -АТФазы при повышенной активности фермента обуславливает ускоренную элиминацию ионов Ca^{2+} из клетки, $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы быстро закрываются (т.к. регистрируется сокращение ΔT) и объем эритроцита уменьшается незначительно (см. табл. П.13), что при высокой проницаемости цитолеммы (см. табл. П.12) способствует скорейшему лизису клетки.

Следовательно, участие $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов в патогенезе выраженного постперфузионного гемолиза является весьма важным фактором, но определяется оно интраоперационным изменением кинетики Ca^{2+} -АТФазы. При этом, видимо, меняется не столько ее активность, сколько скорость индукции фермента: время достижения максимума ГПО эритроцитов сокращается и становится меньше нормальных значений (см. табл. П.13). Не исключено также изменение кинетических параметров самих $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов, в результате чего они начинают закрываться при внутриклеточных концентрациях Ca^{2+} , несколько больших, чем в норме.

Можно предположить, что причиной активации Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах у больных с выраженным гемолизом служит интраоперационная интенсификация ПОЛ, поскольку известно, что незначительная свободнорадикальная модификация Ca^{2+} -АТФазы, как и частичный ее протеолиз эндогенным кальпаином или другими протеазами, приводят к увеличению активности фермента [10, 45, 346]. Активация протеинкиназы С оказывает аналогичный эффект; тогда как активация цАМФ-протеинкиназы и опосредованное ею фосфорилирование белков цитоскелета угнетают функционирование Ca^{2+} -АТФазы [74, 186].

Кроме того, существуют кальмодулин- и фосфолипид-зависимая регуляция активности Ca^{2+} -АТФазы, молекулы которой обладают различными сайтами связывания для этих факторов. В присутствии высоких концентраций лФХ, ФС, ФИ, ФХ и ФЭА в липидном бислое деятельность Ca^{2+} -АТФазы возрастает [10, 74, 296]. Однако содержание ФС и ФЭА в мембране эритроцитов после операции у больных обследованных групп было равным, доля лФХ во время операции при выраженном гемолизе нарастала, но не превышала значений группы сравнения, а в отношении ФХ и ФИ обнаружился даже дефицит таковых (см. табл. П.11). В связи с этим наиболее вероятно, что активация Ca^{2+} -АТФазы в мембране эритроцитов при выраженном гемолизе происходила через кальмодулин-зависимые механизмы.

Кальмодулин содержится в эритроцитах в большом количестве, превышающем концентрацию Ca^{2+} , благодаря чему выполняет роль цитоплазматического буфера. При увеличении интрацеллюлярной концентрации Ca^{2+} , образующийся комплекс кальмодулин- Ca^{2+} активирует Ca^{2+} -АТФазу [10, 74, 296, 346]. Несмотря на то что оценка содержания Ca^{2+} в эритроцитах у кардиохирургических больных в настоящем исследовании не проводилась, мы регистрировали у пациентов с выраженным гемолизом, в отличие от представителей другой группы, все косвенные признаки накопления Ca^{2+} в клетке после операции: активацию фосфолипазы A_2 (ФЛ- A_2) (по накоплению лФХ в мембране эритроцитов, см. табл. П.11), эхиноцитарную трансформацию клеток (см. табл. П.6) и собственно активацию Ca^{2+} -АТФазы (уменьшение I_2 при ГПО эритроцитов, см. табл. П.13). Учитывая данный факт, и то что неспецифическая проницаемость мембраны эритроцитов после операции у больных обеих групп была одинаково повышенной (см. табл. П.12), при выраженной гемоглобинемии, вероятно, имеет место избирательное поступление Ca^{2+} в эритроциты.

Существуют данные о том, что кислые фосфолипиды, ФС и ФК могут электрохимически связывать Ca^{2+} , а последняя даже названа природным ионофором кальция, поскольку транспортирует его внутрь клетки [10, 296]. Между тем, роль данного механизма в увеличении проницаемости мембраны эритроцитов для Ca^{2+} маловероятна, так как содержание ФК в липидном бислое возрастало после операции как при выраженном, так и при умеренном гемолизе (см. табл. П.11). Поэтому аккумуляция Ca^{2+} в эритроцитах у пациентов с выраженной гемоглобинемией обусловлена либо открыва-

нием Ca^{2+} -каналов, либо участием неспецифических ионных каналов [99, 109, 204, 273].

В настоящее время показано, что поступление Ca^{2+} в эритроциты происходит через неспецифические катионные каналы TRPC6 типа, которые активируются при окислительном стрессе и воздействии простагландина E_2 [204, 269]. Поскольку у больных с выраженным гемолизом, в отличие от пациентов с умеренной гемоглобинемией, отмечалось интраоперационное накопление ТБК-активных продуктов и активация ФЛ-A_2 (по нарастанию уровня ЛФХ в эритроцитах), то, видимо, открытие TRPC6 каналов инициировало вход Ca^{2+} в клетку. Вместе с тем, поступление Ca^{2+} в эритроциты может ограничиваться в присутствии эритропоэтина (ЕРО), который в концентрациях до 1000 мМЕ/мл дозозависимо блокирует этот процесс [272, 316].

Измерение концентрации ЕРО^{31} в плазме крови у кардиохирургических больных показало, что у пациентов с умеренным гемолизом данный показатель превышал таковой в группе сравнения на обоих этапах исследования (см. табл. П.3). Это означает, что эритроциты у пациентов с умеренным гемолизом более защищены от поступления Ca^{2+} в клетку. У больных с высокой интенсивностью гемолитических реакций избыток Ca^{2+} в эритроцитах после операции, по-видимому, обуславливался сочетанием двух факторов: усилением активирующих влияний на TRPC6-каналы (активация ПОЛ и ФЛ-A_2) и недостаточной эритропоэтин-зависимой протекцией клеток, в то время как при умеренном гемолизе активационные стимулы сохранялись на дооперационном уровне при значительном увеличении протективной роли ЕРО. Более того, последний механизм, скорее всего, является основополагающим, так как, согласно результатам кластерного анализа³², концентрация ЕРО в плазме

³¹ Концентрацию эритропоэтина в плазме крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческого набора «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) согласно инструкции производителя.

³² Кластерный анализ выполняли в объединенной популяции больных ИБС (с умеренным и выраженным гемолизом) методом k-средних, считая результат статистически значимым в случае наличия достоверных различий между образованными кластерами при уровне статистической значимости $p < 0,05$. Графически алгоритм кластеризации отражали в виде дендрограмм.

крови после операции позволяет распределить общую популяцию больных ИБС на группу с умеренной и выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.14, рис. 7). Взаимосвязь «ЕРО – $K^+(Ca^{2+})$ -каналы – объем клетки» также подтверждается тенденцией к кластеризации для параметра V_2 ГПО эритроцитов ($p = 0,069$) и результатами дисперсионного анализа: содержание ЕРО в крови после операции вносит 13,2% ($p < 0,05$) в вариабельность постперфузионной гемоглобинемии, параметр ΔT (отражает время активации Ca^{2+} -АТФазы) – 18,7% ($p < 0,05$), а средний объем эритроцитов – 23,9% ($p < 0,05$).

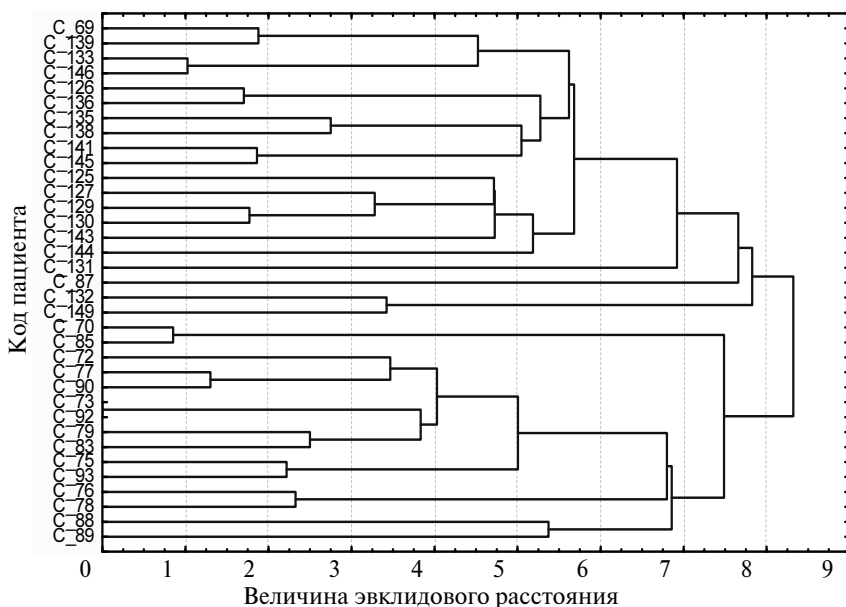


Рис. 7. Дендрограмма кластеризации больных ишемической болезнью сердца в зависимости от содержания эритропоэтина в плазме крови после операции и выраженности постперфузионной гемоглобинемии (С — код пациента, под которым зашифрована пара значений «концентрация эритропоэтина» и «концентрация свободного гемоглобина»)

Таким образом, в основе ионного дисбаланса эритроцитов и внутрисосудистого гемолиза во время ИК лежат сложные механизмы. У больных с умеренным постперфузионным гемолизом активность АТФаз в мембране клеток красной крови до операции пони-

жена вследствие избыточного накопления в ней ХС, что, видимо, опосредует некоторое повышение внутриклеточной концентрации Na^+ , проявляющееся отчетливой тенденцией к увеличению объема эритроцита в дооперационном периоде. При этом накопления Ca^{2+} в цитоплазме эритроцитов не происходит ввиду высокой концентрации ЕРО, блокирующего входящий ток этого катиона. После операции проницаемость мембраны клеток возрастает, способствуя поступлению Ca^{2+} , что одновременно ограничивается резким увеличением ЕРО в плазме крови, и умеренная аккумуляция иона оказывается достаточной для активации $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов, которые в силу сохраняющейся низкой активности Ca^{2+} -АТФазы остаются открытыми длительное время и опосредуют значительное уменьшение объема клетки, предохраняя ее от лизиса.

Развитию выраженного гемолиза предшествует нормальная активность АТФаз, обусловленная высоким содержанием ретикулоцитов в крови, что сопровождается низкой концентрацией АТФ в эритроцитах и высокой проницаемостью их мембраны, определяя, вероятно, некоторое повышение внутриклеточной концентрации Na^+ и незначительное увеличение объема клетки до операции. При этом содержание Ca^{2+} в цитоплазме остается нормальным. В послеоперационном периоде на фоне сохраняющейся высокой проницаемости мембраны эритроцитов и дефицита АТФ происходит интраоперационная активация свободнорадикального окисления, в результате чего активность Na^+/K^+ -АТФазы в цитолемме снижается и открываются неспецифические катионные каналы TRPC6, возрастает количество входящего Ca^{2+} , опосредующее открывание $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов и увеличение активности Ca^{2+} -АТФазы. Последнее способствует быстрому прерыванию выходящего калиевого тока, что не позволяет эритроциту существенно уменьшить свой объем, предрасполагая его к скорейшему лизису. При этом непосредственное протективное влияние ЕРО на клетки красной крови выражено слабо. Однако ЕРО, как гемопоэтический фактор, способен опосредованно через регуляцию эритропоэза модулировать свойства вновь образуемых клеток, что может быть основой дооперационных различий структурно-метаболического статуса эритроцитов у больных с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом.

Глава 6

ВЛИЯНИЕ ДИСФУНКЦИИ ЭРИТРОПОЭЗА, АВ0- И РЕЗУС-ФЕНОТИПА ЭРИТРОЦИТОВ НА ВЫРАЖЕННОСТЬ ПОСТПЕРФУЗИОННОГО ГЕМОЛИЗА

6.1. Дисрегуляция процессов эритропоэза и эритродиереза как причина вариабельности внутрисосудистого гемолиза при искусственном кровообращении

Согласно современным данным, ЕРО поддерживает жизнеспособность эритроцитов не только путем модуляции кальциевого гомеостаза. Безъядерные клетки красного ростка, как и эритрокарионы, экспрессируют рецепторы к ЕРО, численность которых невелика относительно ядросодержащих клеток, но их дисфункция или недостаточность ЕРО индуцируют эриптоз [19]. Последний представляет собой запрограммированную гибель эритроцитов, которая запускается при увеличении уровня Ca^{2+} в цитоплазме эритроцитов, энергодефиците и активации свободнорадикального окисления. Это ведет, с одной стороны, к открыванию $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов и уменьшению объема клетки, а с другой – к активации скрэмблазы и экстернализации ФС, что служит маркером для элиминации таких эритроцитов клетками РЭС [19, 204, 272, 273, 316]. При этом АФК активируют редокс-чувствительные каспазы эритроцидных клеток, осуществляющие деградацию белка полосы 3 – ионного обменника ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), якоря для закрепления цитоскелета в мембране эритроцитов и сайта для связывания ферментов гликолиза [74, 181, 294].

Экспериментально доказано, что ЕРО блокирует эриптоз, индуцированный и Ca^{2+} и окислительным стрессом [399]. Ввиду того, что у больных с выраженным гемолизом в клетках красной крови сформировались оба стимула эриптоза во время операции при небольшом увеличении ЕРО в крови, а у лиц с умеренной гемоглобинемией – ни один из них при резком нарастании плазменной кон-

центрации ЕРО, то активация эритропоэза у больных с выраженной гемоглобинемией могла потенцировать гибель эритроцитов в послеоперационном периоде. Кроме того, у этой категории лиц эритропоэз, вероятно, усугублялся недостатком АТФ в эритроцитах, который отмечался у них на обоих этапах исследования и не обнаруживался у больных с умеренной гемоглобинемией (см. рис. 5).

Зарегистрированная в настоящем исследовании высокая интенсивность дооперационной гибели эритроцитов путем внутрисосудистого гемолиза у больных с выраженной гемоглобинемией (по концентрации свободного гемоглобина в плазме крови до операции, см. табл. П. 3) сочеталась, по всей видимости, с активацией эритропоэза, который не ингибировался ввиду отсутствия гиперпродукции ЕРО, что, напротив, отмечалось у больных с умеренной гемоглобинемией, имевших высокий уровень ЕРО до операции. В связи с этим возникает вопрос: что явилось причиной различной концентрации ЕРО в крови у больных с умеренным и выраженным гемолизом?

Известно, что ЕРО образуется преимущественно интерстициальными клетками кортикального слоя почек, представляющими собой трансформированные макрофаги, расположенные вблизи проксимальных канальцев, а также макрофагами печени, костного мозга, гепатоцитами и некоторыми другими клетками, при этом доля внепочечного ЕРО не превышает 10–15%. Экспрессия гена ЕРО, расположенного в 7-й хромосоме, запускается под влиянием фактора HIF-1 (hypoxia inducible factor), который связывается с концевой частью гена *EPO* и обуславливает его секрецию уже через 1–2 ч с момента гипоксии. Образование HIF-1 происходит, вероятно, во всех клетках организма, как универсальная адаптивная реакция на гипоксию, в условиях которой изменяется уровень эндогенного H_2O_2 , что стимулирует синтез HIF-1. Кроме того, клетки почечных канальцев при дефиците кислорода способны высвобождать АМФ, который с участием экто-5-нуклеотидазы повышает содержание аденозина в интерстициальных клетках почек и продукцию ими ЕРО [34, 166, 404, 418]. Подобная цепь событий вполне объясняет увеличение концентрации ЕРО в плазме крови у кардиохирургических больных после операции, сопровождающейся ишемией тканей и кровопотерей.

Учитывая изложенное и равную степень тяжести сердечной недостаточности (СН) у больных ИБС с умеренным и выраженным гемолизом (см. табл. П.1), концентрация ЕРО в плазме крови у них до операции должна быть одинаково повышенной, но в группе больных с выраженной гемоглобинемией этого не отмечалось (см. табл. П.3). Более того, у данной категории лиц несколько чаще встречались СН III степени и заболевания легких (хроническая обструктивная болезнь легких, пневмофиброз, хронический бронхит) (см. табл. П.1), что, напротив, предрасполагало к усугублению кислородной недостаточности и повышению синтеза ЕРО.

При этом у больных с умеренной постперфузионной гемоглобинемией чаще встречались заболевания мочевыделительной системы, которые могут сопровождаться как гипер-, так и гипопродукцией ЕРО. Известно, что если деструктивные процессы в почке локализуются преимущественно в кортикальной зоне (гломерулонефрит, хроническая почечная недостаточность), то это ведет к дефициту ЕРО, если же корковый слой первично не затронут и превалирует гипоксия, то это проявляется гиперсекрецией ЕРО [34, 166]. Ввиду того, что у больных с умеренным гемолизом в структуре урологической патологии встречались хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь, солитарные кисты, нарушение фильтрационной функции почек (вероятно, вследствие атеросклеротического поражения почечных артерий) и отсутствовали заболевания почек с повреждением кортикального слоя, можно предположить, что повышенное содержание ЕРО в плазме крови у этой категории лиц было обусловлено почечной патологией.

Тем не менее, остается непонятной природа нормальной продукции ЕРО при сердечной недостаточности у больных ИБС с выраженным гемолизом, что дает основания предполагать у них наличие, наряду с гипоксией, также факторов, ингибирующих синтез ЕРО. На роль таковых претендует избыток $\text{TNF-}\alpha$, который через активацию нуклеарного фактора kB (NF-kB) угнетает продукцию ЕРО [318, 350, 363]. Как провоспалительный цитокин $\text{TNF-}\alpha$ участвует в патогенезе атеросклероза у больных ИБС и образуется ишемизированными кардиомиоцитами при СН [14, 31, 124]. Между тем, в системном кровотоке его уровень не всегда изменяется, повышаясь только со II стадии СН и нарастая по мере снижения насосной функции сердца [32].

Анализ концентрации TNF- α в крови у кардиохирургических больных показал ее повышение у пациентов с умеренным гемолизом и нормальное содержание цитокина у больных с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.3). Последнее, безусловно, не может являться причиной сдерживания гиперпродукции ЕРО в условиях гипоксии. В послеоперационном периоде сывороточный уровень TNF- α повышался вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (см. табл. П.3), отражая, вероятно, феномен системной воспалительной реакции, индуцированной операционной травмой, активацией системы комплемента при взаимодействии с аппаратом ИК, ишемией/реперфузией тканей, транслокацией эндотоксинов через ишемизированную стенку кишечника [134, 267, 279, 341, 374, 403].

Следовательно, несмотря на сопоставимые характеристики течения основного заболевания и наличие хронических воспалительных заболеваний у больных обеих групп (см. табл. П.1), уровень TNF- α (как и ЕРО) в плазме крови до операции был повышенным у больных с умеренным гемолизом и нормальным у пациентов с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.3). Возможно, причина этих отличий кроется в особенностях дооперационного лечения больных ИБС.

Анализируя спектр применяемых препаратов у кардиохирургических пациентов в дооперационном периоде, можно заключить, что отдельные группы лекарственных средств у обследованных лиц применялись одинаково часто (см. табл. П.2). Однако в структуре медикаментозного лечения в пределах групп среди ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента имелись различия: эналаприл чаще использовался у больных с умеренным гемолизом, фозиноприл – у пациентов с выраженной гемоглобинемией, к тому же у последних чаще применялся метопролол (β_1 -адреноблокатор, см. табл. П.2).

Метопролол обладает более сильным отрицательным инотропным эффектом в сравнении с бисопрололом, его предпочтительное использование у больных с выраженным гемолизом, вероятно, объясняется несколько меньшей (чем у больных с умеренной гемоглобинемией) фракцией выброса левого желудочка (см. табл. П.1). Однако данные о непосредственном влиянии метопролола на синтез ЕРО в литературе отсутствуют, а в настоящем исследовании его

влияние на выраженность гемоглобинемии оказалось крайне низким: согласно результатам дисперсионного анализа, при распределении пациентов на три группы – не принимавших препарат, принимавших его в низкой и высокой дозе – доля межгрупповой дисперсии гемоглобинемии в общей дисперсии выборки составила 2,38% при $p = 0,59$.

Для ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента характерна противовоспалительная активность, описана их способность подавлять синтез ЕРО в ткани почек и пролиферацию эритрокариоцитов в костном мозге (в норме индуцируется непосредственным связыванием ангиотензина II с одноименным рецептором) [241, 393]. Учитывая данное обстоятельство и то, что фозиноприл, в отличие от эналаприла, является липофильным веществом и лучше проникает в клетки организма, обладая большей эффективностью [121], противовоспалительное и ЕРО-ингибирующее действие у него, вероятно, также выражено в наибольшей степени. Кроме того, по результатам дисперсионного анализа установлено высоковероятное влияние фозиноприла на выраженность постперфузионного гемолиза у обследованных пациентов (доля межгрупповой дисперсии гемоглобинемии в общей дисперсии выборки составляет 11,15% при $p = 0,06$).

Таким образом, особенности дооперационного лечения и характер сопутствующей патологии у кардиохирургических больных, по-видимому, определяли различный уровень цитокинов в плазме крови. На фоне ИБС и СН у больных с умеренным гемолизом отмечалось повышение содержания $\text{TNF-}\alpha$ и ЕРО в крови (возможно, вследствие патологии почек). У больных ИБС с выраженной гемоглобинемией при СН, сочетанной с патологией легких, регистрировался нормальный уровень медиаторов, вероятно, из-за приема более эффективного ингибитора ангиотензин-превращающего фермента – фозиноприла.

Подобный дисбаланс цитокинов, способных регулировать эритропоэз, не мог не отразиться на эритропоэтической функции костного мозга. Последняя до операции у больных ИБС была усиленной (согласно содержанию ретикулоцитов в крови), что закономерно на фоне повышенного гемолиза и проявлялось в большей степени у лиц с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.3). У больных

с умеренным гемолизом индукция эритропоэза происходила на фоне высокого уровня ЕРО, способного стимулировать пролиферацию и дифференцировку эритрокариоцитов, а также на фоне избытка TNF- α , обладающего неоднозначным действием на эритропоэз.

Известно, что рецепторы для ЕРО появляются на клетках эритроидного ряда со стадии зрелой бурстообразующей единицы эритроцитов и максимально экспрессированы на колониеобразующей единице эритроцитов и эритроблестах; на базофильных нормоблестах их численность прогрессивно снижается (полихроматофильные нормобласты уже нечувствительны к ЕРО) [97, 264, 356]. При этом для реализации пролиферативного эффекта ЕРО необходимо обязательное взаимодействие эритрокариоцитов с костномозговыми макрофагами, которые индуцируют вступление клеток в митоз путем стимуляции экспрессии на их поверхности рецепторов к эфрин-2, костномозговому морфогенетическому протеину 4 (участвует в стресс-эритропоэзе) и к фактору стволовых клеток, активирующему тирозиновую киназу c-Kit в эритрокариоцитах [20, 277]. ЕРО влияет на численность красных клеток крови преимущественно путем ингибирования апоптоза эритроидных предшественников, поскольку показано, что даже в условиях избытка ЕРО пролиферативный ответ эритрокариоцитов снижается в случае нарушения функции костномозговых макрофагов [34, 166, 356].

Влияние TNF- α на эритропоэз зависит от типа гемопоэтических клеток и условий среды [363, 396]. На ранних стадиях созревания эритроидных прекурсоров, еще нечувствительных к ЕРО, цитокин оказывает стимулирующее действие за счет активации NF- κ B, на поздних стадиях – угнетающее влияние, которое может реализовываться как через ограничение пролиферации эритропоэтин-зависимых клеток (в норме это преимущественный механизм), так и через индукцию апоптоза таковых посредством активации ряда каспаз [20, 30, 356, 396]. При этом TNF-рецептор типа 1 (TNF-RI) экспрессируется на ранних предшественниках эритропоэза, TNF-RII – на всех этапах дифференцировки эритрокариоцитов вместе с рецептором TNF-sf13, обеспечивающим выживание пронормобластов и потенцирующим эффект ЕРО [410]. Экспериментально доказано, что в присутствии ЕРО эритрокариоциты приобретают резистентность к проапоптотическому действию TNF- α [350].

Резюмируя изложенное выше, можно предположить, что у больных ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом в условиях избытка TNF- α до операции увеличивается количество олигопотентных гемопоэтических клеток, а негативное влияние этого цитокина в последующем на уровне коммитированных предшественников уравнивается позитивным эффектом избытка ЕРО, что в итоге приводит к компенсаторному увеличению численности клеток красного ростка и нормализации их количества в крови на фоне дооперационного гемолиза. У пациентов с выраженной гемоглобинемией содержание обоих цитокинов в крови до операции определяется в пределах нормальных значений и, видимо, не компенсирует убыли эритроцитов, обусловленной дооперационным гемолизом. Данная точка зрения подтверждается бóльшим дооперационным содержанием эритроцитов в крови у больных с умеренным гемолизом (чем у лиц с выраженной гемоглобинемией) (см. табл. П.15). При этом повышенное содержание ретикулоцитов в крови у них можно объяснить профицитом TNF- α и ЕРО, а у пациентов с выраженным гемолизом – иными механизмами.

Кроме данных цитокинов среди позитивных многолинейных регуляторов эритропоэза значатся фактор стволовых клеток (фактор Стила), IL-3, IL-6, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; среди однолинейных – бурстопромоторная активность, простагландин Е2, андрогены, тиреоидные гормоны и др. При этом конечный гемопоэтический ответ определяется кооперацией факторов дистантной и локальной регуляции кроветворения в пределах гемопоэзиндуцирующего микроокружения [20, 30, 96, 314, 364]. Учитывая более редкую встречаемость заболеваний предстательной и щитовидной желез у больных с выраженной гемоглобинемией (относительно пациентов группы сравнения, см. табл. П.1), нельзя предполагать компенсирующее участие андрогенов и тиреоидных гормонов в активации эритропоэза у этой категории лиц.

Показано, что IL-6 даже в отсутствие гипоксии и ЕРО способен непосредственно индуцировать пролиферацию олигопотентных предшественников эритропоэза [282]. Следует отметить, что у больных ИБС с выраженным гемолизом регистрировались косвенные признаки гиперпродукции этого цитокина в дооперационном пе-

риоде – повышенное содержание фибриногена и гаптоглобина в плазме крови (см. табл. П.3, П.5), что в условиях нормального содержания TNF- α у этой категории лиц могло быть обусловлено избытком IL-6 как основного индуктора синтеза белков острой фазы. Синтез фибриногена и гаптоглобина находится под контролем собственно IL-6, в то время как IL-1 β и TNF- α практически не влияют на продукцию этих белков, способствуя преимущественно гиперсекреции СРБ [160]. Кроме того, по данным литературы, IL-6 является доминирующим среди провоспалительных цитокинов у больных хронической обструктивной болезнью легких [298], которые составляли более 30% среди пациентов с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.1). Ранее нами было показано, что популяция кардиохирургических больных с ИБС неоднородна по цитокиновому профилю плазмы крови: часть пациентов имеет избыток TNF- α , а часть из них – избыток IL-6 [75]. Поэтому не исключено, что дооперационная гиперсекреция IL-6 у больных с выраженным гемолизом лежит в основе поддержания ЕРО-независимой активации красного ростка кроветворения. Последняя также может быть обусловлена принципом отрицательной обратной связи, в результате которой значительная активация эритропоэза у больных с выраженным гемолизом является следствием резко повышенного разрушения эритроцитов до операции.

В классических экспериментах было показано, что введение животным предгемолитических форм эритроцитов усиливает пролиферацию эритроидных клеток в костном мозге и не сопровождается увеличением концентрации ЕРО в сыворотке крови, но при ингибировании функции макрофагов эффект исчезает [72]. Неэритропоэтиновый механизм индукции эритропоэза, достигается модуляцией архитектоники эритробластических островков в костном мозге, численность которых возрастает как неспецифическая реакция на стресс, обусловленная активацией моноцитопозза, усилением функции макрофагов и ускоренным выходом эритрокариоцитов из структуры островков [20, 119]. Кроме того, ФЭА и ФХ, которые содержатся в составе фрагментов мембран разрушенных эритроцитов, способны стимулировать стволовые клетки к пролиферации, активировать макрофаги и увеличивать образование очагов кроветворения [74]. Вероятно, у больных ИБС, подверженных

хроническому стрессу в силу характера заболевания, усиление гемолиза до операции может поддерживать регенерацию красного ростка на высоком уровне даже при подавлении эритропоэтинового ответа на гипоксию, что и отмечается у пациентов с выраженной гемоглобинемией. При этом данная компенсаторная реакция стабилизирует количественные показатели красной крови на периферии, но качество образованных клеток изменяется.

В настоящем исследовании было показано, что у больных ИБС с выраженным гемолизом (в отличие от пациентов с умеренной гемоглобинемией) клетки красной крови до операции характеризуются нерезко повышенным соотношением ХС/ФЛ в мембране, нормальным фосфолипидным спектром цитолеммы (по долям фракций), нормальной активностью Na^+/K^+ - и Ca^{2+} -АТФаз в ней при нормальной экспрессии гликофоринов А и В, что характерно для молодой популяции эритроцитов. Между тем, в этих клетках отмечается недостаточность каталазы, Г-6-ФДГ, АТФ, и вероятно нарушение структурной организации цитоскелета при сниженной экспрессии CD55 и высокой проницаемости мембраны. Однако в литературе описано, что молодые формы эритроцитов обладают повышенной деформируемостью, экспрессией антигенных детерминант и активностью ферментов, включая антиоксидантные и гликолитические энзимы [69, 74, 158].

Логично предположить, что эритроциты у больных ИБС с выраженным гемолизом неполноценны уже до операции, но структурная организация мембраны, имеющей универсальное строение во всех клетках организма, не страдает. Дефект затрагивает преимущественно внутриклеточный метаболизм, который у эритроцитов сильно отличается от других клеток и формируется на поздних стадиях эритропоэза, находящихся под контролем ЕРО.

Связывание ЕРО с его рецептором на эритрокариоцитах инициирует гомодимеризацию ассоциированной с рецептором киназы Jak2, которая фосфорилирует молекулу рецептора по восьми остаткам тирозина, саму себя и цитозольный фактор транскрипции STAT5, проникающий в ядро для усиления экспрессии антиапоптотического гена *Bcl-XL*. Одновременно при взаимодействии фосфорилированных остатков тирозина с белком p85 активируется PI3-киназа, которая через активацию фактора транскрипции АКТ фосфорилирует ядерный

транскрипционный фактор GATA-1 [177, 364]. Последний интенсивно экспрессируется во всех эритроидных клетках, поскольку функциональный GATA-связывающий ДНК мотив присутствует в регуляторных областях практически всех эритроид-специфичных генов и прежде всего ферментов синтеза гемоглобина [284].

В этом аспекте важно отметить, что для трансдукции сигнала с ЕРО-рецептора необходимо взаимодействие ряда белков с геранил-геранил-пирофосфатом, образующимся при метаболизме мевалоната, синтезируемого с участием 3-гидрокси-3-метилглутарил-КоА-редуктазы [229]. Поэтому статины, как специфические ингибиторы этого фермента, блокируют передачу активационного сигнала с ЕРО-рецепторов [230, 253]. Несмотря на то что больные ИБС с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом принимали статины одинаково часто и в равной дозе (см. табл. П.2), у последней категории лиц, видимо, это имело важное патогенетическое значение в формировании неполноценных эритроцитов, поскольку сочеталось с нормальным уровнем ЕРО в плазме крови, в то время как в другой группе – с повышенным (см. табл. П.3). Кроме того, у больных с выраженной гемоглобинемией отсутствие избытка ЕРО опосредовалось предположительно высоким содержанием в плазме крови IL-6, который через STAT3 ингибирует трансдукцию сигнала с ЕРО-рецепторов, детерминируя резистентность эритрокариоцитов к ЕРО [243, 406].

Показано, что образование основной части эритроцитарных белков происходит на этапе дифференцировки ЕРО-зависимых кроветворных клеток. Синтез субъединиц спектрина, актина и аддуцина наиболее активно протекает в малодифференцированных клетках (пронормобластах и базофильных нормобластах), но фиксация спекtrin-актиновой сети к внутренней поверхности мембраны эритроцитов происходит благодаря белкам полос 3 и 4.1, которые синтезируются на этапе более зрелых клеток – полихроматофильных и оксифильных нормобластов [109, 178, 287]. Интенсивная продукция ферментов гликолиза фосфофруктокиназы и пируваткиназы также начинается со стадии эритробласта и характеризуется чередованием экспрессии нескольких форм изоферментов на различных стадиях созревания эритрокариоцитов [250]. Экспрессия гликофорина А на клетках эритроидного ряда происходит на поздних стадиях эритропоэза, в

то время как CD55 синтезируется на стадии эритробластов [223, 224, 287], что, возможно, и объясняет нормальную экспрессию гликофорина А при пониженном экспонировании CD55 на эритроцитах у больных с выраженным гемолизом.

В связи с этим становится очевидно, что продукция эритроцитарных белков преимущественно происходит на ЕРО-зависимых этапах эритропоэза и является залогом функциональной полноценности эритроцитов. При этом высокие концентрации ЕРО вызывают укорочение фаз клеточного цикла G_0/G_1 с целью ускорения пролиферации эритрокариоцитов, что влечет за собой сокращение времени синтеза компонентов дочерних клеток [96, 97, 356], но при физиологическом ответе на гипоксию, очевидно, компенсируется активацией метаболических процессов под влиянием высоких доз ЕРО. Если же активация эритропоэза достигается неэритропоэтиновыми механизмами, что характерно для больных ИБС с выраженным гемолизом, то интенсивная пролиферация клеток при нормальном содержании ЕРО формирует его относительный дефицит и, как следствие, недостаточное образование белков будущих эритроцитов. При этом у больных, проявляющих умеренный гемолиз при ИК, избыток ЕРО в крови до операции сочетается с профicitsом TNF- α , который увеличивает продолжительность клеточного цикла эритрокариоцитов и, соответственно, время синтеза эритроцитарных белков [187].

Согласно изложенному, TNF- α может оказывать позитивное действие на эритропоэз путем усиления пролиферации олигопотентных эритроидных предшественников, поддержания выживаемости эритрокариоцитов (при высоком содержании ЕРО) и удлинения их клеточного цикла на поздних этапах кроветворения, что обеспечивает пролонгированные биосинтетические процессы в клетках. Поэтому в настоящем исследовании нами была зарегистрирована отрицательная взаимосвязь ($r = -0,38$; $p < 0,05$) уровня TNF- α в крови до операции с выраженностью гемоглобинемии в послеоперационном периоде. Более того, содержание TNF- α в крови оказалось одним из двух показателей, которые позволили уже до операции распределить кардиохирургических больных на пациентов с умеренным и выраженным гемолизом (по результатам кластерного анализа, см. табл. П.14, рис. 8, а).

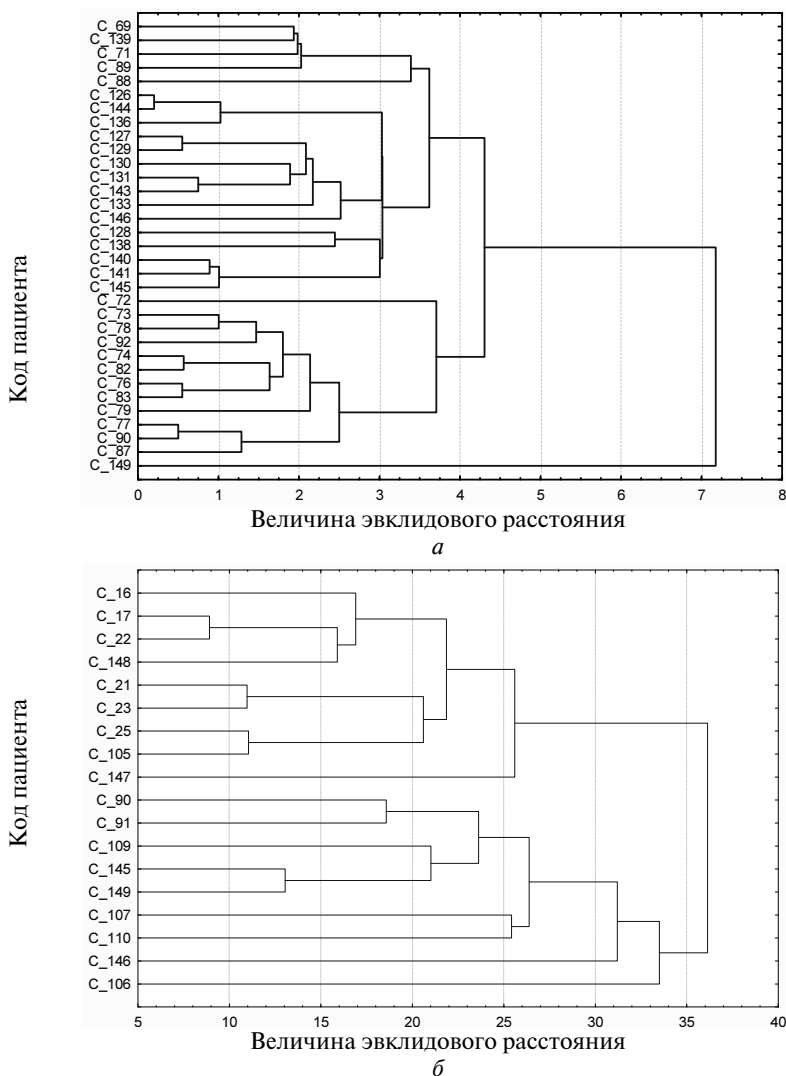


Рис. 8. Дендрограмма кластеризации больных ишемической болезнью сердца в зависимости от концентрации фактора некроза опухолей α в крови (а), индекса ригидности эритроцитов (б) до операции и выраженности внутрисосудистого гемолиза после операции в условиях искусственного кровообращения

Вторым параметром оказался индекс ригидности эритроцитов (см. табл. П.14, рис. 8, б), что позволяет предполагать определяющую роль $\text{TNF-}\alpha$ в механизмах формирования цитоскелета, процессы сборки которого продолжаются в эритроидных клетках вплоть до стадии ретикулоцитов и требуют времени [109, 178, 287]. При этом чувствительность к EPO эритрокариоциты утрачивают гораздо раньше момента энуклеации, что наряду с применением у больных ИБС до операции статинов, ингибирующих трансдукцию сигнала с EPO -рецептора, может объяснять отсутствие взаимосвязи между выраженностью постперфузионного гемолиза и концентрацией этого цитокина до операции.

В послеоперационном периоде наличие какого-либо влияния $\text{TNF-}\alpha$ на модуляцию структурно-метаболического статуса клеток красной крови и вариабельность гемоглобинемии у кардиохирургических больных маловероятно, поскольку его высокая концентрация в этот период не отличалась у обследованных пациентов сравниваемых групп (см. табл. П.3). Эритропоэтические эффекты $\text{TNF-}\alpha$ и EPO на данном этапе также были незначимыми в патогенезе гемолиза, так как не успевали реализоваться в силу короткого промежутка времени с начала операции. Однако действие этих цитокинов может определять элиминацию костномозгового пула молодых форм эритроцитов и зрелых депонированных клеток. Показано, что EPO вызывает сокращение адвентициальных клеток, покрывающих большую часть стенки венозных синусов, а также увеличение в ней числа и диаметра пор, что облегчает миграцию клеток красной крови [137, 287].

Ввиду того, что даже после операции у больных ИБС с выраженной гемоглобинемией содержание EPO в крови оставалось меньшим, чем при умеренном гемолизе, на фоне равной интраоперационной оксигенации крови (в среднем за операцию, см. табл. П.4) нельзя исключить дисфункцию кислородного сенсора юкстагломерулярного аппарата почек или процессов биосинтеза гормона в интерстициальных клетках. Так, эксперименты на клеточных линиях показали возможность эпигеномной регуляции экспрессии гена EPO , которая угнетается при гиперметилировании HIF -связывающего сайта в структуре гена, к тому же феномен гиперметилирования некоторых генов подтверждается клиническими исследованиями при различных патологиях [176]. Механизм гипо-

ергии ЕРО-ответа на гипоксию может также быть результатом наследственно обусловленной аномалии регуляции синтеза или экскреции ЕРО почками у больных ИБС. При этом генетически детерминированные свойства эритроцитов в основном связывают со спектром антигенных детерминант, составляющих различные фенотипы групп крови, среди которых наиболее значимыми являются АВ0- и резус-системы.

6.2. Связь АВ0- и резус-фенотипа эритроцитов с интенсивностью гемолиза при искусственном кровообращении

В настоящее время известно более 300 поверхностных эритроцитарных антигенов, которые формируют 29 систем групп крови [190]. Наиболее часто в клинической практике используется фенотипирование эритроцитов по АВ0 и резус-антигенам, из которых наибольшее внимание уделяется D-антигену из-за высокой его иммуногенности.

Предшественником антигенов А и В, входящих в систему АВ0, является антиген Н. Детерминанты А, В и Н имеют олигосахаридную природу и входят в состав гликолипидов, экспрессированных на мембране эритроцитов, или гликопротеинов, находящихся в тканевых жидкостях и секретах организма (слюна, слизи кишечника) [84]. Гены *a* и *b*, входящие в локус АВ0, расположенный на 9-й хромосоме, кодируют А- и В-гликозилтрансферазы, присоединяющие к фукулизированному остатку галактозы Н-антигена N-ацетилгалактозамин с образованием антигена А или остаток галактозы с образованием антигена В. Аллель 0 кодирует белок, не обладающий гликозилтрансферазной активностью, и поэтому у лиц с генотипом 0/0 на эритроцитах экспрессирован только антиген Н, а в секретах лиц с группой крови 0 (I) обнаруживается только вещество Н [122].

В системе Резус, кроме антигена D, выделяют еще несколько антигенных детерминант, среди которых наиболее трансфузионно опасные (по частоте встречаемости антител к данным антигенам эритроцитов) формируют шкалу иммуногенности: D > E > c > Cw > e > C [26]. Резус-фенотип эритроцитов кодируется двумя генами, локализованными в коротком плече 1-й хромосомы, – *RHD* и *RHCE*, первый

из которых определяет наличие или отсутствие D-антигена (аллели *RHD* и *RHd*), а второй детерминирует C, c, E и e антигены (его аллели *RHCE*, *RHce*, *RHcE* и *RHce*) [114]. Rh-белки взаимодействуют с липидным бислоем путем присоединения ацильного радикала остатков пальмитиновой кислоты, расположенных возле боковых цепей цистеина, которые находятся на границе цитозоля и липидного бислоя [388]. При этом N.D. Avent и M.E. Reid (2000) показали, что первые 45 аминокислот N-терминального участка молекулы антигена D и антигенов C, E, e являются идентичными, и белок антигена D отличается от антигенов C и E только 35 аминокислотами [144]. Несмотря на высокую степень соответствия, различные белки RhCcEe не экспрессируют антигенные детерминанты D, как и белок RhD не экспрессирует антигены C или e.

Верификация антигенов АВ0 на эритроцитах³³ у кардиохирургических больных обнаружила, что статистически значимых различий по частоте встречаемости этих структур и фенотипов системы АВ0 между пациентами с умеренным и выраженным гемолизом не отмечалось. Однако обращало на себя внимание отчетливое преобладание 0-фенотипа эритроцитов в группе больных с умеренным гемолизом и более частая встречаемость экспрессии В-антигена на клетках у лиц с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.16; рис. 9).

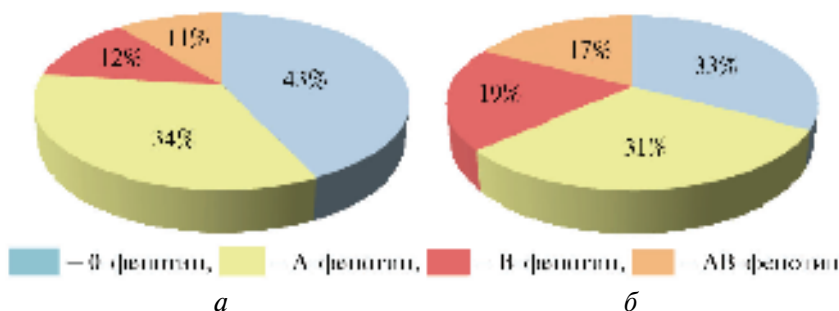


Рис. 9. Частота встречаемости фенотипов системы АВ0 эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца с умеренным (а) и выраженным (б) гемолизом после операции в условиях искусственного кровообращения

³³ АВ0-фенотип эритроцитов регистрировали по данным клинических карт пациентов.

По данным литературы, среди больных атеросклерозом и другой сосудистой патологией группа крови АВ (IV) обнаруживается чаще, а группа 0 (I) – реже, чем у здоровых доноров [118]. Кроме того, если у пациентов присутствует хотя бы один 0-аллель, то риск развития инфаркта миокарда снижается на 39%, но увеличивается втрое при наличии В-аллеля [398]. Данное обстоятельство (наряду с полученными результатами) позволяет рассматривать пациентов с выраженным гемолизом как лиц генетически более подверженных развитию ИБС по сравнению с больными с умеренной гемоглобинемией. Возможно, эритроциты этих пациентов обладают более низкой газотранспортной функцией и гемолитической стойкостью, что ассоциировано с АВ0-фенотипом клеток.

Известно, что полисахаридные антигены, которыми являются в том числе А-, В- и Н-молекулы, участвуют в образовании гликокаликса, препятствующего агглютинации эритроцитов за счет формирования отрицательного заряда на их поверхности [189]. При этом количество Н-молекул на клетках красной крови зависит от экспрессии А- и В-антигенов и убывает в последовательности $0 > A_2 > B > A_2B > A_1 > A_1B$ [114]. Вероятно, именно Н-антиген придает эритроцитам максимальный поверхностный отрицательный заряд, благотворно влияющий на реологические характеристики крови. Показано, что клетки с 0-фенотипом характеризуются низкой агрегируемостью и малым средним объемом, клетки В-фенотипа имеют обратные характеристики, в то время как АВ-эритроциты быстро разрушаются при хранении [101]. К тому же у лиц с ненулевыми группами крови интенсивность ПОЛ в клеточных мембранах выше, а электрофоретическая подвижность эритроцитов ниже, чем у доноров с 0(I)-группой крови [54]. Поэтому вполне возможно, что отсутствие Н-антигена (или наличие В-антигена) снижает резистентность этих клеток к ИК.

Анализ частоты встречаемости антигенов и неполных фенотипов эритроцитов системы Резус³⁴ обнаружил у больных с выражен-

³⁴ Резус-фенотип эритроцитов определяли по экспрессии D-, C-, c-, E-, e-антигенов системы Резус на эритроцитах в реакции прямой гемагглютинации на плоскости с применением коммерческих цоликлонов соответственно анти-D, анти-C, анти-c, анти-E, анти-e Супер (ООО «Гематолог», Москва).

ным гемолизом превалирование *сс*-фенотипа при более редкой встречаемости *С*-антигена по сравнению с пациентами с умеренным постперфузионным гемолизом (см. табл. П.17). Это означает, что *С*-антиген обладает протективным влиянием на гемолитическую стойкость эритроцитов, а его отсутствие на мембране (*сс*-фенотип) предрасполагает к постперфузионному гемолизу. Последнее подтверждается статистически значимым коэффициентом ассоциации данного признака с высокой интенсивностью гемолиза после ИК ($r_a = 0,44$; $p < 0,05$).

В крупном популяционном исследовании с участием более 8000 доноров и около 700 больных атеросклерозом было показано, что при данной патологии *ссDee* и *ссDEe* Резус-фенотипы эритроцитов обнаруживаются чаще, чем в норме [118]. Частая встречаемость *сс*-фенотипа эритроцитов при атеросклерозе в целом, и в частности у больных ИБС с выраженным гемолизом (см. табл. П.17), может быть связана с потенцирующими гипоксию свойствами этих клеток, поскольку обнаружено, что эритроциты доноров с Резус-фенотипом *ссDee* характеризуются пониженной вязкостью гликокаликса и большим объемом эритроцитов относительно носителей *С*-антигена [12]. Вероятно, данное обстоятельство ухудшает микрореологические свойства этих клеток, а низкая плотность гликокаликса делает мембрану эритроцитов более доступной для влияния агрессивных факторов (протеиназ и антител). Протеиназы могут изменять прочность связи компонентов мембраны с цитоскелетом и тем самым влиять на деформируемость клеток [189]. В условиях ИК, когда ламинарный ток крови часто переходит в турбулентный, обогащаясь большим количеством продуктов распада и секреции клеток [341, 394], вышеназванные особенности эритроцитов с *сс*-фенотипом, вероятно, оказываются значимыми и способствуют выраженной деструкции клеток.

Таким образом, в ходе проведенных исследований у кардиохирургических больных становится очевидным, что характер антигенных детерминант эритроцитов в комплексе с особенностями их микрореологических и метаболических свойств до операции определяет гемолитическую стойкость клеток к факторам экстракорпоральной перфузии, предрасполагая к развитию гемолиза, патогенез которого различен при умеренной или выраженной степени деструкции клеток.

Глава 7

ПАТОГЕНЕЗ ПОСТПЕРФУЗИОННОГО ГЕМОЛИЗА РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ВЫРАЖЕННОСТИ И КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ВЫРАЖЕННОЙ ГЕМОГЛОБИНЕМИИ

7.1. Механизмы умеренного и выраженного гемолиза при операциях в условиях искусственного кровообращения

В результате исследований, проведенных в рамках обсуждаемой проблемы, на основании корреляционного, дисперсионного и кластерного анализа стало возможным выделить основополагающие факторы в механизмах развития постперфузионной гемоглобинемии и сформировать две схемы ее патогенеза (рис. 10, 11). Развитие умеренного внутрисосудистого гемолиза у больных ИБС после ИК ассоциировано с сочетанной патологией почек до операции, что сопровождается повышением содержания TNF- α и ЕРО в крови в этот период (рис. 10). Первый цитокин удлиняет клеточный цикл эритрокариоцитов и способствует сборке цитоскелета, второй – обеспечивает активный синтез эритроцитарных белков, в результате чего образуются полноценные эритроциты с нормальной деформируемостью, содержанием АТФ, активностью Г-6-ФДГ, каталазы и экспрессией CD55, обуславливающей нормальную проницаемость мембраны при повышенной активности ПОЛ и резко увеличенном соотношении ХС/ФЛ в мембране клеток красной крови. Последнее, снижая механическую резистентность эритроцитов, вероятно, является основной причиной деструкции клеток в крупных сосудах кровеносного русла и причиной несколько повышенного гемолиза у больных ИБС до операции. Однако усиленный эритродиализ уравнивается сбалансированной активацией эритропоэза в костном мозге, который протекает на фоне повышенного содержания ЕРО, обеспечивающего не только адекватный синтез эритроцитарных белков, но и ингибирующего физиологический эриптоз, что в итоге

детерминирует поддержание числа эритроцитов в пределах несколько повышенных значений (превышают таковые у больных с выраженным гемолизом) (рис. 10).

Проведение ИК, как известно, сопровождается артериальной гипероксией и контактом крови с чужеродными поверхностями, что у больных с умеренным гемолизом не приводит к интраоперационной интенсификации ПОЛ в эритроцитах ввиду исходно нормальной активности Г-6-ФДГ и каталазы в клетках, но вызывает мощную активацию системы комплемента, очевидно, вследствие избыточного предсуществующего содержания в крови факторов классического пути (активируется при нейтрализации гепарина протамином сульфата) (рис. 10). Комплемент-зависимый лизис эритроцитов является основным патогенетическим фактором умеренного гемолиза и опосредует повышение неспецифической проницаемости мембраны эритроцитов для низкомолекулярных веществ, которая способствует поступлению Na^+ и Ca^{2+} в клетку. Низкая активность Na^+/K^+ -АТФазы предрасполагает к осмотическому лизису эритроцитов, однако это компенсируется уменьшением объема клеток в результате функционирования $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов, которые длительное время остаются открытыми по причине низкой активности Ca^{2+} -АТФазы. Последнее осуществляется благодаря поддержанию невысокой концентрации Ca^{2+} в клетке из-за резко повышенного уровня ЕРО в плазме крови, блокирующего неселективные катионные каналы эритроцитов. К тому же протективное действие на величину объема клетки оказывает С-антиген системы Резус. При этом микрореологические свойства красных клеток крови не нарушены, но нефизиологические сдвиговые нагрузки в пределах аппарата ИК индуцируют механическую травму эритроцитов с низкой механической резистентностью (рис. 10).

Формированию выраженного постперфузионного гемолиза у больных ИБС предшествует сопутствующая патология легких, назначение фозиноприла (обладает противовоспалительным и ЕРО-ингибирующим эффектом) и, возможно, избыток IL-6, что на фоне атеросклероза и СН сочетается с нормальным содержанием TNF- α и ЕРО в крови до операции (рис. 11). В таком случае усиление гемолитических процессов при патологии компенсируется интенсивной пролиферацией эритрокариоцитов под влиянием продуктов распада

клеток, однако это не сопровождается должным усилением синтеза эритроцитарных белков и пролонгированной сборкой цитоскелета, в результате чего вновь образованные эритроциты оказываются неполноценными и характеризуются низкой деформируемостью, дефицитом АТФ, Г-6-ФДГ, каталазы и CD55-молекул. Последнее становится причиной гиперактивации системы комплемента преимущественно по альтернативному пути уже в дооперационном периоде, что при не слишком высоком соотношении ХС/ФЛ в мембране приводит к увеличению ее проницаемости на данном этапе. Дефектные по многим параметрам эритроциты быстро разрушаются в крови еще до проведения ИК, поддерживая напряженное состояние эритропоэза, которое, тем не менее, слабо компенсирует убыль эритроцитов и проявляется на фоне активации эритропоэза нормальным содержанием таковых в крови (но менее аналогичной величины у больных с умеренным гемолизом) (см. рис. 11).

Во время операции у кардиохирургических больных с выраженным постперфузионным гемолизом по причине исходно низкой экспрессии CD55 на эритроцитах активация системы комплемента при ИК нарастает (см. рис. 11), но ввиду предсуществующего дефицита факторов альтернативного пути активации комплемента оказывается на уровне таковой у пациентов с умеренной гемоглобинемией (рис. 10, 11). При этом на первый план в патогенезе выраженного гемолиза выступает интраоперационная активация ПОЛ в эритроцитах, в которых при ятрогенной гипероксемии усугубляется недостаточность Г-6-ФДГ и каталазы. Данное обстоятельство способствует поступлению Ca^{2+} в клетку, благодаря как непосредственной активации неспецифических катионных каналов в мембране эритроцитов, так и простагландин- E_2 -опосредованной их индукции под действием фосфолипазы A_2 , осуществляющей дегградацию ФХ с образованием лФХ. Последнее обстоятельство, как и чрезмерный избыток внутриклеточного Ca^{2+} , стремительно усиливает исходно нормальную (из-за ретикулоцитоза) активность Ca^{2+} -АТФазы, которая элиминирует Ca^{2+} из клетки, способствуя преждевременному закрыванию $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов. При этом ингибирующее влияние ЕРО на уровень внутриклеточного Ca^{2+} практически отсутствует вследствие слабовыраженного увеличения содержания цитокина в крови после операции. В результате объем клетки уменьшается

незначительно, что усугубляется редокс-опосредованным ингибированием Na^+/K^+ -АТФазы в присутствии исходно низкого количества АТФ в клетке. Неблагоприятное действие на регуляцию клеточного объема на данном этапе оказывает сс-фенотип системы Резус. При этом микрореологические свойства эритроцитов изначально нарушены и наряду с потенцированием ПОЛ обуславливают основной вклад в лизис клеток на уровне микроциркуляторного русла пациента и в пределах аппарата ИК, где гемолиз усугубляется механической травмой эритроцитов с интраоперационно пониженной механической резистентностью (см. рис. 11).

Вполне очевидно, что развитие массивного внутрисосудистого гемолиза во время ИК может негативно повлиять на реабилитацию пациента в послеоперационном периоде, индуцируя формирование разнообразных гемолиз-опосредованных осложнений, угрожающих жизни больного, и пролонгируя его пребывание в стационаре.

7.2. Дисфункция систем органов у кардиохирургических больных при массивном интраоперационном гемолизе

Показано, что в ряде случаев (при интраоперационном переливании больших объемов аллогенной эритромаcсы, при операциях в условиях глубокой гипотермии и у больных с гемолитическими анемиями) выраженность постперфузионного гемолиза может возраcтать до 1000 мг/дл и более [25, 395, 407]. Нарастая в первые минуты ИК, концентрация свободного гемоглобина в плазме крови уже через 30 мин повышается в 5 раз от исходного [25, 395]. При этом повышение уровня гемоглобинемии более 20–30 мг/дл (при разрушении около 5 мл эритроцитов) сопровождается видимым изменением цвета плазмы, более 40–60 мг/дл (при гемолизе 5–10 мл эритроцитов) – возникновением желтухи через 6–12 ч после начала гемолиза, а cвыше 200 мг/дл – поступлением свободного гемоглобина в мочу и окрашиванием ее в красно-бурый цвет (гемоглобинурия) [29]. Однако, по данным И.И. Дементьевой и соавт. (2008), почечный порог для свободного гемоглобина во время ИК может существенно снижаться (до 50 мг/дл) на фоне гипоксии почек [25], обуславливая сочетанное повреждение этих органов даже при интраоперационном гемолизе невысокой интенсивности [191, 228].

Наиболее уязвимым органом при развитии постперфузионного гемолиза являются почки [191, 228]. В условиях ИК избыточное поступление в почечные каналцы свободного гемоглобина, не связанного с гаптоглобином, первоначально уравнивается его интенсивной реабсорбцией. В перегруженных гемоглобином эпителиоцитах это вещество метаболизируется, в результате чего образуется свободное железо, которое наряду с железом гема индуцирует генерацию АФК в почечном эпителии (взаимодействует с эндогенным пероксидом водорода) и вызывает его свободнорадикальное повреждение, преимущественно в проксимальных канальцах [265, 395]. Если количество поступившего в канальцевый аппарат гемоглобина превышает реабсорбционные возможности эпителиоцитов, то в условиях кислой среды мочи данный белок преципитирует в просвете канальцев, вызывая их обструкцию [228]. При этом точным предиктором почечной дисфункции в послеоперационном периоде служат пиковые концентрации свободного гемоглобина в плазме крови в процессе ИК, в то время как гемоглобин в моче еще даже не определяется [306, 395].

Универсальным механизмом развития органной дисфункции любой локализации, в том числе и почечной, является нарушение микроциркуляции, в чем свободный гемоглобин принимает непосредственное участие. Освобождаясь из эритроцитов, гемоглобин взаимодействует с эндогенным вазодилатирующим фактором – монооксидом азота (NO). Дезоксигемоглобин связывается с NO обратимо, образуя нитрозилгемоглобин, а оксигемоглобин – необратимо с образованием нитрата и метгемоглобина [355, 359, 395]. Последний обладает высоким сродством к кислороду, что наряду с вазоконстрикцией усугубляет интраоперационную гипоксию в тканях, вызванную гемодилюцией, кровопотерей, гемолизом и централизацией кровообращения [395]. Кроме того, внутрисосудистый гемолиз сопровождается высвобождением из эритроцитов аргиназы-1, превращающей L-аргинин (предшественник NO) в L-орнитин, что, теоретически, должно редуцировать образование NO. Однако на практике данный механизм не оказывает существенного влияния на интраоперационную вариабельность уровня NO [255, 391].

Снижая биодоступность NO, свободный гемоглобин индуцирует ишемическое повреждение органов. Установлено, что концентрация

свободного гемоглобина в плазме крови более 10 мг/дл может ингибировать вазодилатацию *in vivo* [246]. Поэтому клинические последствия высокой гемоглобинемии, помимо нарушений гемокоагуляции, включают в себя и дистонии, вовлекающие в патогенез гемолитических расстройств сердечно-сосудистую, дыхательную, пищеварительную, мочевыделительную и половую системы [359].

Экспериментально было показано, что свободный гемоглобин вызывает дозозависимое увеличение систолического и диастолического кровяного давления (купируется введением нитропрусида натрия), а также приводит к сужению легочных сосудов вплоть до развития легочной артериальной гипертензии [192, 201]. Также имеются сведения о способности свободного гемоглобина непосредственно угнетать сократительную функцию левого желудочка у кроликов [394], индуцировать абдоминальные боли, дисфагии, судороги пищевода, интенсивность которых зависит от уровня гемоглобинемии и NO в крови [359]. Внутривенное введение раствора свободного гемоглобина крысам вызывает нарушение микроциркуляции как в тонком, так и в толстом кишечнике, что проявлялось увеличением содержания интестинального липид-связывающего протеина (маркер повреждения энтероцитов подвздошной кишки) в крови и было подтверждено гистологически [232]. Кроме того, имеются сведения о развитии эректильной дисфункции у мужчин на фоне внутрисосудистого гемолиза вследствие пароксизмальной ночной гемоглобинурии [359].

Несмотря на плеiotропное влияние гемоглобинемии на организм кардиохирургических пациентов, самым грозным осложнением постперфузионного гемолиза может стать развитие синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови и полиорганной недостаточности [97]. В присутствии высоких концентраций свободного гемоглобина тромбоциты усиливают свои агрегационные свойства и адгезивность к протромботическим поверхностям, коими являются поврежденная сосудистая стенка и неэндотелизированная поверхность аппарата ИК. Этот эффект также обусловлен гемоглобин-зависимой редукцией пула эндогенного NO, который в норме опосредует дезагрегацию агрегированных тромбоцитов и угнетает их адгезию посредством увеличения концентрации циклического гуанозинмонофосфата в клетках [54, 255, 359]. Кроме

того, сообщается о способности свободного гемоглобина взаимодействовать с серотониновыми рецепторами тромбоцитов и гладкомышечных клеток микрососудов, что приводит к агрегации кровяных пластинок и спазму сосудов микроциркуляторного русла [41].

Наряду с этим, склонность к тромбообразованию усугубляется активацией коагуляционного звена гемостаза. По данным Z. Zhou и соавт. (2009), свободный гемоглобин способен ингибировать специфические протеазы, разрушающие фактор Виллебранда, оказывая прокоагулянтное и проагрегантное действие [421]. В то же время стромы разрушенных эритроцитов активируют коагуляционный гемостаз по внешнему пути и выступают в роли фосфолипидных матриц для взаимодействия факторов свертывания крови [29]. Установлено, что формирование дефицита NO вследствие его связывания со свободным гемоглобином обуславливает недостаточное ингибирование фибринстабилизирующего фактора, что повышает прокоагулянтный потенциал крови, но оказывает противоположный эффект, увеличивая содержание в крови продуктов деградации фибрина и антитромбин-тромбинового комплекса [359, 369]. Между тем, именно дисбаланс в системе гемостаза лежит в основе диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. Клиническим подтверждением важной роли гемоглобинемии в активации гемостаза служат частые тромботические осложнения у больных микросфероцитозом, серповидно-клеточной анемией, талассемией, пароксизмальной ночной гемоглобинурией [97, 255].

Следует подчеркнуть, что подобные тяжелые расстройства различных систем органов у кардиохирургических больных после операций с ИК встречаются редко и только в случае массивного гемолиза. Тем не менее, не исключено, что формирование выраженной гемоглобинемии также оказывает неблагоприятное влияние на клинический статус пациентов, увеличивая сроки их госпитализации.

7.3. Особенности течения послеоперационного периода у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом после искусственного кровообращения

С целью определения клинической значимости вариабельности гемоглобинемии после операций с ИК в нашем исследовании была

проведена сравнительная оценка послеоперационного клинического статуса больных ИБС с умеренным и выраженным гемолизом, учитывающая особенности терапевтической тактики во время экстракорпоральной перфузии и после нее. Длительность нахождения пациентов в палате интенсивной терапии не отличалась между группами оперированных лиц, при этом период госпитализации оказался несколько более продолжительным у больных с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.18), демонстрируя ее негативное влияние.

Среди применяемых препаратов в интра- и послеоперационном периодах пентамин в большей дозе использовался у лиц с умеренным гемолизом, а нитроглицерин несколько чаще у больных с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.18, П.19). Выявленное различие в способах коррекции периферического кровотока, по-видимому, связано с исходной неоднородностью больных ИБС и особенностями препаратов. Пентамин, как ганглиоблокатор, обладает долгосрочным гипотензивным эффектом, нитроглицерин – кратковременным, и поэтому, очевидно, более предпочтителен у пациентов с выраженным гемолизом, имеющих до операции несколько меньшую фракцию выброса левого желудочка, чем у больных с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.1).

Важно отметить, что различия в медикаментозной поддержке пациентов двух групп исследования во время операции были зарегистрированы только в отношении пентамина, этамзилата и суксаметония (см. табл. П.19). Однако, согласно результатам дисперсионного анализа, препараты не оказывали достоверного влияния на степень выраженности постперфузионной гемоглобинемии (доля межгрупповой дисперсии гемоглобинемии в общей дисперсии выборки составила соответственно: 7,49% ($p = 0,56$); 5,14% ($p = 0,36$); 6,65% ($p = 0,27$). В связи с этим более частое применение миорелаксантов суксаметония во время операции и пипекурония после ИК у больных с выраженным гемолизом (в отличие от пациентов с умеренной гемоглобинемией) можно рассматривать как следствие высокой гемоглобинемии, а не ее причину. Известно, что свободный гемоглобин способен связывать молекулы NO, опосредующие миорелаксацию, что при массивной деструкции эритроцитов может приводить к гипертензии по большому и малому кругу кровообра-

щения [246, 355, 395], а также вовлекать другие системы органов в патогенез гемолитических расстройств [359]. Последнее, возможно, обуславливало более частое использование наркотических анальгетиков после операции у больных с выраженным гемолизом (см. табл. П.19). Не исключено, что сложные механизмы формирования боли потенцировались спастическим компонентом и требовали эффективной обезболивающей терапии.

Интерпретация вышеизложенных отличий медикаментозной поддержки пациентов в интра- и послеоперационном периодах носит преимущественно гипотетический характер, в то время как особенности течения послеоперационного периода имеют убедительные доказательства влияния гемолиза на этот процесс.

Степень тяжести анемии у больных с умеренным гемолизом после операции классифицировалась как легкая, а при выраженной гемоглобинемии – как средняя (концентрация гемоглобина 66–100 г/л) (см. табл. П.15). Препараты донорской эритроцитарной массы в послеоперационном периоде использовались чаще у больных с выраженной гемоглобинемией (см. табл. П.18). Это может быть связано с интраоперационным гемолизом, так как увеличение концентрации свободного гемоглобина в крови до 25 мг/дл соответствует разрушению 5 мл эритроцитов [29]. Следовательно, зафиксированный нами средний уровень гемоглобинемии у больных с выраженным гемолизом (около 56 мг/дл, см. табл. П.3) соответствует лизису примерно 10 мл эритроцитов, что адекватно потере 30 мл крови (принимая во внимание степень гемодилюции, см. табл. П.3). Однако утрата эритроцитов, очевидно, была больше, так как в исследовании регистрировали величину постперфузионной гемоглобинемии, а гемолиз продолжался в течение всего периода ИК при параллельном участии механизмов утилизации свободного гемоглобина. Значимость процессов деструкции эритроцитов в развитии послеоперационной анемии подтверждается отрицательной корреляцией их количества в крови после операции с уровнем свободного гемоглобина в этот период ($r = -0,47$; $p < 0,05$). Показано, что 15% эритроцитов, получивших во время ИК сублетальные повреждения, разрушаются в течение первых суток после операции [394].

Тем не менее, маловероятно, что гемолиз мог оказать самостоятельное влияние на тактику трансфузионной терапии, которая, ско-

рее всего, была обусловлена большей интраоперационной кровопотерей из-за длительного ИК (см. табл. П.4) и меньшим содержанием эритроцитов в крови до операции (см. табл. П.15) у больных с выраженным гемолизом по сравнению с другой группой больных. Следовательно, не столько гемолиз, сколько совокупность трех факторов (гемолиз, кровопотеря и предсуществующее невысокое содержание эритроцитов в крови) обуславливают высокую потребность в донорской крови у пациентов с выраженной гемоглобинемией, при этом два из трех факторов определяются исходной дисфункцией периферического звена эритрона до операции.

В ходе оценки показателей функционального состояния почек было отмечено, что у больных с выраженным гемолизом суточный диурез на 2-е сут после операции (когда отменялись диуретики) оказался несколько меньше, чем в группе сравнения (см. табл. П.18), а в общей группе больных он отрицательно коррелировал с концентрацией свободного гемоглобина в крови после ИК ($r = -0,34$; $p < 0,05$). Кроме того, протеинурия у больных с выраженным гемолизом встречалась достоверно чаще по сравнению с пациентами другой группы (и в несколько большей степени) при сопоставимом содержании лейкоцитов в моче (см. табл. П.18), что исключает фактор воспаления мочевыводящих путей и свидетельствует в пользу повреждения структур нефронов, очевидно, продуктами распада свободного гемоглобина. Фильтрация последнего в почках предотвращается взаимодействием его с гаптоглобином, концентрация которого в плазме крови после ИК у больных с выраженным гемолизом соответствовала таковой при умеренной гемоглобинемии на фоне более чем двукратного превышения уровня гемоглобинемии (см. табл. П.3), а значит, свободный гемоглобин фильтровался беспрепятственно. Факт равного содержания фракций прямого и непрямого билирубина в плазме крови после операции у больных обеих групп исследования (см. табл. П.18) также указывает на элиминацию свободного гемоглобина из организма пациентов с выраженным гемолизом (т.е. через почки), минуя его естественный метаболизм в РЭС. Этому способствовала тактика форсированного диуреза, традиционно применяемая для вторичной профилактики гемоглобинемии [29, 191], что подтверждалось несколько большим диурезом во время операции у больных с вы-

раженной гемоглобинемией (см. табл. П.4). Следовательно, активная элиминация свободного гемоглобина из крови способствует его накоплению в эпителиоцитах канальцев, где Fe^{2+} гема индуцирует генерацию АФК и альтерацию канальцевого эпителия, за счет отека которого, видимо, объем суточного диуреза после операции снижается (см. табл. П.4, П.19).

Индукцированное гемоглобинемией свободнорадикальное повреждение тканей при образовании серозно-геморрагического экссудата в области операционной раны на фоне аккумуляции жидкости в организме, по всей видимости, также лежит в основе избыточного накопления плеврального экссудата, количество которого после операции у больных с выраженным гемолизом почти в 2 раза превышало таковое у лиц с умеренной гемоглобинемией (см. табл. П.18). Убедительным доказательством причастности постперфузионного гемолиза к этим процессам служит высокодостоверная положительная корреляция объема плеврального экссудата с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после операции ($r = 0,45$; $p < 0,01$). Образование экссудата в плевральной полости, как известно, ограничивает экскурсию легких и при чрезмерном накоплении (более 500 мл) может привести к острой дыхательной недостаточности, что особенно важно для больных с выраженным гемолизом, 33% из которых еще в дооперационном периоде страдали заболеваниями легких (см. табл. П.1).

Учитывая данные литературы о широком спектре органных расстройств при массивном гемолизе после операций с ИК и собственные данные о существенных изменениях в послеоперационном периоде у больных с выраженной гемоглобинемией, не превышающей 100 мг/дл, а также принимая во внимание важную роль внутрисосудистого гемолиза в механизмах реализации осложнений и высокую их значимость в реабилитации пациентов, актуальной проблемой современной перфузиологии и кардиохирургии является поиск возможностей прогнозирования и коррекции постперфузионных гемолитических реакций.

Глава 8

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ И КОРРЕКЦИИ ИНТРАОПЕРАЦИОННОГО ГЕМОЛИЗА В КАРДИОХИРУРГИИ

8.1. Унифицированный подход в дооперационной профилактике внутрисосудистого гемолиза путем подбора перфузиологического оборудования

В ходе развития индустрии экстракорпоральных технологий было разработано и апробировано множество модификаций аппаратов ИК и их отдельных компонентов – насосов, оксигенаторов, перфузионных магистралей, коронарных отсосов, фильтров и т.д. Поэтому, принимая во внимание недостатки и преимущества отдельных элементов системы экстракорпорального кровообращения, можно предвидеть степень интраоперационной гемоглобинемии и, таким образом, влиять на выраженность гемолиза [394]. Подобный подход может быть применен в отношении каждого пациента, с учетом стремления кардиохирургических клиник использовать наиболее биосовместимое оборудование.

На сегодняшний день в кардиохирургии применяются в основном насосы роликового и центрифужного типов. Показано, что роликовые насосы полного сдавления вызывают больший гемолиз, чем насосы с неполной окклюзией [231, 394]. Характер потока крови (пульсирующий или не пульсирующий) не влияет на степень выраженности гемолиза [254]. По мнению G. Nasso и соавт. наиболее предпочтительным является использование центрифужных насосов, обладающих минимальным травмирующим влиянием на клетки крови [322]. Однако в некоторых исследованиях продемонстрировано отсутствие явных преимуществ последних перед роликовыми конструкциями [231, 394]. Сравнительная характеристика центрифужных насосов различных фирм-производителей обнаружила меньший гемолитический эффект у Rota-flow (Jostra, Германия) и

Cobe Revolution (Cobe Cardiovascular, Inc., США) в сравнении с Medtronic Biomedicus (Medtronic, Inc., США) [276]. Кроме того, недавно был разработан насос турбинного типа с низким гемолитическим и тромботическим эффектами [159].

Как известно, пузырьковые оксигенаторы, в отличие от мембранных, вызывают массивный гемолиз. Среди современных мембранных оксигенаторов D-703, -705, -902 и -905 (Dideco, Италия), Gish Vision (GISH Biomedical, Inc., США), Baxter (Baxter, США), Quadrox (Jostra, Германия), Hility (Medos, Германия) и Spiral Gold (Bentley, США) максимальным деструктивным влиянием на эритроциты обладают D-902, D-703 и Baxter, а минимальным – Quadrox и Hility [24, 25]. Эксплуатация оксигенаторов с относительно низким (Quadrox BE-НМО 2000, Jostra, Германия) и высоким (Cariox SX18, Terumo Cardiovascular Systems Corporation, США) гидравлическим сопротивлением демонстрирует равный уровень гемоглобинемии [372]. При этом уровень сдвиговой деформации в современных оксигенаторах обычно не достигает гемолитического порога и порога сублетальных повреждений клеток красной крови, что обеспечивает почти нулевое влияние данного компонента ИК на степень постперфузионного гемолиза. Считается, что уровень гемоглобинемии можно снизить, применяя оксигенаторы с гепариновым покрытием. В непокрытых системах этого можно добиться путем предварительной обработки устройств альбумином [394].

Свойства поверхности магистралей экстракорпорального контура также определяют выраженность гемолиза. Изучение биосовместимости полимерных материалов показывает, что сильным гемолитическим эффектом обладают гидрированный и винилпиридин-бутадиеновый каучуки, тефлон и полиэтилен, незначительным – силикон и стекло [85]. В кардиохирургии использование перфузионных магистралей из латекса ассоциировано с высокой степенью гемолиза, а из силастика, поливинилхлорида и силикона – с низкой. При этом гепариновое покрытие поливинилхлоридных трубок усиливает гемоглобинемию в сравнении с таковыми без покрытия [233]. Имеются противоречивые данные о влиянии биосовместимых покрытий аппарата ИК на гемолитическую стойкость эритроцитов: по одним данным, протективный эффект отмечается [205, 394], по другим – нет [233].

Гладкие и гидрофобные перфузионные магистрали, выполненные из биосовместимых материалов и обеспечивающие линейную скорость кровотока не более 100 см/с, вызывают минимальную травму клеток крови [394]. Для снижения выраженности интраоперационного гемолиза в аортальных канюлях (самых узких сегментах экстракорпорального контура) давление капли не должно превышать 100 мм рт. ст., а в венозных дренажах присасывающее давление должно быть ниже атмосферного не менее чем на 40 мм рт. ст. [183]. При этом альтерация эритроцитов несколько выше при использовании вакуумного типа дренажной системы в сравнении с классической гравитационной [157].

Известно, что самой травматичной частью аппарата ИК является коронарный отсос, а степень гемолиза зависит от скорости его работы и количества аспирированного воздуха [407]. В связи с этим минимизировать повреждение клеток крови в коронарном отсосе можно, применяя широкие трубки, предотвращая поступление воздуха в катетер и его окклюзию тканями операционной раны. В последние годы разработаны автоматизированные дренажные системы с датчиком, регистрирующим количество излившейся в операционную рану крови и темп ее поступления (так называемые «интеллектуальные» отсосы). Применение подобных систем позволяет снизить концентрацию свободного гемоглобина в кровотоке на 20% по сравнению с традиционным коронарным отсосом [394, 407].

Считается, что выраженность гемолиза может значительно увеличиться при интраоперационной трансфузии больших объемов донорской эритромаcсы, в условиях глубокой гипотермии, а также несколько возрасти вследствие аппаратной отмывки дренажной крови. Увеличение длительности ИК как фактора, включающего в себя комплекс гемолиз-индуцирующих воздействий различных компонентов аппарата, сопровождается линейным ростом концентрации свободного гемоглобина в плазме крови со средней скоростью 15–20 мг/(дл · ч) [25, 395, 407].

Таким образом, информация о технических характеристиках модулей аппарата ИК и вычисление динамических показателей потока крови служат основанием для комплектации наименее травматичной перфузионной системы. Однако подобный подход не дает желаемого решения проблемы. Существуют дополнительные фак-

торы, потенцирующие гемолиз, которые не зависят от вида оборудования и методики ИК: тяжелая сопутствующая патология, продолжительная операция или выраженная кровопотеря, обуславливающая проведение многочисленных гемотрансфузий и сепарации излившейся в рану крови [25, 215, 412]. В этих условиях возникает необходимость удаления из кровотока большого количества свободного гемоглобина и предотвращение развития гемолитических осложнений у ряда пациентов.

8.2. Индивидуальный подход к терапии и вторичной профилактике гемолитических осложнений после операций с искусственным кровообращением

С целью редукции гемоглобинемии в настоящее время разработаны способы экстракорпоральной и эндогенной очистки крови от свободного гемоглобина. К таковым относятся традиционные для кардиохирургии методы гемофильтрации и форсирования диуреза во время ИК [25, 234]. Последний представляет собой обязательный элемент общепринятой программы лечения посттрансфузионных гемолитических осложнений, основные принципы которой могут быть применимы и для кардиохирургических больных с массивным гемолизом. Если консервативные меры оказываются недостаточными, то рекомендуется проводить обменный плазмаферез как наиболее эффективный способ элиминации свободного гемоглобина из кровотока [29]. Вместе с тем, переливание больших количеств донорской плазмы создает высокий риск заражения гемотрансмиссивными инфекциями. Поэтому более предпочтительным в условиях ИК является проведение селективной экстракорпоральной очистки крови путем быстропоточной гемофильтрации с использованием крупнопористых фильтров (до 100 кДа), так как обычные гемофильтры имеют диаметр пор 20–50 кДа, что позволяет удалять лишь димеры гемоглобина (около 32 кДа), а не собственно гемоглобин (около 68 кДа) [217, 329].

Значимая реверсия гемоглобинемии также достигается путем центрифужной или аппаратной (с помощью Cell Saver) отмывки крови [329]. При этом последняя не влияет на свойства циркулирующих эритроцитов после переливания отмывтых клеток, хотя перед инфузией

осмотическая стойкость и деформируемость отмытых эритроцитов несколько снижается, особенно при выполнении многократной центрифужной отмывки [25, 225]. По мнению некоторых авторов, реинфузия сильно поврежденных клеток крови или необработанной аутокрови с массивным гемолизом нежелательна [320, 394].

Современный фармакологический подход в лечении гемолитических осложнений после ИК включает в себя несколько направлений медикаментозного воздействия. Достаточно давно изучается метод стимуляции эндогенных механизмов очищения организма от свободного гемоглобина путем введения рекомбинантного гаптоглобина, который связывает свободный гемоглобин, препятствуя фильтрации в мочу и обеспечивая его утилизацию в клетках РЭС [351, 395]. При этом терапевтическое введение гаптоглобина должно учитывать количество этого белка в крови, а также свободного гемоглобина и клиренс креатинина во время ИК [217, 394].

На роль лечебных препаратов при гемолитических осложнениях также претендуют доноры NO, предназначенные, с одной стороны, для восполнения дефицита эндогенного NO, с которым связывается свободный гемоглобин, а с другой – для конверсии последнего в метгемоглобин, не взаимодействующий с NO [394, 395]. Показано, что применение ингаляционного NO снижает гемоглобинемию и легочную гипертензию у больных с гемолитическими анемиями, а также у пациентов, оперированных с использованием ИК [333, 334, 355, 405]. Между тем, короткое время полужизни NO *in vivo* (0,05–1,80 мс) ограничивает эффективность ингаляционного NO пределами легочной ткани [395]. Этот недостаток устраняется с помощью применения «длительно живущих» нитритов (нитрита натрия), выступающих в роли источника нитрит-аниона (NO_2^-), который рассматривался ранее как инертный продукт окисления NO, но, как оказалось, способен превращаться обратно в NO [290, 370]. Благодаря этому нитриты опосредуют экстрапульмональные эффекты ингаляционного NO, который обладает меньшими побочными эффектами, чем препараты NO, вводимые внутривенно [333, 334, 395]. Управление биодоступностью NO также возможно путем применения аргинина (предшественник NO) и цитрулина (предшественник аргинина), однако эффективность подобной терапии еще изучается [289, 309].

Недавно опубликованы экспериментальные данные о позитивном влиянии очень низких концентраций ингаляционного CO, способного имитировать некоторые эффекты NO (регуляцию сосудистого тонуса, угнетение активации и агрегации тромбоцитов, воспалительного ответа) и неспособного, в отличие от NO, реагировать с активными формами кислорода и образовывать высоко реактивный пероксинитрит (ONOO) [395]. Другая попытка влиять на гипертензивный эффект дефицита NO при гемоглобинемии была предпринята N. Sabaа и соавт. (2008), введившими мышам растворимые рецепторы для эндотелина-1 [360], секреция которого в норме подавляется NO. Однако в клинических исследованиях эффективность как первого, так и второго экспериментального способа коррекции последствий гемолиза еще не доказана [395].

Помимо доноров NO, терапия осложнений внутрисосудистого гемолиза может осуществляться с помощью хелаторов железа (рекомбинантного человеческого трансферрина и лактоферрина у новорожденных, дефероксамина у взрослых), которые позволяют избежать перегрузки организма железом, участвующим в патогенезе дисфункции почек при ИК [191]. Для предотвращения внутриканальцевой коагуляции свободного гемоглобина в условиях кислой реакции мочи и профилактики острой почечной недостаточности рекомендуется проводить инфузии бикарбоната натрия, опосредующего защелачивание мочи [227, 228]. Замечено, что применение некоторых препаратов (статинов, пентоксифилина, полиэтиленгликоля с молекулярным весом 20 кДа, мелатонина) способно повышать гемолитическую стойкость эритроцитов [394].

Таким образом, спектр терапевтических подходов для коррекции последствий постперфузионного гемолиза достаточно широк, однако каждый из методов имеет ряд ограничений и его выбор зависит от особенностей физического статуса пациента, что создает определенные трудности в терапии гемолитических расстройств после операций с ИК.

8.3. Современные проблемы коррекции постперфузионной гемоглобинемии

Несмотря на прогресс современной перфузиологии и кардиохирургии, проблема интраоперационного разрушения эритроцитов

во время ИК до сих пор остается открытой, что обусловлено недостатками существующих методик коррекции гемоглобинемии. Так, проведение гемофильтрации снижает уровень гемоглобинемии, но сопровождается удалением из кровотока биологически активных субстанций, необходимых для поддержания гомеостаза организма (ионов, глюкозы, аминокислот, альбумина, гуморальных факторов иммунитета и др.), и создает дополнительную травму клеток крови [185]. Форсированный диурез активно выводит свободный гемоглобин из плазмы крови, но ускоряет его поступление в почки, где при высокой концентрации этого белка возможна его преципитация и Fe-зависимое повреждение эпителия почечных канальцев, способствующее развитию острой почечной недостаточности [228]. К тому же противопоказанием к проведению форсированного диуреза является снижение фильтрационной способности почек и почечная недостаточность у пациента до хирургического вмешательства [65, 108].

Использование рекомбинантного гаптоглобина, связывающего свободный гемоглобин, представляет собой достаточно дорогостоящее лечение и, кроме того, не повышает биодоступность NO (комплекс «гемоглобин – гаптоглобин» связывает NO так же, как и свободный гемоглобин) [145, 395]. Другой способ лечения гемолиза nitroхyл-донорами или подобными соединениями переводит свободный оксигемоглобин в свободный метгемоглобин, который хотя и не взаимодействует с NO, но обладает высоким сродством к кислороду. Кроме того, процесс окисления гемоглобина сопровождается генерацией АФК, что способствует свободнорадикальному повреждению органов пациента [179, 370]. По данным К. Кауа и соавт. (2007), применение нитропруссид натрия в качестве донора NO для лечения последствий гемолиза вызывает образование цианида, токсические эффекты которого сочетают энцефалопатию, гипотензию и метаболический ацидоз [257].

Следует заметить, что негативное влияние внутрисосудистого гемолиза на организм человека не ограничивается только эффектами свободного гемоглобина. Циркулируя в крови, фрагменты клеточных мембран и внутриэритроцитарный аденозиндифосфат активируют систему гемостаза [54, 97]; избыток калия и лактата, высвобожденных при гемолизе, существенным образом нарушает

электролитный и кислотно-основной баланс крови [338]. Приходится констатировать, что большинство способов коррекции внутрисосудистого гемолиза направлены лишь на устранение свободного гемоглобина или его эффектов и не способны элиминировать фрагменты эритроцитарной плазмолеммы и внутриклеточные компоненты эритроцитов из крови (за исключением плазмафереза или отмывания клеток крови).

Таким образом, современная система коррекции гемолиза после операций с ИК включает в себя единые принципы его профилактики и индивидуализированную терапию, но лишена персонализированного подхода к дооперационному прогнозированию и модуляции гемолитических реакций. Методы терапии уже сформировавшейся гемоглобинемии не позволяют полностью нивелировать последствия внутрисосудистого гемолиза. Возникает необходимость комбинации нескольких терапевтических подходов, направленных на различные звенья патогенетической цепи развития гемолитических осложнений и защиту отдельных органов. В целом это повышает фармакологическую нагрузку на организм пациента, благодаря чему коррекция интраоперационного гемолиза становится комплексной и достаточно сложной. Поэтому наиболее предпочтительна первичная профилактика массивной гемоглобинемии, которая может достигаться путем заблаговременного (не менее чем за 1 мес до операции) назначения антиоксидантов, микроэлементов, метаболических, гемореологических и других средств. Однако в этом случае возникает проблема идентификации группы риска кардиохирургических пациентов, что в дооперационном периоде возможно только при наличии эффективной системы прогнозирования выраженного гемолиза.

8.4. Способы прогнозирования выраженного гемолиза после искусственного кровообращения

Результаты проведенного в нашей лаборатории исследования показали, что степень выраженности постперфузионного гемолиза у больных ИБС во многом определяется исходным структурно-метаболическим статусом эритроцитов до операции. Данное обстоятельство позволило разработать несколько формул множественной

регрессии для количественного прогноза величины концентрации свободного гемоглобина в плазме крови у кардиохирургических больных после ИК на основе характеристик клеток красной крови в дооперационном периоде. Согласно данным регрессионного анализа, статистически значимыми оказались только две закономерности (при $p = 0,04$ и $p = 0,02$ соответственно):

$$Y = -7,57 + 0,20 \cdot X_{\text{ИК}} + 0,13 \cdot X_{\text{рО}_2}, \quad (1)$$

где Y – концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после ИК; $X_{\text{ИК}}$ – длительность искусственного кровообращения; $X_{\text{рО}_2}$ – максимальное значение парциального давления кислорода в крови во время операции.

$$\begin{aligned} Y = & 139,60 - 1,43 \cdot X_{\text{ЕРО}} - 0,44 \cdot X_{\text{ТНФ}} - \\ & - 29,20 \cdot X_{\Delta E} - 38,64 \cdot X_{V_2} - 0,90 \cdot X_{\Delta T}, \end{aligned} \quad (2)$$

где $X_{\text{ЕРО}}$ – концентрация эритропоэтина в крови; $X_{\text{ТНФ}}$ – концентрация фактора некроза опухолей α в крови; $X_{\Delta E}$ – амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов; X_{V_2} – скорость восстановления мембранного потенциала при гиперполяризационном ответе эритроцитов; $X_{\Delta T}$ – время развития максимальной величины мембранного потенциала при гиперполяризационном ответе эритроцитов (все показатели дооперационного периода).

При этом формула (1) использует только показатели перфузиологического обеспечения операции: продолжительность ИК и максимальное значение рО_2 в крови во время операции (уравнение (1)). Подобный подход не очень точно описывает зависимость гемоглобинемии от данных переменных (низкий коэффициент множественной регрессии $R = 0,44$) и позволяет прогнозировать лишь 20% фактической вариабельности этого признака (коэффициент детерминации $R^2 = 0,20$). Более того, использование формулы (1) в дооперационном периоде практически невозможно, так как до операции трудно определить длительность ИК, а тем более величину максимального значения рО_2 в крови, которое достаточно лабильно и определяется газовым составом артериальной крови пациента в каждый момент времени.

В связи с этим для прогнозирования уровня гемоглобинемии предпочтительнее использовать вторую статистически значимую формулу регрессии (уравнение (2)), включающую в себя исключительно дооперационные показатели крови больных ИБС: концентрацию ЕРО и TNF- α в крови, а также амплитуду, время развития максимальной гиперполяризации и скорость восстановления мембранного потенциала при Ca^{2+} -индуцированном ГПО эритроцитов. Данная закономерность достаточно точно описывает зависимость гемоглобинемии от вышеназванных переменных (коэффициент множественной регрессии достаточно высок $R = 0,98$) и позволяет прогнозировать 96% фактической вариабельности этого признака (коэффициент детерминации $R^2 = 0,96$). При сравнении реальных значений гемоглобинемии у кардиохирургических больных после операции с расчетными ее значениями по формуле (2) видно, что они очень близки по величине:

Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл

Значение	Код пациента							
	124	125	126	129	130	131	132	135
Фактическое	13,5	28,0	26,5	45,9	56,1	51,0	49,8	63,2
Расчетное	12,5	33,0	28,4	41,1	55,2	52,7	46,1	65,0

Между тем, важно отметить, что ввиду сильно выраженной вариативности концентраций ЕРО и TNF- α в крови даже у здоровых доноров и требований нормальности распределения для применимости регрессионного анализа, разработанная формула справедлива только в том случае, если значения ее переменных принадлежат строго определенным соответствующим доверительным интервалам. При уровне статистической значимости $p < 0,05$ доверительные интервалы составляют: (2,94; 20,14) мМЕ/мл для концентрации ЕРО в крови; (0,21; 6,80) пг/мл – для содержания TNF- α в крови; (0,11; 1,01) мВ для амплитуды Ca^{2+} -индуцированного ГПО эритроцитов; (0,49; 0,91) мэкВН+/(мин · л клеток) – для скорости восстановления мембранного потенциала при Ca^{2+} -индуцированном ГПО эритроцитов; (26,16; 60,12) с – для времени развития максимальной величины мембранного потенциала при Ca^{2+} -индуцированном ГПО эритроцитов. В случае использования величин факторных переменных, выходящих за пределы доверительного интервала, прогностическая значимость формулы может снижаться.

При всех достоинствах количественного прогноза уровня постперфузионной гемоглобинемии у кардиохирургических больных на основе дооперационных лабораторных показателей крови приходится констатировать, что методика оценки Ca^{2+} -индуцированного ГПО эритроцитов пока недоступна для клинического использования, а определение содержания ЕРО и $\text{TNF-}\alpha$ в крови требует много времени для проведения анализа (учитывая прагматичный подход лабораторий к накоплению образцов). В связи с этим возникла необходимость создания методики прогнозирования выраженности постперфузионного гемолиза, основанной на использовании показателей клинического статуса пациента, входящих в стандартную процедуру верификации диагноза. Среди таковых в дооперационном периоде, как показано выше, развитию выраженного гемолиза способствуют наличие заболеваний легких (см. табл. П.1, коэффициент ассоциации $r_a = 0,49$; $p < 0,01$), содержание эритроцитов в крови менее $4,81 \cdot 10^{12}/\text{л}$ (см. табл. П.15, $r_a = 0,38$; $p < 0,05$), гиперфибриногенемия более 4 г/л (см. табл. П.5, $r_a = 0,62$; $p < 0,001$), а препятствуют – наличие патологии почек (см. табл. П.1, $r_a = 0,39$; $p < 0,05$) и экспрессия на эритроцитах С-антигена системы Резус (см. табл. П.17, $r_a = 0,44$; $p < 0,05$). Определение последнего показателя, хотя и не проводится в повседневной клинической практике, но характеризуется простотой выполнения и низкой стоимостью, поэтому может быть внедрено в практическое здравоохранение.

Большая часть вышеназванных параметров являются качественными и не могут быть подвергнуты регрессионному анализу, в связи с чем возможно прогнозирование только на качественном уровне (выраженная/умеренная гемоглобинемия после ИК), т.е. определение принадлежности конкретного пациента к группе риска. В этом случае может быть разработана лишь эмпирическая формула, основанная на клинических наблюдениях, для создания которой мы использовали величину отношения шансов развития выраженного гемолиза по указанным факторным признакам, которая была дополнена данными о степени влияния качественного признака на выраженность постперфузионной гемоглобинемии. Последовательность математических операций позволила разработать формулу расчета величины балла, по значению которого определяется риск выраженного гемолиза после ИК, получившую название

«шкала гемолитического риска перфузии (ГРП) для клинического использования»:

$$\text{ГРП} = (6,38X_{\text{лег}} + 8,93X_{\text{ГФб}} + 3,32X_{\text{Эр}}) - (4,10X_{\text{поч}} + 2,95X_{\text{С}}), \quad (3)$$

где ГРП – величина балла гемолитического риска перфузии; $X_{\text{лег}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) болезней легких; $X_{\text{ГФб}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) гиперфибриногенемии до операции (более 4 г/л); $X_{\text{Эр}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) содержания эритроцитов в крови до операции менее $4,81 \cdot 10^{12}/\text{л}$; $X_{\text{поч}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) болезней почек; $X_{\text{С}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) на эритроцитах С-антигена системы Резус.

В основу создания шкалы ГРП были положены результаты обследования всех 150 больных ИБС, вошедших в исследование, и применимость ее затем была апробирована на 46 пациентах (25 больных с умеренным и 21 пациент с выраженным гемолизом), у которых регистрировали одновременно все показатели, используемые в уравнении (3). Полученные результаты расчета балла ГРП при графическом представлении демонстрируют достаточно четкое распределение больных ИБС на две группы с различным риском гемолиза (рис. 12). При этом расчет параметров диагностической чувствительности (85,7%), специфичности (84,0%) и эффективности (84,8%), а также предсказательной значимости положительного и отрицательного результатов (81,8 и 87,5% соответственно) прогноза выраженной гемоглобинемии по шкале ГРП позволяет получить значения этих параметров, превышающие уровень 80%, что считается достаточным для подтверждения диагностической надежности использованной системы [40].

В поддержку разработанной методики свидетельствует тот факт, что при анализе характеристик четырех пациентов, вошедших в группу «ложно положительные результаты», выяснилось, что двое из них имели самую короткую продолжительность ИК (70 и 72 мин), и если бы время перфузии у них было близким к среднему у больных ИБС (100–120 мин, см. табл. П.4), то эти пациенты вошли бы в категорию «истинно положительные результаты». В связи с этим убедительные данные исследования, подтвержденные математически, позволяют рекомендовать разработанную шкалу ГРП к применению в клинической практике.

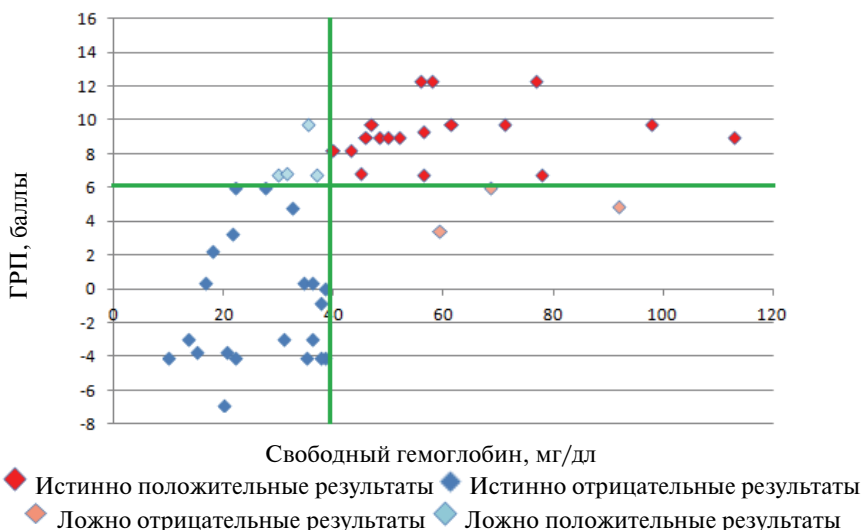


Рис. 12. Распределение балла гемолитического риска перфузии у кардиохирургических пациентов в зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза

В целом разработанные способы прогнозирования постперфузионной гемоглобинемии у кардиохирургических больных впервые позволяют предвидеть степень ее выраженности, учитывая индивидуальные особенности пациента, не страдающего сопутствующей патологией гематологического профиля, что существенно расширяет возможности современных методов коррекции гемолитических осложнений, идентифицируя группу риска пациентов, требующих проведения первичной профилактики гемолиза в дооперационном периоде.

По итогам разработки вышеописанных способов прогнозирования постперфузионного гемолиза после кардиохирургических операций оформлено два патента: «Способ прогнозирования степени риска гемолитических осложнений после операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения» (№ 2542434 приоритет от 13.12.2013) и «Способ прогнозирования умеренного и выраженного гемолиза после операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения» (№ 2552925 приоритет от 13.12.2013).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на прогресс экстракорпоральных технологий, инициация внутрисосудистого гемолиза у кардиохирургических больных во время операций с искусственным кровообращением является неизбежным компонентом постперфузионных реакций организма при хирургических вмешательствах на остановленном сердце. Между тем, степень выраженности гемоглобинемии после операции сильно варьирует, что до сих пор связывали с особенностями экстракорпорального контура и условиями перфузии или с наличием сопутствующих заболеваний гематологического профиля у кардиохирургических больных. В результате проведенных исследований мы показали, что вариабельность постперфузионной гемоглобинемии также характерна и для пациентов, не страдающих заболеваниями системы крови, оперированных с применением идентичных перфузионных систем примерно в равных условиях. Так, при операции коронарного шунтирования в условиях ИК выраженный гемолиз (концентрация свободного гемоглобина в крови 40 мг/дл и более) встречается в 35% случаев.

До настоящего времени предположение о зависимости гемоглобинемии от структурно-функционального статуса эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца на момент хирургического вмешательства не имело четкого научного обоснования. Ввиду многообразия характеристик эритроцитов, определяющих поведение клеток в кровотоке, идентификация приоритетных механизмов гемолиза оставалась затруднительной. Нами было показано, что в основе патогенеза выраженной гемоглобинемии лежит интраоперационное усиление процессов липопероксидации в эритроцитах в результате дооперационного дефицита внутриклеточных ферментов (преимущественно глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы), что опосредует нарушение фосфолипидного спектра эритроцитарной мембраны

во время ИК при нарастании холестерол-фосфолипидного соотношения. Исходно повышенная проницаемость мембраны усугубляется незначительным уменьшением объема эритроцита вследствие интраоперационного снижения проводимости $K^+(Ca^{2+})$ -каналов из-за недостаточной продукции эритропоэтина во время ИК и потенцируется угнетением активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны на фоне предсуществующего дефицита АТФ. Для умеренной гемоглобинемии, напротив, ведущим патогенетическим фактором служит комплемент-зависимый лизис эритроцитов, сочетающийся с повышенным содержанием факторов классического пути комплемента в крови до операции и увеличением проницаемости мембраны клеток во время перфузии. При этом лизис эритроцитов сдерживается значительным уменьшением их объема благодаря нарастающей концентрации эритропоэтина в крови после ИК и исходно повышенной проводимости $K^+(Ca^{2+})$ -каналов мембраны эритроцитов.

Следует отметить, что некоторые параметры (окислительно-антиокислительный баланс плазмы, экспрессия CD35-молекул, гликофоринов А и В на эритроцитах, состояние лектинового пути активации комплемента) не являются значимыми в патогенезе выраженного гемолиза. Наряду с этим, дефицит CD55⁺ эритроцитов в крови у больных ИБС с выраженным гемолизом хотя и сочетается с гиперактивацией альтернативного пути комплемента до операции, но не способствует инициации такового во время перфузии, так как определяет дооперационное истощение его факторов.

Известно, что в ходе экстракорпоральной перфузии эритроциты испытывают воздействие экстремальной сдвиговой деформации и гипотермии, гипероксии и цитодеструктивной атаки системы комплемента. При этом подверженность эритроцитов интенсивному разрушению во время ИК зависит, вероятно, от их исходных характеристик. На основании дисперсионного анализа было обосновано, что наиболее значимыми предрасполагающими факторами выраженной постперфузионной гемоглобинемии у больных ИБС являются низкая деформируемость эритроцитов и гиперфибриногенемия, сопряженная до операции с гиперагрегируемостью эритроцитов, а также предсуществующее повышение проницаемости мембраны эритроцитов и отсутствие характерного для атерогенеза увеличения концентрации TNF- α в крови, которые играют не-

сколько меньшую роль. При этом снижение механической резистентности эритроцитов до операции предопределяет лишь интенсивность умеренного гемолиза (концентрация свободного гемоглобина в крови менее 40 мг/дл).

Не вызывает сомнения, что предрасположенность эритроцитов к массивной деструкции у больных с патологией красной крови детерминирована патогенезом соответствующего заболевания. Среди пациентов, не страдающих болезнями системы крови, подобная связь не очевидна. Тем не менее, в настоящем исследовании мы показали, что первопричина различной гемолитической стойкости эритроцитов к факторам ИК кроется в нарушении регуляции процессов эритропоэза и эритродиереза до операции. Формирование выраженной гемоглобинемии обусловлено глубоким дооперационным дисбалансом гомеостаза эритроцитов, образующихся в условиях гиперактивации эритропоэза при нормальном уровне эритропоэтина и $\text{TNF-}\alpha$ в крови. Данное обстоятельство опосредует неполноценность молодой популяции эритроцитов до операции, которая характеризуется низкой деформируемостью клеток, дефицитом внутриклеточных ферментов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и каталазы), АТФ и поверхностных CD55-молекул при повышенной проницаемости мембраны. При этом у больных ИБС с умеренным гемолизом данные параметры в дооперационном периоде не изменяются в связи с гиперпродукцией эритропоэтина и $\text{TNF-}\alpha$ при незначительной интенсификации эритропоэза, что в условиях атерогенеза сочетается с реструктуризацией липидного бислоя мембраны эритроцитов, угнетением трансмембранного активного транспорта ионов и снижением механической резистентности клеток.

Определение механизмов, лежащих в основе выраженного гемолиза, позволяет существенно расширить возможности первичной профилактики гемолитических осложнений. Итоги настоящего исследования теоретически обосновывают эффективность применения с этой целью кровезаменителей на основе низкомолекулярных гидроксиэтиленкрахмалов и растворов альбумина (но не полиглюкина), α -токоферола, глутатиона и других антиоксидантов, а также рекомбинантного эритропоэтина в виде однократной дооперационной инфузии с целью нормализации механизмов регуляции объема эритроцитов во время ИК или в форме курсового применения

эритропоэтина до операции в сочетании с обязательным назначением микроэлементов. Последний подход целесообразно применять у больных ИБС с дисрегуляцией эритропоэза: ретикулоцитоз на фоне нормального содержания эритропоэтина в крови при формировании неполноценных эритроцитов с низкой деформируемостью и недостаточностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Несмотря на то что арсенал средств, способных потенциально уменьшить выраженность интраоперационного гемолиза, всегда находился в распоряжении перфузиологов и кардиохирургов, выбрать патогенетически обоснованный подход и определить группу больных ИБС с высоким риском гемолитических осложнений до настоящего времени не представлялось возможным. Благодаря использованию методов статистического анализа нами разработаны два способа прогнозирования выраженной гемоглобинемии, учитывающие структурно-метаболические свойства эритроцитов и клинический статус пациента до операции. В частности показано, что сс-фенотип эритроцитов по системе Резус, наличие заболеваний легких, гиперфибриногенемия и содержание эритроцитов в крови менее $4,81 \cdot 10^{12}/л$ у больных ИБС до операции предрасполагают к развитию выраженной гемоглобинемии, а предсуществующая патология почек и наличие С-антигена системы Резус на эритроцитах – к умеренному гемолизу. При этом величина гемоглобинемии после ИК может быть предсказана на основании концентрации эритропоэтина и $TNF-\alpha$ в крови до операции и параметров Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов в этот период.

Таким образом, результаты настоящего исследования позволили ответить на многие вопросы и задали направление для дальнейшего изучения механизмов гибели эритроцитов при кардиохирургических вмешательствах на остановленном сердце. Полученные данные обосновывают необходимость проведения углубленных исследований как для выяснения причин дисрегуляции процессов эритропоэза/эритродиереза, детерминирующих патологию эритроцита у больных ИБС до операции, так и с целью клинической апробации методов первичной профилактики выраженного гемолиза.

Литература

1. *Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш.* Что необходимо знать кардиологу об искусственном кровообращении // Креативная кардиология. – 2007. – № 1–2. – С. 102–117.
2. *Антонов В.Ф.* Липидные поры: Стабильность и проницаемость мембран // Сорос. образов. журн. – 1998. – № 10. – С. 10–16.
3. *Атауллаханов Ф.И., Корунова Н.О., Спиридонова И.С. и др.* Как регулируется объем эритроцита, или что могут и чего не могут математические модели в биологии // Биол. мембраны. – 2009. – Т. 26, № 3. – С. 163–179.
4. *Барбараиш Л.С., Барбараиш Н.А., Тимошук Г.И.* Активность гемолиза у больных с нормально функционирующими искусственными шаровыми и ксенобиологическими протезами митрального клапана сердца: метод. рекомендации. – Кемерово, 1991. – 15 с.
5. *Барбараиш Л.С., Барбараиш О.Л., Малышенко Е.С. и др.* Послеоперационные неврологические нарушения I типа у пациентов после коронарного шунтирования // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 4, № 5. – С. 14–17.
6. *Березин М.В., Кодин А.В., Довгалоюк Ю.В. и др.* Структурно-функциональная характеристика эритроцитов у больных стенокардией на фоне различных схем медикаментозной терапии стенокардии // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2006. – Т. 5, № 6. – Прил. – С. 45.
7. *Биоэнергетика клетки.* Химия патологических процессов: учебное пособие / Д.И. Кузьменко, Т.В. Жаваронок, И.П. Мамонтова и др. / под ред. В.Ю. Сереброва, Г.А. Сухановой. – Томск, 2008. – 180 с.
8. *Бокерия Л.А.* Кардиология и кардиохирургия – инновационное развитие // Вестн. РАМН. – 2012. – № 5. – С. 4–5.
9. *Бокерия Л.А., Маликов В.Е., Юсифов А.С. и др.* Механизмы восстановления пула адениловых нуклеотидов и ксилородтранспортной функции эритроцитов при реваскуляризации миокарда под воздействием энергостима // Клинич. физиология кровообращения. – 2004. – № 1. – С. 55–60.
10. *Васильева Е.М.* Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии (обзор литературы) // Биомед. химия. – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 118–126.
11. *Вельков В.В.* С-реактивный белок в лабораторной диагностике острых воспалений и в оценке рисков сосудистых патологий // Клинико-лаб. консилиум. – 2008. – Т. 2, № 21. – С. 37–48.

12. *Веснина Н.В.* Rh-антигены эритроцитов: аллоиммунизация и влияние на состояние периферического звена эритрона при гемотрансфузии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2008. – 23 с.
13. *Ветчинникова О.Н., Василенко И.А., Юновидова Л.И. и др.* Состояние эритрона у больных хронической почечной недостаточностью // Нефрология и диализ. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 448–453.
14. *Визир В.А., Березин А.Е.* Иммуновоспалительная активация как концептуальная модель формирования и прогрессирования сердечной недостаточности // Терапевт. архив. – 2004. – Т. 72, № 4. – С. 77–80.
15. *Винницкий Л.И., Витвицкая И.М., Попов О.Ю.* Иммунная терапия сепсиса – миф или реальность // Анестезиология и реаниматология. – 1997. – № 3. – С. 89–97.
16. *Владимиров Ю.А.* Свободные радикалы в биологических системах // Сорос. образоват. журн. – 2000. – № 6. – С. 13–19.
17. *Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов* / под ред. Е. Гильдебрант. – Красноярск: Красноярский рабочий, 1961. – 314 с.
18. *Ганиткевич Я.В., Черненко Л.И.* Методика определения механической резистентности эритроцитов // Лаб. дело. – 1978. – № 2. – С. 116–117.
19. *Глушков В.С., Сторожок С.А.* Запрограммированная гибель эритроцитов (эриптоз) // Вестн. Ур. мед. акад. науки. – 2009. – № 2. – С. 99.
20. *Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шерстобоев Е.Ю.* Механизмы локальной регуляции кроветворения. – Томск: STT, 2000. – 148 с.
21. *Давыдкин И.Л., Фатенков В.Н., Хохлунов С.М. и др.* Особенности формирования окислительного стресса в крови больных постинфарктным кардиосклерозом при операциях аортокоронарного шунтирования // Вестн. хирургии. – 2002. – Т. 161, № 1. – С. 16–18.
22. *Давыдкин И.Л., Фатенков В.Н.* Коррекция триметазидином окислительного стресса в крови больных постинфарктным кардиосклерозом // Казан. мед. журн. – 2001. – Т. 82, № 5. – С. 344–347.
23. *Дементьева И.И.* Патофизиологические аспекты развития циркуляторной гипоксии при искусственном кровообращении // Анестезиология и реаниматология. – 1995. – №2. – С. 19–23.
24. *Дементьева И.И., Морозов Ю.А., Чарная М.А. и др.* Стандартизация оценки интраоперационного гемолиза при кардиохирургических вмешательствах в условиях искусственного кровообращения // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2010. – № 4. – С. 75–78.
25. *Дементьева И.И., Морозов Ю.А., Чарная М.А.* Интраоперационное повышение концентрации свободного гемоглобина в плазме крови (гемолиз) в кардиохирургии // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2008. – № 6. – С. 60–63.
26. *Донсков С.И., Липатова И.С.* Аллоиммунизация антигенами эритроцитов – глобальный популяционный процесс // Вестн. службы крови России. – 2001. – № 3. – С. 18–24.

27. Драбкина Т.М., Кривой И.И. Никотиновый холинорецептор, ацетилхолинэстераза и Na^+ , K^+ -АТФаза // Цитология. 2004. – Т. 46. № 2. – С. 89–105.
28. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса // Вopr. соврем. химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561–581.
29. Дуткевич И.Г. Тактика экстренной диагностики и лечения гемолитических гемотрансфузионных осложнений // Вестн. хирургии. – 2007. – Т. 166, № 6. – С. 77–80.
30. Дыгай А.М., Жданов В.В. Теория регуляции кроветворения. – М.: Изд-во РАМН. – 2012. – 140 с.
31. Егоренкова Л.В., Баранов А.П., Бузин А.Г., Корсунская И.М. Оценка цитокинового ответа у пациентов с ИБС, псориазом и их сочетанием // Рос. кардиол. журн. – 2005. – № 2. – С. 83–84.
32. Егорова Е.Н. Активность факторов системного воспаления на разных стадиях хронической сердечной недостаточности // Цитокины и воспаление. – 2012. – Т. 11, №1. – С. 70–72.
33. Елкина Н.М., Коношенко С.В., Шашуа И., Жугина О.В. Энзиматическая активность эритроцитов человека при ишемической болезни сердца в условиях развития окислительного стресса // Учен. зап. Таврич. нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24, № 2. – С. 124–128.
34. Ермоленко В.М., Иващенко М.А. Уремия и эритропоэтин. – М., 2000. – 104 с.
35. Завада Н.В., Борисенко В.Е., Груша В.В., Соловей А.Л. Особенности структурных параметров эритроцитов при атомно-силовой микроскопии у пациентов с механической желтухой // Медицина. – 2008. – Т. 61, № 2. – С. 35–43.
36. Захарова Н.Б., Рубин В.И. Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках Силуфол // Лаб. дело. – 1980. – № 12. – С. 735–738.
37. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньшиков Е.Б. Окислительный стресс: биологические и патофизиологические аспекты. – М.: Маик «Наука/Интерпериодика», 2001. – 343 с.
38. Зюзьков Г.Н., Абрамова Е.В., Дыгай А.М., Гольдберг Е.Д. Механизмы регуляции эритропоэза при гемолитической анемии // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2004. – Т. 138, № 10. – С. 378–381.
39. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. Исследование активности Na^+ / K^+ -АТФазы в эритроцитах млекопитающих // Биохимия. – 1984. – Т. 49, № 7. – С. 1089–1094.
40. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. – Минск: Беларусь, 2000. – Т. 2. – 496 с.
41. Кармен Н.Б. Влияние клонидина на структурное состояние мембран эритроцитов // Вестн. интенсив. терапии. – 2004. – № 3. – С. 31–35.

42. Карпов Ю.А., Сорокин Е.В. Атеросклероз и факторы воспаления: нелипидные механизмы действия статинов // Рос. мед. журн. – 2001. – Т. 9, № 10. – С. 396–400.
43. Кленова Н.А. Биохимические механизмы дезинтеграции эритроцитов человека в различных условиях функционирования: автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Тюмень, 2003. – 36 с.
44. Кленова Н.А., Фатенков О.В. Дезинтеграционные процессы в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца до и после аортокоронарного шунтирования и возможности их коррекции триметазидином // Клинич. лаб. диагностика. – 2004. – № 6. – С. 32–34.
45. Клинический патоморфоз эритроцита: атлас / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая и др. – Томск; М.: Изд-во Том. ун-та; ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 208 с.
46. Коваль Г.С., Медведев М.А., Рязанцева Н.В. Морфофункциональная характеристика распределения эритроцитов на различных уровнях артериального русла // VI Сибирский физиологический съезд: тез. докл. – Барнаул, 2008. – С. 94–95.
47. Козлов В.А., Сенников С.В. Система цитокинов: теоретические и практические аспекты. – Новосибирск: Наука, 2004. – 324 с.
48. Козловский В.И., Акуленок А.В., Быковский П.П., Николайкин С.В. Перспективы использования в клинической практике бензидинового метода определения свободного гемоглобина в крови // Вестн. ВГМУ. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 1–14.
49. Коновалова Т.Т., Смирнова И.П. Роль липидов в структурно-функциональной организации клеточных мембран при атерогенезе и их коррекция у больных ишемической болезнью сердца (сообщение 2) // Сиб. мед. журн. (Иркутск). – 2005. – Т. 55, № 6. – С. 8–14.
50. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
51. Короткина Р.Н., Коростелев А.Н., Ситников А.В. Метаболические эффекты мексидола при кардиохирургических операциях с искусственным кровообращением // Анестезиология и реаниматология. – 2005. – № 3. – С. 21–23.
52. Кравец Е.Б., Степовая Е.А., Кошевец Т.Ю. и др. Липидный состав и активность Na^+ , K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа при дислипотеинемиях // Сахарный диабет. – 2010. – № 1. – С. 41–44.
53. Кублинская М.М. Изменения структуры мембран эритроцитов при физиологическом старении и болезни Альцгеймера: автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Томск, 2002. – 30 с.
54. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 832 с.
55. Кузьменко Д.И., Серебров В.Ю., Удинцев С.Н. Свободнорадикальное окисление липидов, активные формы кислорода и антиоксиданты: роль в физио-

- логии и патологии клетки. – Томск: Изд-во Том. политехн. ун-та, 2007. – 214 с.
56. Кутько И.И., Фролов В.М., Рачкаускас Г.С. Показатели энергетического метаболизма и уровень «средних молекул» у больных параноидальной шизофренией с наличием терапевтической резистентности при лечении рисполептом и галавитом // Журн. психиатрии и мед. психологии. – 2008. – Т. 18, № 1. – С. 3–9.
57. Лагутина А.А., Беляевский А.А., Беляевский С.А. Состояние клеточных мембран при сахарном диабете и его изменение под воздействием гипербарического кислорода // Анестезиология и реаниматология. – 2004. – № 3. – С. 57–58.
58. Лакомая Ю.А. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа при старении эритроцитов: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Тюмень, 2006. – 25 с.
59. Ланкин В.З., Тихадзе А.К., Беленков Ю.Н. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: *pro et contra* // Кардиология. – 2004. – № 2. – С. 72–81.
60. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрин Н.Х. Реология крови. – М.: Медицина, 1982. – 272 с.
61. Лисовская И.Л., Витвицкий В.М., Атауллаханов Ф.И. и др. Фильтрационное исследование деформируемости эритроцитов // Гематология и трансфузиология. – 1993. – Т. 38, № 2. – С. 12–15.
62. Лутай М.И. Атеросклероз: современный взгляд на патогенез // Укр. кардиол. журн. – 2004. – № 1. – С. 22–34.
63. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Черенкевич С.Н. Количественная характеристика окислительно-восстановительного статуса эритроцитов // Биофизика. – 2008. – Т. 53, № 4. – С. 618–623.
64. Медведева И.В., Дороднева Е.Ф., Пугачева Т.А. Анализ липидного спектра плазмы и основных параметров клеточных мембран эритроцитов у больных с метаболическим синдромом и ишемической болезнью сердца // Клинич. медицина. – 2002. – № 5. – С. 27–30.
65. Меньшигин И.Н. Искусственное кровообращение у детей в условиях ганглионарной блокады и пульсирующего потока. – СПб.: Специальная медицина, 1998. – 304 с.
66. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / М.И. Прохорова, Л.А. Золотова, М.А. Флеров; под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во ЛГУ. – 1982. – 272 с.
67. Михайлович В.А., Марусанов В.Е., Бичун А.Б. Проницаемость эритроцитарных мембран и сорбционная способность эритроцитов – оптимальные критерии тяжести эндогенной интоксикации // Анестезиология и реаниматология. – 1993. – № 5. – С. 66–69.
68. Морозов Ю.А., Гончарова А.В., Белов Ю.В. и др. Гемореологические расстройства после операций на аорте и способы их коррекции // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2007. – № 4. – С. 25–30.

69. Морозова В.Т., Луговская С.А., Почтарь М.Е. Эритроциты: структура, функции, клинко-диагностическое значение (лекция) // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – № 10. – С. 21–35.
70. Муравьев А.В., Маймистова А.А., Тихомирова И.А. и др. Роль протеинкиназы мембраны эритроцитов в изменениях их деформируемости и агрегации // Физиология человека. – 2012. – Т. 38, № 2. – С. 94.
71. Муравьев А.В., Чопоров С.В., Ройтман Е.В., Маймистова Л.А. Гемореологический профиль больных раком желудка и его изменение под влиянием химиотерапии // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2006. – № 1. – С. 50–55.
72. Новиков Н.М. Механизмы участия продуктов деструкции эритроцитов в регуляции эритропоэза при воздействии на организм экстремальных факторов: дис. ... д-ра мед. наук. – Барнаул, 1986. – 281 с.
73. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. и др. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы // Бюл. сиб. медицины. – 2006. – Т. 5, № 2. – С. 62–70.
74. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. – 202 с.
75. Новицкий В.В., Чумакова С.П., Шипулин В.М. и др. Взаимосвязь цитокинов и факторов бактерицидности нейтрофилов у кардиохирургических больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения // Вестн. РАМН. – 2006. – № 6. – С. 13–18.
76. Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М. Биологические функции комплемента // Бюл. сиб. медицины. – 2007. – Т. 6, № 2. – С. 72–82.
77. Оловникова Н.И., Николаева Т.Л. Антигены эритроцитов человека // Гематология и трансфузиология. – 2001. – Т. 46, № 5. – С. 37–45.
78. Онищенко Н.А., Сускова В.С., Цытин А.Б. и др. Полиорганная недостаточность как проявление иммунной дисрегуляции репаративных процессов в органах при критических состояниях // Анестезиология и реаниматология. – 2001. – № 3. – С. 54–58.
79. Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И. и др. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca^{2+} -индуцированных изменений мембранного потенциала // Биол. мембраны. – 1992. – Т. 9, № 9. – С. 885–903.
80. Осетров И.И., Викулов А.Д., Баранов А.А. и др. Взаимосвязь реологических свойств крови с эритроцитарным метаболизмом и фактором Виллебранда у спортсменов и больных периферическим атеросклерозом // Физиология человека. – 2006. – Т. 32, №6. – С. 80–86.
81. Ослякова А.О., Тихомирова И.А. Состояние микроциркуляторного русла и гемореологический статус в норме и при нарушениях коронарного кровообращения // Ярослав. пед. вестн. Естествен. науки. – 2012 – Т. 3, № 2. – С. 103–108.

82. *Основы клинической гематологии: справочное пособие* / С.Ю. Ермолов, Ф.В. Курдыбайло, В.Г. Радченко, О.А. Рукавицын; под ред. В.Г. Радченко. – СПб.: Диалект, 2003. – 301 с.
83. *Пасечник И.Н.* Механизмы повреждающего действия активированных форм кислорода на биологические структуры у больных в критических состояниях // Вестн. интенсив. терапии. – 2004. – № 3. – С. 27–31.
84. *Перехристенко И.М., Павлюк Р.М., Исакова Л.М.* Группоспецифические антигены системы АВ0 человека и современные методы их выявления (к 100-летию открытия групп крови) // Укр. мед. журн. – 2000. – № 5. – С. 5–8.
85. *Пестун А.Ф., Русанова Н.А., Суханов Ю.С.* Микрофильтрация крови // Вестн. службы крови России. – 2001. – № 4. – С. 43–46.
86. *Петрова И.В.* Функционирование и регуляция Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов: дис. ... д-ра биол. наук. – Томск, 1999. – 181 с.
87. *Петрова И.В., Трубачева О.А., Гусакова С.В.* Роль оксида азота в регуляции Ca^{2+} -зависимой K^{+} -проницаемости мембраны эритроцитов человека // Вестн. Том. гос. ун-та. – 2011. – № 346. – С. 165–168.
88. *Погорелов В.М., Краснова Л.С., Чаниева М.И. и др.* Геометрия прегемолитических пойкилоцитов в стандартных центрифугатах крови на предметных стеклах // Гематология и трансфузиология. – 2008. – Т. 53, № 6. – С. 22–26.
89. *Подкаменный В.А.* Коронарное шунтирование на работающем сердце из минидоступа (Medcab) в лечении больных ишемической болезнью сердца. – Иркутск, 2006. – 200 с.
90. *Пурло Н.Ф., Попова О.В., Бирюкова Л.С., Козинец А.Г.* Электрофоретическая подвижность эритроцитов как показатель оценки функциональной полноценности мембраны эритроцитов // Клинич. лаб. диагностика. – 2005. – № 1. – С. 40–44.
91. *Резван С.Г., Гусинская В.В., Артюхов В.Г. и др.* Структурные свойства эритроцитов и функциональная активность // Вестн. ВГУ. – 2000. – Т. 2, № 4. – С. 130–135.
92. *Ройт А., Бростовф Дж., Мейл Д.* Иммунология: пер. с англ. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
93. *Ройтман Е.В., Дементьева И.И., Азизова О.А. и др.* Изменение реологических свойств крови и осмотической резистентности эритроцитов при активации свободнорадикальных процессов // Клинич. лаб. диагностика. – 2001. – № 3. – С. 42–43.
94. *Ройтман Е.В.* Биореология. Клиническая гемореология. Основные понятия, показатели, оборудование (лекция) // Клинич. лаб. диагностика. – 2001. – № 5. – С. 25–32.
95. *Ройтман Е.В.* Клиническая гемореология // Тромбоз, гемостаз, реология. – 2003. – № 3. – С. 13–27.
96. *Руководство по гематологии: в 3-х т., Т. 1* / М.Г. Абрамов, М.Д. Бриллиант, М.И. Бронштейн и др. / под ред. А.И. Воробьева. – М.: Ньюдиамед, 2002. – 280 с.

97. *Руководство по гематологии*: в 3 т. Т. 3 / Ю.Н. Андреев, З.С. Баркаган, А.Ю. Буланов и др. / под ред. А.И. Воробьева: 3-е изд., перераб. и дополн. – М.: Ньюдиамед, 2005. – 416 с.
98. *Рязанцева Н.В.* Патофизиология эритроцитов при психических расстройствах: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Томск, 2001. – 44 с.
99. *Санников А.Г.* Закономерности изменения уровня аденозинтрифосфата в эритроцитах в процессе их упругой деформации: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Тюмень, 1999. – 24 с.
100. *Свирко Ю.С.* Патофизиологические аспекты применения кровесберегающих методик у кардиохирургических пациентов с ишемической болезнью сердца: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – 2008 – 43 с.
101. *Селезнев А.В.* Взаимосвязь антигенов, биомеханических и реологических свойств эритроцитов // Проблемы патологии системы гемостаза: сб. науч. тр. – Барнаул, 2007. – С. 196–198.
102. *Семенов В.Л., Ярош А.М.* Метод определения антиокислительной активности биологического материала // Укр. биохим. журн. – 1985. – Т. 57, № 3. – С. 50–52.
103. *Сигаев И.Ю., Какителашвили М.А., Мерзляков В.Ю., Ключников И.В.* Роль ожирения в развитии осложнений ближайшего послеоперационного периода у больных ишемической болезнью сердца, направляемых на коронарное шунтирование // Анналы хирургии. – 2008. – № 5. – С. 14–18.
104. *Сирота Т.В.* Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // Вопр. мед. химии. – 1999. – Т. 45, вып. 3. – С. 263–272.
105. *Снегирева Л.В., Иванов В.П.* Реологические свойства эритроцитов в их онтогенезе // Курск. науч.-практ. вестн. «Человек и здоровье». – 2007. – № 1. – С. 35–44.
106. *Современные технологии лабораторной медицины* / Н.В. Рязанцева, В.В. Новичкий, О.Б. Жукова и др. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2008. – 360 с.
107. *Солоха Л.Н., Пушиников А.А.* Характеристика мембранных изменений в эритроцитах у лиц с высоким риском ишемической болезни сердца // Мед. наука и образование Урала. – 2007. – № 6. – С. 47–52.
108. *Солтоски П.Р., Караманукян Х.Л., Салерно Т.А.* Секреты кардиохирургии: пер. с англ. – М.: МЕДпресс-информ, 2005. – 328 с.
109. *Стороожок С.А., Санников А.Г., Захаров Ю.М.* Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. – Тюмень: Изд-во Тюмен. ун-та, 1997. – 140 с.
110. *Стрюк Р.И., Длусская И.Г.* Адренореактивность и сердечно-сосудистая система. – М.: Медицина, 2004. – 160 с.
111. *Суханова Г.А., Серебров В.Ю.* Биохимия клетки. – Томск: Чародей, 2000. – 184 с.

112. *Тепляков А.Т., Мамчур С.Е., Вечерский Ю.Ю., Ахмедов Ш.Д.* Клиническая диагностика ишемической дисфункции при минимально инвазивной реваскуляризации миокарда. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2003. – 236 с.
113. *Тихомирова И.А.* Роль экстрацеллюлярных, мембранных и внутриклеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Ярославль, 2006. – 49 с.
114. *Токарев Ю.Н.* Техническое руководство Американской ассоциации банков крови: пер. с англ. – Милан: Европ. шк. трансфузион. медицины, 2000. – 1056 с.
115. *Токарева Н.В.* Изменения структуры плазматических мембран лимфоцитов и эритроцитов при персистентных вирусных инфекциях: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Томск, 2004. – 23 с.
116. *Толстоухова Н.В.* Клинико-патогенетические аспекты нарушения реологических параметров эритроцитов у больных с хронической почечной недостаточностью: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Тюмень. – 2009 – 24 с.
117. *Трубачева О.А., Шахристова Е.В., Галич А.И., Петрова И.В.* Влияние повышенной Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов // Вестн. Том. гос. пед. ун-та. – 2011. – Вып. 5. – С. 69–72.
118. *Турбасова Н.В., Плотникова М.В., Ильдебенева С.А.* Частота фенотипов групп крови системы АВ0 и RHESUS среди больных, имеющих некоторые патологии сосудистой системы // Вестн. Ур. мед. акад. науки. – 2009. – № 2. – С. 108–109.
119. *Улитко М.В.* Роль моноцитов-макрофагов в адаптивных реакциях кроветворной ткани при действии на организм экстремальных факторов: автореф. ... канд. биол. наук. – Екатеринбург, 2008. – 24 с.
120. *Уразова О.И., Новицкий В.В.* Лабораторная диагностика гематологических синдромов и болезней. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2008. – 98 с.
121. *Уранов В.Н.* Вчера и сегодня ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента: эналаприл остается в ряду препаратов сравнения и выбора // Справ. поликлин. врача. – 2010. – № 3. – С. 17–24.
122. *Фесенко Д.О., Митяева О.Н., Наседкина Т.В. и др.* Генотипирование биологического материала по локусам HLA-DQA1, АВ0, AMEL с помощью биочипов // Молекуляр. биология. – 2010. – Т. 44, № 3. – С. 456–462.
123. *Фундаментальные аспекты лечения сердечной недостаточности в кардиохирургии* / под ред. В.М. Шипулина, Р.С. Карпова. – Томск: STT, 2009. – 262 с.
124. *Харченко Е.П.* Сердечная недостаточность: патогенетический континуум и биомаркеры // Кардиология. – 2012. – № 3. – С. 53–64.
125. *Чанг Н.Т.* Исследование структурного состояния мембран эритроцитов больных ишемической болезнью сердца старших возрастов // Фундамент. исследования. – 2012. – № 2. – С. 97–103.
126. *Чарная М.А., Морозов Ю.А., Гладышева В.Г.* Искусственная гипокоагуляция при кардиохирургических операциях и ее мониторинг // Анестезиология и реаниматология. – 2006. – № 6. – С. 76–79.

127. *Шаталов А.Е., Шнайдер Ю.А.* Кардиоплегия на основе крови. Современное состояние и перспективы развития // Вестн. хирургии. – 2004. – Т. 163, № 5. – С. 128–131.
128. *Шевченко О.Г.* Роль холестерина в структурной организации мембраны эритроцитов // Вестн. Ин-та биологии Науч. центра Ур. отд. РАН. – 2010. – № 6. – С. 10–14.
129. *Шилов А.М., Авшалумов А.Ш., Сеницина Е.Н. и др.* Метаболический синдром // Рус. мед. журн. – 2008. – Т. 16, № 4. – С. 200–204.
130. *Шилов А.М., Мельник М.В.* Артериальная гипертензия и реологические свойства крови. – М.: БАРС, 2005. – 514 с.
131. *Широкова Т.Е., Бурачковская Л.И., Сумароков А.Б. и др.* Значение активации тромбоцитов и изменений эритроцитов в возникновении тромботических и реологических нарушений // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2007. – № 5. – С. 18–24.
132. *Шиффман Ф.Дж.* Патология крови: пер. с англ. – М.; СПб.: БИНОМ; Невский Диалект, 2000. – 448 с.
133. *Шперлинг И.А., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В., Жаткин О.А.* Патология эритроцита при экзогенной интоксикации. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. – 122 с.
134. *Шумаков В.И., Сускова В.С., Ермакова Л.П. и др.* Состояние иммунной системы у кардиохирургических больных при искусственном кровообращении // Вестн. трансплантологии и искусствен. органов. – 2003. – № 3. – С. 41–45.
135. *Эритроциты и злокачественные новообразования* / В.В. Новицкий, Е.А. Степовая, В.Е. Гольдберг и др. – Томск: SST, 2000. – 288 с.
136. *Юсипович А.И., Брызгалова Н.Ю., Паршина Е.Ю. и др.* Применение лазерной интерференционной микроскопии для оценки формы и состояния эритроцитов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 3. – С. 357–360.
137. *Юшков Б.Г., Климин В.Г., Кузьмин А.И.* Сосуды костного мозга и регуляция кроветворения. – Екатеринбург: УрО РАН, 2004. – 149 с.
138. *Akila A., D'souza B., Vishwanath P., D'souza V.* Oxidative injury and antioxidants in coronary artery bypass graft surgery: off-pump CABG significantly reduces oxidative stress // Clin. Chim. Acta. – 2007. – Vol. 375, N 1–2. – P. 147–152.
139. *Akman T., Akarsu M., Akpinar H. et al.* Erythrocyte deformability and oxidative stress in inflammatory bowel disease // Dig. Dis. Sci. – 2012. – Vol. 57, N 2. – P. 458–464.
140. *Alegretti A.P., Schneider L., Piccoli A.K. et al.* Diminished expression of complement regulatory proteins on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus patients [Electronic resource] // Clin. Dev. Immunol. – 2012. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=411.%09Diminished+expression+of+complement+regulatory+proteins+on+peripheral+blood+cells+from+systemic+lupus+erythematosus+patients>

141. *An X., Mohandas N.* Disorders of red cell membrane // *Br. J. Haematol.* – 2008. – Vol. 141, N 3. – P. 367–375.
142. *Arbel Y., Banai S., Benhorin J. et al.* Erythrocyte aggregation as a cause of slow flow in patients of acute coronary syndromes // *Int. J. Cardiol.* – 2012. – Vol. 154, N 3. – P. 322–327.
143. *Asha Devi S., Shiva Shankar Reddy C.S., Subramanyam M.V.* Peroxyl-induced oxidative stress in aging erythrocytes of rat // *Biogerontology.* – 2011. – Vol. 12, N 4. – P. 283–292.
144. *Avent N.D., Reid M.E.* The Rh blood group system // *Blood.* – 2000. – Vol. 95, N 2. – P. 375–387.
145. *Azarov I., He X., Jeffers A. et al.* Rate of nitric oxide scavenging by hemoglobin bound to haptoglobin // *Nitric Oxide.* – 2008. – Vol. 18. – P. 296–302.
146. *Bae H.B., Zmijewski J.W., Deshane J.S. et al.* Vitronectin inhibits neutrophil apoptosis through activation of integrin-associated signaling pathways // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 46, N 6. – P. 790–796.
147. *Banz Y., Rieben R.* Role of complement and perspectives for intervention in ischemia-reperfusion damage // *Ann. Med.* – 2012. – Vol. 44, N 3. – P. 205–217.
148. *Baranowska K., Juszczak G., Dmitruk I. et al.* Risk factors of neurological complications in cardiac surgery // *Kardiol. Pol.* – 2012. – Vol. 70, N 8. – P. 811–818.
149. *Barvitenko N.N., Adragna N.C., Weber R.E.* Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance // *Cell Physiol. Biochem.* – 2005. – Vol. 15, N 1–4. – P. 1–18.
150. *Baseler W.A., Dabkowski E.R., Jagannathan R. et al.* Reversal of mitochondrial proteomic loss in Type 1 diabetic heart with overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase // *AJP – Regul. Physiol.* – 2013. – Vol. 304, N 7. – P. 553–565.
151. *Baskuri O.K., Tugral E., Neu B., Meiselman H.J.* Particle electrophoresis as a tool to understand the aggregation behavior of red blood cells // *Electrophoresis.* – 2002. – Vol. 23, N 13. – P. 2103–2109.
152. *Bednarek-Skubiewska A., Jakubowska-Solarska B., Solski J., Ksiazek A.* Sialic acid content in erythrocyte membranes of patients on chronic hemodialysis // *Polish Arch. Int. Med.* – 2009. – Vol. 119, N 4. – P. 194–199.
153. *Belaia O.L., Artamoshina N.E., Kalmykova V.I. et al.* Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients with coronary heart disease // *Klin. Med.* – 2009. – Vol. 87, N 5. – P. 21–24.
154. *Belosludtsev K.N., Trudovishnikov A.S., Belosludtseva N.V. et al.* Palmitic acid induces the opening of a Ca²⁺-dependent pore in the plasma membrane of red blood cells: the possible role of the pore in erythrocyte lysis // *J. Membr. Biol.* – 2010. – Vol. 237, N 1. – P. 13–19.
155. *Ben-Ami R., Barhstein G., Mardi T. et al.* A synergistic effect of albumin and fibrinogen on immunoglobulin-induced red blood cell aggregation // *Am. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – P. 2663–2669.

156. Betz T., Lenz M., Joanny J.F., Sykes C. ATP-dependent mechanics of red blood cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106, N 36. – P. 15320–15325.
157. Bevilacqua S., Matteucci S., Ferrarini M. et al. Biochemical evaluation of vacuum-assisted venous drainage: A randomized, prospective study // *Perfusion.* – 2002. – Vol. 17, N 1. – P. 57–61.
158. Bhattacharya A. Red blood cell mechanics // *J. Indian Med. Assoc.* – 2011. – Vol. 109, N 9. – P. 668–682.
159. Blood pump: patent WO2010013355, IPC A61M1/10; F04D13/02; F04D5/00; A61M1/10; F04D13/02; F04D5/00 / IMED JAPAN INC [JP]; NEMOTO ISAO [JP]; ABE YUSUKE [JP]. WO2008JP64313 20080808, publication date 04.02.2010.
160. Bode J.G., Albrecht U., Häussinger D. et al. Hepatic acute phase proteins – regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling // *Eur. J. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 91, N 6–7. – P. 496–505.
161. Boisselier E., Calvez P., Demers E. et al. Effect of oxidation of polyunsaturated phospholipids on the binding of proteins in monolayers // *Colloids Surf. B Bio-interfaces.* – 2013. – Vol. 109. – P. 109–114.
162. Bolisetty S., Jaimes E.A. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14, N 3. – P. 6306–6344.
163. Brock M., Trenkmann M., Gay R.E. et al. MicroRNA-18a enhances the interleukin-6-mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, N 46. – P. 40142–40150.
164. Broncel M., Bala A., Koter-Michalak M. et al. Physicochemical modifications induced by statins therapy on human erythrocytes membranes // *Wiad Lek.* – 2007. – Vol. 60, N 7–8. – P. 321–328.
165. Broncel M., Balcerak M., Cieślak D. et al. Effect of fluvastatin extended release on the protein-lipid structure of erythrocyte membrane and C-reactive protein in patients with hyperlipidemia // *Pol. Merk. Lekarski.* – 2007. – Vol. 22, N 128. – P. 107–111.
166. Bunn H.F. Erythropoietin [Electronic resource] // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2013. – Vol. 3, N 3. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23457296>
167. Burton N.M., Bruce L.J. Modelling the structure of the red cell membrane // *Biochem. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 89, N 2. – P. 200–215.
168. Buttarello M., Pleban M. Automated blood cell counts: state of the art // *Hematopathology.* – 2008. – Vol. 130, N 1. – P. 104–116.
169. Cabel M., Meiselman H.J., Popel A.S., Johnson P.C. Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 272, N 2. – P. 1020–1032.
170. Cai Z., Yan L.J. Protein oxidative modifications: beneficial roles in disease and health // *J. Biochem. Pharmacol. Res.* – 2013. – Vol. 1, N 1. – P. 15–26.

171. *Canonne J., Froidure-Nicolas S., Rivas S.* Phospholipases in action during plant defense signaling // *Plant Signal Behav.* – 2011. – Vol. 6, N 1. – P. 13–18.
172. *Carter K., Worwood M.* Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases // *Intern. J. Labor. Hematol.* – 2007. – Vol. 29. – P. 92–110.
173. *Castagnola M., Messana I., Sanna M.T., Giardina B.* Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: state of the art // *Blood Transfus.* – 2010. – Vol. 8, N 3. – P. 53–58.
174. *Cavaliere F., Meo F., Scapigliati A. et al.* Red blood cell energy metabolism during cardiopulmonary bypass // *J. Cardiovasc. Surg. (Torino).* – 1999. – Vol. 40, N 5. – P. 653–657.
175. *Chai P.J., Nassar R., Oakeley A.E. et al.* Soluble complement receptor-1 protects heart, lung, and cardiac myofilament function from cardiopulmonary bypass damage // *Circulation.* – 2000. – Vol. 101, N 5. – P. 541–546.
176. *Chang Y.T., Pan S.Y., Lin S.L.* Seeking for a way to revive erythropoietin production in chronic kidney disease [Electronic resource] // *J. Formos. Med. Assoc.* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669141>
177. *Chateauvieux S., Grigorakaki C., Morceau F. et al.* Erythropoietin, erythropoiesis and beyond // *Biochem. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 82, N 10. – P. 1291–1303.
178. *Chen K., Liu J., Heck S. et al.* Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106, N 41. – P. 17413–17418.
179. *Cheung A., Cruz-Schiavone G., Meng Q. et al.* Cardiopulmonary bypass, hemolysis and nitroprusside-induced cyanide production // *Anesth. Analg.* – 2007. – Vol. 105, N 1. – P. 29–33.
180. *Chowdhry V., Bisoyi S., Mishra B.* Perioperative challenges in a patient of severe G6PD deficiency undergoing open heart surgery // *Ann. Card. Anaesth.* – 2012. – Vol. 15, N 1. – P. 50–53.
181. *Chu H., Puchulu-Campanella E., Galan J.A. et al.* Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109, N 31. – P. 12794–12799.
182. *Chu S.H., Andrews D., Watanabe Y.* Cardiac surgery in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria // *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* – 2011. – Vol. 19, N 1 – P. 61–63.
183. *Cirri S., Negri L., Babbini M. et al.* Hemolysis due to active venous drainage during cardiopulmonary bypass: Comparison of two different techniques // *Perfusion.* – 2001. – Vol. 16, N 4. – P. 313–318.
184. *Coccia R., Spadaccio C., Foppoli C. et al.* The effect of simvastatin on erythrocyte membrane fluidity during oxidative stress induced by cardiopulmonary bypass: a randomized controlled study // *Clin Ther.* – 2007. – Vol. 29, N 8. – P. 1706–1717.

185. Conlisk A.T., Datta S., Fissell W.H., Roy S. Biomolecular transport through hemofiltration membranes // Ann. Biomed. Eng. – 2009. – Vol. 37, N 4. – P. 722–736.
186. Cortes V.F., Ribeiro I.M., Barrabin H. et al. Regulatory phosphorylation of FXD2 by PKC and cross interactions between FXD2, plasmalemmal Ca^{2+} -ATPase and Na^+ , K^+ -ATPase // Arch Biochem Biophys. – 2011. – Vol. 505, N 1. – P. 75–82.
187. Dai C., Chung I.J., Jiang S. et al. Reduction of cell cycle progression in human erythroid progenitor cells treated with tumour necrosis factor alpha occurs with reduced CDK6 and is partially reversed by CDK6 transduction // Br. J. Haematol. – 2003. – Vol. 121, N 6. – P. 919–927.
188. Dandana A., Ferchichi S., Addad F. et al. Evaluation of oxidative stress among coronary diabetics patients // Acta Biomed. – 2011. – Vol. 82, N 3. – P. 187–196.
189. Daniels G. Functional aspects of red cell antigens // Blood Rev. – 1999. – Vol. 13, N 1. – P. 14–35.
190. Daniels G. Structure and function of red cell surface antigens // ISBT. Science Series. – 2006. – Vol. 1, N 1. – Suppl. – P. 3–8.
191. Davis C., Kausz A., Zager R. et al. Acute renal failure after CPB is related to decreased serum ferritin levels // J. Am. Soc. Nephrol. – 1999. – Vol. 10, N 11. – P. 2396–2402.
192. Deem S., Kim J.U., Manjula B.N. et al. Effects of S-nitrosation and cross-linking of hemoglobin on hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat lungs // Circ. Res. – 2002. – Vol. 91. – P. 626–632.
193. Degn S.E., Thiel S. Humoral pattern-recognition and the complement system // Scand. J. Immunol. – 2013. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/23672641>
194. Deng Y.K., Wei F., Zhang D.G. Erythrocyte protective effects of gintonin in patients undergoing hypothermic cardiopulmonary bypass // Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. – 2010. – Vol. 30, N 4. – P. 365–368.
195. Destruction of erythrocytes / D. Glader // Wintrobe's Clinical Hematology / eds. J.P. Greer, J. Forster, J.N. Lukens et al.: 11th ed. – Lippincott Williams and Wilkins, 2004. – Chapter 9. – P. 249–265.
196. Dicato M., Plawny L., Diederich M. Anemia in cancer // Ann. Oncol. – 2009. – Vol. 21, N 7. – P. 159–161.
197. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. et al. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes // Archives Biochem. Biophys. – 1963. – Vol. 100, N 1. – P. 119–130.
198. Draaisma A.M., Hazekamp M.G., Anes N. et al. Phosphorylcholine coating of bypass systems used for young infants does not attenuate the inflammatory response // Ann. Thorac Surg. – 2006. – Vol. 81, N 4. – P. 1455–1459.
199. Drozd W., Kedryna T., Ostrowska B. et al. Erythrocyte concentrations of adenosine triphosphate (ATP) and magnesium, before and after conservative therapy of lower extremities atherosclerosis // Pol. Merkur. Lekarski. – 2004. – Vol. 16, N 94. – P. 332–336.

200. *Elyassi A.R., Rowshan H.H.* Perioperative management of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patient: A review of literature // *Anesth. Prog.* – 2009. – Vol. 56, N 3. – P. 86–91.
201. *Erhart S.M., Cole D.J., Patel P.M. et al.* Effect of alpha-alpha diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) on the potency of sodium nitroprusside and nitroglycerine to decrease blood pressure in rats: a dose-response study // *Artif. Cells. Blood. Substit. Immobil. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 28, N 5. – P. 385–396.
202. *Folch J., Lees M., Sloane-Stanley A.G.* A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues // *J. Biol. Chem.* – 1957. – Vol. 226, N 1. – P. 497–509.
203. *Föller M., Bobbala D., Koka S. et al.* Functional significance of the intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel for the short-term survival of injured erythrocytes // *Pflügers Arch.* – 2010. – Vol. 460, N 6. – P. 1029–1044.
204. *Föller M., Huber S.M., Lang F.* Erythrocyte programmed cell death // *IUBMB Life.* – 2008. – Vol. 60, N 10. – P. 661–668.
205. *Fransen E.J., Ganushchak Y.M., Vijay V. et al.* Evaluation of a new condensed extra-corporeal circuit for cardiac surgery: a prospective randomized clinical pilot study // *Perfusion.* – 2005. – Vol. 20, N 2. – P. 91–99.
206. *Frauenknecht V., Schroeder V.* Complement – a phylogenetically old system as a new player in the development of atherosclerosis // *Hamostaseologie.* – 2012. – Vol. 32, N 4. – P. 276–285.
207. *Frey B., Haupt R., Alms S. et al.* Increase in fragmented phosphatidylcholine in blood plasma by oxidative stress // *J. Lipid Res.* – 2000. – Vol. 41, N 7. – P. 1145–1153.
208. *Fromes Y., Gaillard D., Ponzio O. et al.* Reduction of the inflammatory response following coronary bypass grafting with total minimal extracorporeal circulation // *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* – 2002. – Vol. 22, N 4. – P. 527–533.
209. *Gasier H.G., Fothergill D.M.* Oxidative stress, antioxidant defenses and nitric oxide production following hyperoxic exposures // *Undersea Hyperb. Med.* – 2013. – Vol. 40, N 2. – P. 125–134.
210. *Geetha A., Lakshmi Priya M.D., Jeyachristy S.A., Surendran R.* Level of oxidative stress in the red blood cells of patients with liver cirrhosis // *Indian J. Med. Res.* – 2007. – Vol. 126, N 3. – P. 204–210.
211. *George A., Pushkaran S., Li L. et al.* Altered phosphorylation of cytoskeleton proteins in sickle red blood cells: the role of protein kinase C, Rac GTPases, and reactive oxygen species // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2010. – Vol. 45, N 1. – P. 41–45.
212. *Gerrah R., Shargal Y., Elami A.* Impaired oxygenation and increased hemolysis after cardiopulmonary bypass in patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency // *Ann. Thorac. Surg.* – 2003. – Vol. 76, N 2. – P. 523–527.
213. *Ghashghaieina M., Toulany M., Saki M. et al.* Potential roles of the NF κ B and glutathione pathways in mature human erythrocytes // *Cell Mol. Biol. Lett.* – 2012. – Vol. 17, N 1. – P. 11–20.

214. *Giannoglou G.D., Koskinas K.C., Tziakas D.N. et al.* Total cholesterol content of erythrocyte membranes and coronary atherosclerosis: an intravascular ultrasound pilot study // *Angiology*. – 2009. – Vol. 60, N 6. – P. 676–682.
215. *Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B.* Storage lesion in banked blood due to hemolysis dependent disruption of nitric oxide homeostasis // *Curr. Opin. Hematol.* – 2009. – Vol. 16. – P. 515–523.
216. *Glodek A.M., Mirchev R., Golan D.E. et al.* Ligation of complement receptor 1 increases erythrocyte membrane deformability // *Blood*. – 2010. – Vol. 116, N 26. – P. 6063–6071.
217. *Glogowski K., Stammers A., Niimi K. et al.* The effect of priming techniques of ultrafiltrators on blood rheology: An in vitro evaluation // *Perfusion*. – 2001. – Vol. 16, N 3. – P. 221–228.
218. *Glovsky M.M., Ward P.A., Johnson K.J.* Complement determinations in human disease // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* – 2004. – Vol. 93, N 6. – P. 513–522.
219. *Gottlieb Y., Topaz O., Cohen L.A. et al.* Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis *in vivo* but not *in vitro* // *Haematologica*. – 2012. – Vol. 97, N 7. – P. 994–1002.
220. *Govekar R.B., Kawle P.D., Advani S.H., Zingde S.M.* Reduced PKC α activity induces senescent phenotype in erythrocytes [Electronic resource] // *Anemia*. – 2012. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3439938/>
221. *Graaff R., Gu Y.J., Boonstra P.W. et al.* Analysis of red blood cell aggregation in cardio-pulmonary bypass (CPB) surgery // *Int. J. Artif. Organs*. – 2004. – Vol. 27, N 6. – P. 488–494.
222. *Griffiths N.J., Hill D.J., Borodina E. et al.* Meningococcal surface fibril (Msf) binds to activated vitronectin and inhibits the terminal complement pathway to increase serum resistance // *Mol. Microbiol.* – 2011. – Vol. 82, N 5. – P. 1129–1149.
223. *Griffiths R.E., Heesom K.J., Anstee D.J.* Normal prion protein trafficking in cultured human erythroblasts // *Blood*. – 2007. – Vol. 110, N 13. – P. 4518–4525.
224. *Griffiths R.E., Kupzig S., Cogan N. et al.* The ins and outs of human reticulocyte maturation: autophagy and the endosome/exosome pathway // *Autophagy*. – 2012. – Vol. 8, N 7. – P. 1150–1151.
225. *Gu Y.J., Vermeijden W.J., de Vries A.J. et al.* Influence of mechanical cell salvage on red blood cell aggregation, deformability and 2,3-diphosphoglycerate in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass // *Ann. Thorac. Surg.* – 2008. – Vol. 86, N 5. – P. 1570–1575.
226. *Gunaydin S., McCusker K., Sari T. et al.* Clinical performance and biocompatibility of hyaluronan-based heparin-bonded extracorporeal circuits in different risk cohorts // *Interact Cardiovasc. Thorac. Surg.* – 2010. – Vol. 10, N 3. – P. 371–376.
227. *Haase M., Haase-Fielitz A., Bagshaw S.M. et al.* Cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury: A pigment nephropathy? // *Contrib. Nephrol.* – 2007. – Vol. 156. – P. 340–353.

228. *Haase M., Haase-Fielitz A., Bellomo R.* Cardiopulmonary bypass, hemolysis, free iron, acute kidney injury and the impact of bicarbonate // *Contrib. Nephrol.* – 2010. – Vol. 165. – P. 28–32.
229. *Hamadmad S.N., Henry M.K., Hohl R.J.* Erythropoietin receptor signal transduction requires protein geranylgeranylation // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – Vol. 316, N 1. – P. 403–409.
230. *Hamadmad S.N., Hohl R.J.* Lovastatin suppresses erythropoietin receptor surface expression through dual inhibition of glycosylation and geranylgeranylation // *Biochem. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 74, N 4. – P. 590–600.
231. *Hansbro S.D., Sharpe A.C., Cathpole R. et al.* Hemolysis during CPB: An *in vivo* comparison of standard roller pumps, non-occlusive roller pumps and centrifugal pumps // *Perfusion.* – 1999. – Vol. 14, N 1. – P. 3–10.
232. *Hanssen S.J., Lubbers T., Hodin C.M. et al.* Hemolysis results in impaired intestinal microcirculation and intestinal epithelial cell injury // *World J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 17, N 2. – P. 213–218.
233. *Harmand M.F., Briquet F.* *In vitro* comparative evaluation under static conditions of the hemocompatibility of four types of tubing for cardiopulmonary bypass // *Biomaterials.* – 1999. – Vol. 20, N 17. – P. 1561–1571.
234. *Hei F., Irou S., Ma J., Long C.* Plasma exchange during cardiopulmonary bypass in patients with severe hemolysis in cardiac surgery // *ASAIO J.* – 2009. – Vol. 55, N 1. – P. 78–82.
235. *Heiner A.L., Gibbons E., Fairbourn J.L. et al.* Effects of cholesterol on physical properties of human erythrocyte membranes: impact on susceptibility to hydrolysis by secretory phospholipase A2 // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 94, N 8. – P. 3084–3093.
236. *Henkelman S., Rakhorst G., van der Mei H.C., Busscher H.J.* Use of hydroxyethyl starch for inducing red blood cell aggregation // *Clin Hemorheol Microcirc.* – 2012. – Vol. 52, N 1. – P. 27–35.
237. *Herman P., Huet M., Callebaut I. et al.* Binding sites of leukocyte beta 2 integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, N 34. – P. 26002–26010.
238. *Hirayama T., Herlitz H., Jonsson O., Roberts D.* Deformability and electrolyte changes of erythrocytes in connection with open heart surgery // *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1986. – Vol. 20, N 3. – P. 253–259.
239. *Horváth Z., Csuka D., Vargova K. et al.* Elevated C1rC1sC1inh levels independently predict atherosclerotic coronary heart disease // *Mol. Immunol.* – 2013. – Vol. 54, N 1. – P. 8–13.
240. *Hu E.B., Jiang H.H.* Effect of glutathione pretreatment on lung ischemia-reperfusion injury during cardiopulmonary bypass // *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao.* – 2003. – Vol. 28, N 6. – P. 619–622.
241. *Hubert C., Savary K., Gasc J.M., Corvol P.* The hematopoietic system: a new niche for the renin-angiotensin system // *Nat. Clin. Pract Cardiovasc. Med.* – 2006. – Vol. 3, N 2. – P. 80–85.

242. Inal M., Alataş O., Kanbak G. *et al.* Changes of antioxidant enzyme activities during cardiopulmonary bypass // *Cardiovasc. Surg.* (Torino). – 1999. – Vol. 40, N 3. – P. 373–376.
243. Inrig J.K., Bryskin S.K., Patel U.D. *et al.* Association between high-dose erythropoiesis-stimulating agents, inflammatory biomarkers, and soluble erythropoietin receptors // *BMC Nephrol.* – 2011. – Vol. 12. – P. 67.
244. Iskesen I., Saribulbul O., Cerrahoglu M. *et al.* Trimetazidine Reduces Oxidative Stress in Cardiac Surgery // *Circ. J.* – 2006. – Vol. 70. – P. 1169–1173.
245. Jacobs S., de Somer F., Vandenplas G. *et al.* Active or passive bio-coating: does it matters in extracorporeal circulation? // *Perfusion.* – 2011. – Vol. 26, N 6. – P. 496–502.
246. Jeffers A., Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B. Computation of plasma hemoglobin nitric oxide scavenging in haemolytic anaemias // *Free Radi. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 41, N 3. – P. 1557–1565.
247. Jiang H., Anderson G.D., McGiff J.C. Red blood cells (RBCs), epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and adenosine triphosphate (ATP) // *Pharmacol. Rep.* – 2010. – Vol. 62, N 3. – P. 468–474.
248. Jilani K., Lang F. Carmustine-induced phosphatidylserine translocation in the erythrocyte membrane // *Toxins* (Basel). – 2013. – Vol. 5, N 4. – P. 703–716.
249. Jiménez J.A., Loango N., Giraldo A.M. *et al.* Sphingomyelin of erythrocytes membranes is related to total cholesterol and LDL-cholesterol in patients with significant coronary arterial disease // *Open Clin. Chem. J.* – 2012. – Vol. 5. – P. 27–32.
250. Jimeno P., Luque J., Garcha-Pérez A.I., Pinilla M. A comparative study by a single chromatographic procedure of glycolytic regulatory kinase isozymes in rat erythroid cells as a function of differentiation-maturation process // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1998. – Vol. 45, N 6. – P. 1211–1225.
251. Ju M., Ye S.S., Low H.T. *et al.* Effect of deformability difference between two erythrocytes on their aggregation [Electronic resource] // *Phys. Biol.* – 2013. – Vol. 10, N 3. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23574688>
252. Jung J.M., Fridman A., Cho D.J., Cho Y.I. Reduction of low-density lipoprotein cholesterol, plasma viscosity, and whole blood viscosity by the application of pulsed corona discharges and filtration [Electronic resource] // *Rev. Sci. Instrum.* – 2013. – Vol. 84, N 3. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Reduction+of+low-density+lipoprotein+cholesterol%2C+plasma+viscosity%2C+and+whole+blood+viscosity+by+the+application+of+pulsed+corona+discharges+and+filtration>.
253. Kaneda T., Tsuruoka S., Fujimura A. Statins inhibited erythropoietin-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells // *Eur. J. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 649, N 1–3. – P. 38–43.
254. Kang Y.J., Kim M.G., Son K.H. *et al.* Experimental investigation of pulsatility effect on the deformability and hemolysis of blood cells // *J. Artif. Organs.* – 2010. – Vol. 34, N 4. – P. 103–109.

255. *Kato G.J., Taylor J.G.* Pleiotropic effects of intravascular hemolysis on vascular homeostasis // *Br. J. Haematol.* – 2010. – Vol. 148, N 5. – P. 690–701.
256. *Kawahito S., Motomura T., Glueck J., Nose Y.* Development of a new hollow fiber silicone membrane oxygenator for ECMO: the recent progress // *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2002. – Vol. 8, N 5. – P. 268–274.
257. *Kaya K., Oguz M., Akar A.R. et al.* The effect of sodium nitroprusside infusion on renal function during reperfusion period in patients undergoing coronary artery bypass grafting: A prospective randomized clinical trial // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2007. – Vol. 31, N 2. – P. 290–297.
258. *Keerthivasan G., Crispino J.D., Wickrema A.* Erythroblast enucleation [Electronic resource] // *Stem. Cells. Int.* – 2011. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22007239>
259. *Kelly R., Richards S., Hillmen P., Hill A.* The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and treatment with eculizumab // *Ther. Clin. Risk. Manag.* – 2009. – Vol. 5. – P. 911–921.
260. *Kieffer E., Chiche L., Godet G. et al.* Type IV thoracoabdominal aneurysm repair: predictors of postoperative mortality, spinal cord injury, and acute intestinal ischemia // *Ann. Vasc. Surg.* – 2008. – Vol. 22, N 6. – P. 822–828.
261. *Kim Y., Lim J., Kim M. et al.* Quantitation of CD55 and CD59 expression on reticulocytes and mature erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, and healthy control subjects // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 2010. – Vol. 40, N 3. – P. 226–232.
262. *Kones R.* Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey // *Drug. Des. Devel. Ther.* – 2011. – Vol. 5. – P. 325–380.
263. *Kotur-Stevuljevic J., Memon L., Stefanovic A. et al.* Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients // *Clin. Biochem.* – 2007. – Vol. 40, N 3–4. – P. 181–187.
264. *Koury M.J., Bondurant M.C.* The molecular mechanisms of erythropoietin action // *Eur. J. Biochem.* – 1992. – Vol. 210. – P. 649–663.
265. *Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C. et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor // *Nature.* – 2001. – Vol. 409. – P. 198–201.
266. *Krzystek-Korpacka M., Neubauer K., Berdowska I. et al.* Impaired erythrocyte antioxidant defense in active inflammatory bowel disease: impact of anemia and treatment // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2010. – Vol. 16, N 9. – P. 1467–1475.
267. *Kubicki R., Grohmann J., Siepe M. et al.* Early prediction of capillary leak syndrome in infants after cardiopulmonary bypass [Electronic resource] // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389476>
268. *Lamy A., Devereaux P.J., Prabhakaran D.* Off-pump or on-pump coronary-artery bypass grafting at 30 days // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366, N 16. – P. 1489–1497.

269. Lang E., Qadri S.M., Lang F. Killing me softly – suicidal erythrocyte death // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2012. – Vol. 44, N 8. – P. 1236–1243.
270. Lang F., Gulbins E., Lang P.A. et al. Ceramide in suicidal death of erythrocytes // Cell Physiol. Biochem. – 2010. – Vol. 26, N 1. – P. 21–28.
271. Lang F., Gulbins E., Lerche H. et al. Eryptosis, a window to systemic disease // Cell Physiol. Biochem. – 2008. – Vol. 22, N 5–6. – P. 373–380.
272. Lang F., Qadri S.M. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes // Blood Purif. – 2012. – Vol. 33, N 1–3. – P. 125–130.
273. Lang K.S., Lang P.A., Bauer C. et al. Mechanisms of suicidal erythrocyte death // Cell Physiol. Biochem. – 2005. – Vol. 15, N 5. – P. 195–202.
274. Lappé J.M., Horne B.D., Shah S.H. et al. Red cell distribution width, C-reactive protein, the complete blood count, and mortality in patients with coronary disease and a normal comparison population // Clin. Chim. Acta. – 2011. – Vol. 412, N 23–24. – P. 2094–2099.
275. Lausada N.R., Boullón S., Boullón F. et al. Erythrocyte membrane, plasma and atherosclerotic plaque lipid pattern in coronary heart disease // Medicina (B Aires). – 2007. – Vol. 67, N 5. – P. 451–457.
276. Lawson D.S., Ing R., Cheifetz I.M. et al. Hemolytic characteristics of three commercially available centrifugal blood pumps // Pediatr. Crit. Care Med. – 2005. – Vol. 6, N 5. – P. 573–577.
277. Lenox L.E., Perry J.M., Paulson R.F. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia // Blood. – 2005. – Vol. 105. – P. 2741–2748.
278. Levy A.P., Asleh R., Blum S. et al. Haptoglobin: basic and clinical aspects // Antioxid. Redox Signal. – 2010. – Vol. 12, N 2. – P. 293–304.
279. Levy J.H., Tanaka K.A. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass // Ann. Thorac. Surg. – 2003. – Vol. 75, N 2. – P. 715–720.
280. Lewalle A., Parker K.H. Axisymmetric optical-trap measurement of red blood cell membrane elasticity [Electronic resource] // J. Biomech. Eng. – 2011. – Vol. 133, N 1. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lewalle+A.+2011>
281. Lewis R.D., Perry M.J., Guschina I.A. et al. CD55 deficiency protects against atherosclerosis in ApoE-deficient mice via C3a modulation of lipid metabolism // Am. J. Pathol. – 2011. – Vol. 179, N 4. – P. 1601–1607.
282. Li P., Huang J., Tian H.J. et al. Regulation of bone marrow hematopoietic stem cell is involved in high-altitude erythrocytosis // Exp. Hematol. – 2011. – Vol. 39, N 1. – P. 37–46.
283. Libby P. Inflammation in atherosclerosis // Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. – 2012. – Vol. 32, N 9. – P. 2045–2051.
284. Lin K.R., Li C.L., Yen J.J., Yang-Yen H.F. Constitutive phosphorylation of GATA-1 at Serine(26) attenuates the colony-forming activity of erythrocyte-committed progenitors [Electronic resource] // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 5. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717580>

285. Lindholm L., Westerberg M., Bengtsson A. et al. A closed perfusion system with heparin coating and centrifugal pump improves cardiopulmonary bypass biocompatibility in elderly patients // *Ann. Thorac. Surg.* – 2004. – Vol. 78, N 6. – P. 2131–2138.
286. Liu C.C., Fry N.A., Hamilton E.J. et al. Redox-dependent regulation of the Na^+, K^+ pump: New twists to an old target for treatment of heart failure [Electronic resource] // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727392>
287. Liu J.J., Guo X.A., Mohandas N.M. et al. Membrane remodeling during reticulocyte maturation // *Blood.* – 2010. – Vol. 115, N 10. – P. 2021–2027.
288. Lominadze D.D., Denamb W.L. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation // *Blood.* – 2002. – N 2. – P. 235–240.
289. Luiking Y.C., Poeze M., Ramsay G., Deutz N.E. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2009. – Vol. 89. – P. 142–152.
290. Lundberg J.O., Weitzberg E., Gladwin M.T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2008. – Vol. 7. – P. 156–167.
291. Lv W., Wang L., Duan Q. et al. Characteristics of the complement system gene expression deficiency in patients with symptomatic pulmonary embolism [Electronic resource] // *Thromb. Res.* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23726092>
292. Mahajan R.C., Narain K., Mahanta J. Anaemia & expression levels of CD35, CD55 & CD59 on red blood cells in *Plasmodium falciparum* malaria patients from India // *Indian J. Med. Res.* – 2011. – Vol. 133, N 6. – P. 662–664.
293. Maher A.D., Kuchel P.W. The Gárdos channel: a review of the Ca^{2+} -activated K^+ channel in human erythrocytes // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2003. – Vol. 35, N 8. – P. 1182–1197.
294. Mandal D., Baudin-Creuzat V., Bhattacharyya A. et al. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3) // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, N 52. – P. 52551–52558.
295. Mandal D., Mazumder A., Das P. et al. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, N 47. – P. 39460–39467.
296. Mangialavori I., Villamil-Giraldo A.M., Pignataro M.F. et al. Plasma membrane calcium pump (PMCA) differential exposure of hydrophobic domains after calmodulin and phosphatidic acid activation // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, N 21. – P. 18397–18404.
297. Marcheix B., Carrier M., Martel C. et al. Effect of pericardial blood processing on postoperative inflammation and the complement pathways // *Ann. Thorac. Surg.* – 2008. – Vol. 85, N 2. – P. 530–535.

298. *Markoulaki D., Kostikas K., Papatheodorou G. et al.* Hemoglobin, erythropoietin and systemic inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease // *Eur. J. Intern. Med.* – 2011. – Vol. 22, N 1. – P. 103–107.
299. *Marshall P., Hasegawa A., Davidson E.A., Nussenzweig V.* Interaction between complement proteins C5b-7 and erythrocyte membrane sialic acid // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 184, N 4. – P. 1225–1232.
300. *Mause S.F., Weber C.* Intrusion through the fragile back door: immature plaque microvessels as entry portals for leukocytes and erythrocytes in atherosclerosis // *J. Am. College Cardiol.* – 2009. – Vol. 53, N 17. – P. 1528–1531.
301. *McNally J.S., Saxena A., Cai H. et al.* Regulation of xanthine oxidoreductase protein expression by hydrogen peroxide and calcium // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25, N 8. – P. 1623–1628.
302. *Mebarek S., Abousalham A., Magne D. et al.* Phospholipases of mineralization competent cells and matrix vesicles: roles in physiological and pathological mineralizations // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14, N 3. – P. 5036–5129.
303. *Mesquita-Casagrande A.C., Wamser M.N., de Lima D.D. et al.* In vitro stimulation of oxidative stress by hypoxanthine in blood of rats: prevention by vitamins e plus C and allopurinol // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* – 2013. – Vol. 32, N 1. – P. 42–57.
304. *Messarah M., Saoudi M., Boumendjel A. et al.* Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart // *Environ Toxicol. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 31, N 1. – P. 33–41.
305. *Metcalf R.G., Cleland L.G., Gibson R.A. et al.* Relation between blood and atrial fatty acids in patients undergoing cardiac bypass surgery // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2010. – Vol. 91, N 3. – P. 528–534.
306. *Meyer C., Heiss C., Drexhage C. et al.* Hemodialysis-induced release of hemoglobin limits nitric oxide bioavailability and impairs vascular function // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2010. – Vol. 55, N 1. – P. 454–459.
307. *Mohandas N., Gallaher P.G.* Red cell membrane: past, present, and future // *Blood.* – 2008. – Vol. 112, N 10. – P. 3939–3948.
308. *Morariu A.M., Maathuis M.H., Asgeirsdottir S.A. et al.* Acute isovolemic hemodilution triggers proinflammatory and procoagulatory endothelial activation in vital organs: role of erythrocyte aggregation // *Microcirculation.* – 2006. – Vol. 13, N 5. – P. 397–409.
309. *Morris C.R., Morris S.M., Hagar W. et al.* Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2003. – Vol. 168. – P. 63–69.
310. *Mulholland J.W., Massey W., Shelton J.C.* Investigation and quantification of the blood trauma caused by the combined dynamic forces experienced during cardiopulmonary bypass // *Perfusion.* – 2000. – Vol. 15, N6. – P. 485–494.
311. *Mullasari A.S., Balaji P., Khando T.* Managing complications in acute myocardial infarction // *J. Assoc. Physicians India.* – 2011. – Vol. 59. – P. 43–48.

312. *Munnik T., Testerink C.* Plant phospholipid signaling: “in a nutshell” // *J. Lipid Res.* – 2009. – Vol. 50. – P. 260–265.
313. *Muravyov A., Tikhomirova I.* Role Ca^{2+} in mechanisms of the red blood cells microrheological changes // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – Vol. 740. – P. 1017–1038.
314. *Musiychuk K., Sivalenka R., Jaje J. et al.* Plant-produced human recombinant erythropoietic growth factors support erythroid differentiation in vitro [Electronic resource] // *Stem. Cells Dev.* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23517237>
315. *Muzyamba M.C., Gibson J.S.* Effect of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene on K^{+} transport in normal and sickle human red blood cells // *J. Physiol.* – 2003. – Vol. 547, N 3. – P. 903–911.
316. *Myssina S., Huber S.M., Birka C. et al.* Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – Vol. 14, N 11. – P. 2750–2757.
317. *Nagy E., Eaton J.W., Jeney V. et al.* Red cells, hemoglobin, heme, iron and atherogenesis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. – Vol. 30, N 7. – P. 1347–1353.
318. *Nairz M., Sonnweber T., Schroll A. et al.* The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation // *Microbes Infect.* – 2012. – Vol. 14, N. 3. – P. 238–246.
319. *Nakamura H., Kim D.K., Philbin D.M., Peterson M.B.* Heparin-enhanced plasma phospholipase A2 activity and prostacyclin synthesis in patients undergoing cardiac surgery // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 95, N 3. – P. 1062–1070.
320. *Nakamura K., Kawahito K.* Time-related hemolysis in stored shed mediastinal blood after cardiopulmonary bypass // *J. Artif. Organs.* – 2011. – Vol. 14, N 3. – P. 264–267.
321. *Nakata K., Saitoh R., Amano J. et al.* Alteration of intracellular secretory acute phase response proteins expressed in human hepatocyte induced by exposure with interleukin-6 // *Cytokine.* – 2012. – Vol. 59, N 2. – P. 317–323.
322. *Nasso G., Costantini C., Petralia A. et al.* A new extracorporeal vacuum-assisted device to optimize cardiopulmonary bypass. Comparison with the conventional system // *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* – 2011. – Vol. 12, N 4. – P. 591–595.
323. *Neri M., Fineschi V., Di Paolo M. et al.* Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction [Electronic resource] // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23628007>
324. *Ney P.A.* Normal and disordered reticulocyte maturation // *Curr. Opin. Hematol.* – 2011. – Vol. 18, N 3. – P. 152–157.
325. *Nigam P.K., Narain V.S., Kumar A.* Sialic acid in cardiovascular diseases // *Indian J. Clin. Biochem.* – 2006. – Vol. 21, N 1. – P. 54–61.

326. *Nigam S., Schewe T.* Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1488, N 1–2. – P. 167–181.
327. *Nilsson B., Ekdahl K.N., Mollnes T.E., Lambris J.D.* The role of complement in biomaterial-induced inflammation // *Mol. Immunol.* – 2007. – Vol. 44, N 1–3. – P. 82–94.
328. *Nishino T., Okamoto K., Eger B.T. et al.* Mammalian xanthine oxidoreductase – mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase // *FEBS J.* – 2008. – Vol. 275, N 13. – P. 3278–3289.
329. *Nitescu N., Bengtsson A., Bengtsson J.P.* Blood salvage with a continuous autotransfusion system compared with a haemofiltration system // *Perfusion.* – 2002. – Vol. 17, N 5. – P. 357–362.
330. *Noguchi M., Eishi K., Tada S. et al.* Biocompatibility of poly-2-methoxyethylacrylate coating for cardiopulmonary bypass // *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2003. – Vol. 9, N 1. – P. 22–28.
331. *Noh J.Y., Lim K.M., Bae O.N. et al.* Procoagulant and prothrombotic activation of human erythrocytes by phosphatidic acid // *Am. J. Physiol. Heart Circulator Physiol.* – 2010. – Vol. 299, N 2. – P. 347–355.
332. *Nohl H., Kozlov A.V., Gille L., Staniek K.* Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts // *Biochem. Soc. Trans.* – 2003. – Vol. 31, N 6. – P. 1308–1311.
333. *Ochoa J., Vilchez M., Palacios M. et al.* Melatonin protects against lipid peroxidation and membrane rigidity in erythrocytes from patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery // *J. Pineal. Res.* – 2003. – Vol. 35, N 2. – P. 104–108.
334. *Ochoa J.J., Vilchez M.J., Ibáñez S. et al.* Oxidative stress is evident in erythrocytes as well as plasma in patients undergoing heart surgery involving cardiopulmonary bypass // *Free Radic. Res.* – 2003. – Vol. 37, N 1. – P. 11–17.
335. *Ogasawara Y., Funakoshi M., Ishii K.* Pyruvate kinase is protected by glutathione-dependent redox balance in human red blood cells exposed to reactive oxygen species // *Biol. Pharm. Bull.* – 2008. – Vol. 31, N 10. – P. 1875–1881.
336. *Ohi H., Tamano M., Sudo S., Okada N.* Recombinant EPO therapy increases erythrocyte expression of complement regulatory proteins // *Am. J. Kidney Dis.* – 2003. – Vol. 41, N 1. – P. 179–185.
337. *Ohvo-Rekilä H., Ramstedt B., Leppimäki P., Slotte J.P.* Cholesterol interactions with phospholipids in membranes // *Progress in lipid research.* – 2004. – Vol. 41, N 1. – P. 66–97.
338. *Oostendorp M., van Solinge W.W., Kemperman H.* Potassium but not lactate dehydrogenase elevation due to in vitro hemolysis is higher in capillary than in venous blood samples // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2012. – Vol. 136. – P. 1262–1265.
339. *Pangburn M.K., Ferreira V.P., Cortes C.D.* Discrimination between host and pathogens by the complement system // *Vaccine.* – 2008. – Vol. 26, N 8. – P. 15–21.

340. Papadopoulos N., Bakhtiary F., Grün V. et al. The effect of normovolemic modified ultrafiltration on inflammatory mediators, endotoxins, terminal complement complexes and clinical outcome in high-risk cardiac surgery patients // *Perfusion*. – 2013. – Vol. 28, N 4. – P. 306–314.
341. Paparella D., Yau T.M., Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update // *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* – 2002. – Vol. 21, N 2. – P. 232–244.
342. Pasterkamp G., Daemen M. Circulating cells: the biofactory for markers of atherosclerotic disease // *Eur. Heart J.* – 2008. – Vol. 29. – P. 2701–2702.
343. Pavliuk N.V., Krysko O.M., Klymyshyn N.I. et al. State of antioxidant and oxygen transport system of the blood in the process of adaptation of the body to hypoxic hypoxia // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 1998. – Vol. 70, N 4. – P. 58–64.
344. Pawlak W., Kedziora J., Zolynski K. et al. Effect of long term bed rest in men on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes // *J. Gravim. Physiol.* – 1998. – Vol. 5, N 1. – P. 163–164.
345. Peng X., Frohman M.A. Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles // *Acta Physiol. (Oxf)*. – 2012. – Vol. 204, N 2. – P. 219–226.
346. Pengpanichpakdee N., Thadtapong T., Auparakkitanon S., Wilairat P. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase sulphhydryl modifications: implication for oxidized red cell // *South-East Asian J. Trop Med. Public Health.* – 2012. – Vol. 43, N 5. – P. 1252–1257.
347. Perrone S., Tataranno M.L., Stazzoni G. et al. Oxidative injury in neonatal erythrocytes // *J. Matern. Fetal Neonatal. Med.* – 2012. – Vol. 25, N 5. – P. 104–108.
348. Piccoli A.K., Alegretti A.P., Schneider L. et al. Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35, and CD46 in rheumatoid arthritis // *Rev. Bras. Reumatol.* – 2011. – Vol. 51, N 5. – P. 503–510.
349. Polomsky M., Puskas J.D. Off-pump coronary artery bypass grafting – the current state // *Circ. J.* – 2012. – Vol. 76, N 4. – P. 784–790.
350. Pregi N., Wenker S., Vittori D. et al. TNF-alpha-induced apoptosis is prevented by erythropoietin treatment on SH-SY5Y cells // *Exp. Cell Res.* – 2009. – Vol. 315, N 3. – P. 419–431.
351. Quimby K.R., Greenidge A., Harris A., Landis R.C. Phenotypic commitment of monocytes towards a protective hemoglobin scavenging phenotype (CD14(pos)CD163(high)HLA-DR(low)) following cardiopulmonary bypass // *Cytometry B Clin. Cytom.* – 2010. – Vol. 78, N 5. – P. 357–360.
352. Radanova M., Vasilev V., Deliyaska B. et al. Anti-C1q autoantibodies specific against the globular domain of the C1qB-chain from patient with lupus nephritis inhibit C1q binding to IgG and CRP // *Immunobiology.* – 2012. – Vol. 217, N 7. – P. 684–691.
353. Rampling M.W., Martin G. Albumin and rouleaux formation // *Clin. Hemorheol.* – 1992. – N 12. – P. 761–765.

354. *Reeder B.J., Grey M., Silaghi-Dumitrescu R.L. et al.* Tyrosine residues as redox cofactors in human hemoglobin: Implications for engineering nontoxic blood substitutes // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 30780–30787.
355. *Reiter C.D., Wang X., Tanus-Santos J.E. et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease // *Nat. Med.* – 2002. – Vol. 8. – P. 1383–1389.
356. *Rhodes M.M., Kopsombut P., Bondurant M.C. et al.* Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin // *Blood.* – 2008. – Vol. 111, N 3. – P. 1700–1708.
357. *Rong J., Ye S., Wu Z.K. et al.* Controlled oxygen reperfusion protects the lung against early ischemia-reperfusion injury in cardiopulmonary bypasses by downregulating high mobility group box 1 // *Exp. Lung. Res.* – 2012. – Vol. 38, N 4. – P. 183–191.
358. *Rosenson R.S., Hurt-Camejo E.* Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis // *Eur. Heart J.* – 2012. – Vol. 33, N 23. – P. 2899–2909.
359. *Rother R.P., Bell L., Hillmen P., Gladwin M.T.* The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease // *JAMA.* – 2005. – Vol. 293, N 13. – P. 1653–1662.
360. *Sabaa N., de Franceschi L., Bonnin P. et al.* Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118, N 5. – P. 1924–1933.
361. *Sailaja Y.R., Baskar R., Saralakumari D.* The antioxidant status during maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics // *Free Radic Biol. Med.* – 2003. – Vol. 35, N 2. – P. 133–139.
362. *Sakuma S., Kitamura T., Kuroda C. et al.* All-trans Arachidonic acid generates reactive oxygen species via xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase interconversion in the rat liver cytosol *in vitro* // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2012. – Vol. 51, N 1. – P. 55–60.
363. *Sancilio S., di Giacomo V., Quaglietta A.M. et al.* TRAIL promotes a pro-survival signal in erythropoietin-deprived human erythroblasts through the activation of an NF- κ B/I κ B α pathway // *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* – 2011. – Vol. 25, N 3. – P. 375–386.
364. *Sarrazin S., Sieweke M.* Integration of cytokine and transcription factor signals in hematopoietic stem cell commitment // *Semin Immunol.* – 2011. – Vol. 23, N 5. – P. 326–334.
365. *Schaer C.A., Vallelian F., Imhof A. et al.* CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system // *J. Leukoc. Biol.* – 2007. – Vol. 82, N 1. – P. 106–110.
366. *Schlaf G., Demberg T., Koleva M. et al.* Complement factor I is upregulated in rat hepatocytes by interleukin-6 but not by interferon- γ , interleukin-1 β , or tumor necrosis factor- α // *Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 382, N 7. – P. 1089–1094.

367. *Selle H., Chapman B.E., Kuchel P.W.* Glycerophosphocholine release in human erythrocytes. ¹H spin-echo and ³¹P-NMR evidence for lysophospholipase // *Eur. J. Biochem.* – 1993. – Vol. 212, N 2. – P. 411–416.
368. *Shahid S.M., Mahboob T.* Electrolytes and Na⁺,K⁺-ATPase: potential risk factors for the development of diabetic nephropathy // *Pak. J. Pharm. Sci.* – 2008. – Vol. 21, N 2. – P. 172–179.
369. *Shao J., Miyata T., Yamada K. et al.* Protective role of nitric oxide in a model of thrombotic microangiopathy in rats // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2001. – Vol. 12, N 10. – P. 2088–2097.
370. *Shiva S., Gladwin M.T.* Nitrite mediates cytoprotection after ischemia/reperfusion by modulating mitochondrial function // *Basic Res. Cardiol.* – 2009. – Vol. 104. – P. 113–119.
371. *Sigurjonsson H., Helgadóttir S., Oddsson S.J. et al.* Outcome of myocardial revascularisation in Iceland // *Laeknabladid.* – 2012. – Vol. 98, N 9. – P. 451–456.
372. *Simons A.P., Wortel P., van Kan R.A. et al.* Pulse conductance and flow-induced hemolysis during pulsatile cardiopulmonary bypass // *Artif. Organs.* – 2010. – Vol. 34, N 4. – P. 289–294.
373. *Sohal R.S., Orr W.C.* The redox stress hypothesis of aging // *Free Radic Biol. Med.* – 2012. – Vol. 52, N 3. – P. 539–555.
374. *Spanier T., Tector K., Schwartz G. et al.* Endotoxin in pooled pericardial blood contributes to the systemic inflammatory response during cardiac surgery // *Perfusion.* – 2000. – Vol. 15, N 5. – P. 427–431.
375. *Spengler M.I., Svetaz M.J., Leroux M.B. et al.* Erythrocyte aggregation in patients with systemic lupus erythematosus // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2011. – Vol. 47, N 4. – P. 279–285.
376. *Steffen P., Verdier C., Wagner C.* Quantification of depletion-induced adhesion of red blood cells [Electronic resource] // *Phys. Rev. Lett.* – 2013. – Vol. 110, N 1. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Quantification+of+depletion-induced+adhesion+of+red+blood+cells>
377. *Suhail M.* Na⁺,K⁺-ATPase: ubiquitous multifunctional transmembrane protein and its relevance to various pathophysiological conditions // *J. Clin. Med. Res.* – 2010. – Vol. 2, N 1. – P. 1–17.
378. *Svenmarker S., Jansson E., Stenlund H., Engstrom K.* Red blood cell trauma during cardiopulmonary bypass: narrow pore filterability versus free hemoglobin // *Perfusion.* – 2000. – Vol. 15, N 1 – P. 33–40.
379. *Testa L., van Gaal W.J., Bhindi R. et al.* Pexelizumab in ischemic heart disease: a systematic review and meta-analysis on 15,196 patients // *J. Thoracic. Cardiovasc. Surg.* – 2008. – Vol. 36, N 4. – P. 884–893.
380. *Tiffert T., Daw N., Etzion Z. et al.* Age decline in the activity of the Ca²⁺-sensitive K⁺ channel of human red blood cells // *J. Gen. Physiol.* – 2007. – Vol. 129, N 5. – P. 429–436.

381. *Tiffert T., Lew V.L.* Elevated intracellular Ca^{2+} reveals a functional membrane nucleotide pool in intact human red blood cells // *J. Gen. Physiol.* – 2011. – Vol. 138, N 4. – P. 381–391.
382. *Tolosano E., Fagoonee S., Morello N. et al.* Heme scavenging and the other facets of hemopexin // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12, N 2. – P. 305–320.
383. *Traumatic cardiac hemolytic anemia* / A.J. Erslev // *Williams Hematology* / ed. E. Butler, M.A. Lichtman, B.S. Coler et al. – 6th ed. – Mc Graw Hill, 2001. – Chapter 50. – P. 619–621.
384. *Tsukamoto H., Horiuchi T.* Clinical aspects of the complement system // *Rinsho Byori.* – 2006. – Vol. 54, N 7. – P. 757–762.
385. *Tziakas D., Chalikias G., Grapsa A. et al.* Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2012. – Vol. 51, N 4. – P. 243–254.
386. *Tziakas D.N., Chalikias G.K., Stakos D. et al.* Independent and additive predictive value of total cholesterol content of erythrocyte membranes with regard to coronary artery disease clinical presentation // *Int. J. Cardiol.* – 2011. – Vol. 150, N 1. – P. 22–27.
387. *Tziakas D.N., Chalikias G.K., Tentis I.K. et al.* Interleukin-8 is increased in the membrane of circulating erythrocytes in patients with cutecoronary syndrome // *Eur. Heart J.* – 2008. – Vol. 29, N 22. – P. 2713–2722.
388. *Umenishi F., Kajii E., Ikemoto S., Umenishi F.* Molecular analysis of Rh polypeptides in a family with RhD-positive and RhD-negative phenotypes // *The Biochem. J.* – 1994. – Vol. 299. – P. 207–211.
389. *Valencak T.G., Ruf T.* Phospholipid composition and longevity: lessons from Ames dwarf mice [Electronic resource] // *Age (Dordr).* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640425>
390. *van Boven W.J., Gerritsen W.B., Driessen A.H. et al.* Myocardial oxidative stress, and cell injury comparing three different techniques for coronary artery bypass grafting // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2008. – Vol. 34, N 5. – P. 969–975.
391. *van de Poll M.C., Hanssen S.J., Berbee M. et al.* Elevated plasma arginase-1 does not affect plasma arginine in patients undergoing liver resection // *Clin. Sci. (Lond).* 2008. – Vol. 114. – P. 231–241.
392. *van den Goor J., Nieuwland R., van den Brink A. et al.* Reduced complement activation during cardiopulmonary bypass does not affect the postoperative acute phase response // *Eur. J. Cardio-thoracic. Surg.* – 2004. – Vol. 26, N 5. – P. 926–931.
393. *van der Meer P., Lipsic E., Westenbrink B.D. et al.* Levels of hematopoiesis inhibitor N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline partially explain the occurrence of anemia in heart failure // *Circulation.* – 2005. – Vol. 112, N 12. – P. 1743–1747.
394. *Vercaemst L.* Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: A review in search of a treatment algorithm // *The J. of Extra Corporeal Technology.* – 2008 – Vol. 40, N 4. – P. 257–267.

395. Vermeulen-Windsant I.C., Hanssen J.S., Buurman W.A., Jacobs M.J. Cardiovascular surgery and organ damage: Time to reconsider the role of hemolysis // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2011. – Vol. 142, N 1. – P. 1–11.
396. Vittori D., Vota D., Callero M. et al. C-FLIP is involved in erythropoietin-mediated protection of erythroid-differentiated cells from TNF-alpha-induced apoptosis // Cell Biol. Int. – 2010. – Vol. 34, N. 6. – P. 621–630.
397. Voigt A., Rahnefeld A., Kloetzel P.M., Krüger E. Cytokine-induced oxidative stress in cardiac inflammation and heart failure-how the ubiquitin proteasome system targets this vicious cycle [Electronic resource] // Front Physiol. – 2013. – Vol. 4. – P. 42. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508734>
398. von Beckerath N., Koch W., Mehilli J. et al. ABO locus O1 allele and risk of myocardial infarction // Blood Coagul. Fibrinolysis. – 2004. – Vol. 15, N 1. – P. 61–67.
399. Vota D.M., Maltaner R.E., Wenker S.D. et al. Differential erythropoietin action upon cells induced to eryptosis by different agents // Cell Biochem. Biophys. – 2013. – Vol. 65, N 2. – P. 145–157.
400. Wan S., LeClerc J.L., Vincent J.L. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies // Chest. – 1997. – Vol. 112, N 3. – P. 676–692.
401. Watanabe N., Sakota D., Ouchi K., Takatani S. Deformability of red blood cells and it's relation to blood trauma in rotary blood pumps // Artif. Organs. – 2007. – Vol. 31, N 5. – P. 352–358.
402. Watkins N.J., Braidley P., Bray C.J. et al. Coating of human decay accelerating factor (hDAF) onto medical devices to improve biocompatibility // Immunopharmacology. – 1997. – Vol. 38, N 1–2. – P. 111–118.
403. Wehlin L., Vedin J., Vaage J., Lundahl J. Activation of complement and leukocyte receptors during on- and off pump coronary artery bypass surgery // Eur. J. Cardio-thoracic Surg. – 2004. – Vol. 25. – P. 35–42.
404. Wenger R.H., Kurtz A. Erythropoietin // Compr. Physiol. – 2011. – Vol. 1, N. 4. – P. 1759–1794.
405. Winterhalter M., Antoniou T., Loukanov T. Management of adult patients with perioperative pulmonary hypertension: technical aspects and therapeutic options // Cardiology. – 2010. – Vol. 116. – P. 3–9.
406. Won H.S., Kim H.G., Yun Y.S. et al. IL-6 is an independent risk factor for resistance to erythropoiesis-stimulating agents in hemodialysis patients without iron deficiency // Hemodial. Int. – 2012. – Vol. 16, N. 1. – P. 31–37.
407. Wright G. Haemolysis during cardiopulmonary bypass: update // Perfusion. – 2001. – Vol. 16, N 5. – P. 345–351.
408. Wu G., Hu W., Shahsafaei A. et al. Complement regulator CD59 protects against atherosclerosis by restricting the formation of complement membrane attack complex // Circulation research. – 2009. – Vol. 104, N 4. – P. 550–558.

409. Wulff H., Castle N.A. Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: recent advances and promising trends // *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 3, N 3. – P. 385–396.
410. Xiao W., Koizumi K., Nishio M. et al. Tumor necrosis factor- α inhibits generation of glycophorin A⁺ cells by CD34⁺ cells // *Exp. Hematol.* – 2002. – Vol. 30, N 11. – P. 1238–1247.
411. Yazdanbakhsh K., Kang S., Tamasauskas D. et al. Complement receptor 1 inhibitors for prevention of immune-mediated red cell destruction: potential use in transfusion therapy // *Blood.* – 2003. – Vol. 101, N 12. – P. 5046–5052.
412. Yazer M.H., Waters J.H., Elkin K.R. et al. A comparison of hemolysis and red cell mechanical fragility in blood collected with different cell salvage suction devices // *Transfusion.* – 2008. – Vol. 48. – P. 1188–1191.
413. Young R.W. Hyperoxia: a review of the risks and benefits in adult cardiac surgery // *J. Extra Corpor. Technol.* – 2012. – Vol. 44, N 4. – P. 241–249.
414. Yuan P., Leonetti M.D., Hsiung Y., MacKinnon R. Open structure of the Ca²⁺ gating ring in the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel // *Nature.* – 2011. – Vol. 481, N 7379. – P. 94–97.
415. Zhang L., Zhao J., Su L., Huang B. et al. D609 inhibits progression of preexisting atheroma and promotes lesion stability in apolipoprotein e^{-/-} mice: A role of phosphatidylcholine-specific phospholipase in atherosclerosis // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – Vol. 30. – P. 411–418.
416. Zhang S., Yao S.J. The protective effect of propofol on erythrocytes during cardiopulmonary bypass // *Huazhong. Univ. Sci. Techn. Med. Sci.* – 2004. – Vol. 24, N 2. – P. 199–201.
417. Zhang Z.G., Zhang X.W. Mechanical behavior of the erythrocyte in microvessel stenosis // *Science China.* – 2011. – Vol. 54, N 5. – P. 450–458.
418. Zhao S., Wu J. Hypoxia inducible factor stabilization as a novel strategy to treat anemia // *Curr. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 20, N 21. – P. 2697–2711.
419. Zhao Y., Lan K., Wang X. et al. Increased oxidative damages of erythrocytes caused by declined blood oxygen saturation // *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* – 2012. – Vol. 29, N 2. – P. 323–327.
420. Zhong Y., Tang H., Zeng Q. et al. Total cholesterol content of erythrocyte membranes is associated with the severity of coronary artery disease and the therapeutic effect of rosuvastatin // *Ups. J. Med. Sci.* – 2012. – Vol. 117, N 4. – P. 390–398.
421. Zhou Z., Han H., Cruz M.A. et al. Haemoglobin blocks von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS-13: a mechanism associated with sickle cell disease // *Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 101, N 6. – P. 1070–1077.
422. Ziobro A., Duchnowicz P., Mulik A. et al. Oxidative damages in erythrocytes of patients with metabolic syndrome // *Mol. Cell Biochem.* 2013. – Vol. 378, N 1–2. – P. 267–273.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Таблица П.1

Клиническая характеристика исследуемых групп больных ишемической болезнью сердца до операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатель		Больные ИБС	
		с умеренным послеоперацион- ным гемолизом	с выраженным послеоперацион- ным гемолизом
Количество больных:		98	52
мужчины, %		85,71	90,38
женщины, %		14,29	9,62
Возраст, лет		59,42 ± 1,08	59,38 ± 1,22
Длительность ИБС, лет		5,08 ± 0,94	5,33 ± 1,04
Функциональный класс стенокардии напряже- ния, %	II	18,37 ± 3,93	19,52 ± 5,55
	III	76,53 ± 4,30	71,16 ± 6,34
	IV	5,10 ± 2,23	9,62 ± 4,13
Функциональный класс не- достаточности кровообра- щения (по ЛУНА), %	I	11,22 ± 3,21	5,77 ± 3,27
	II	80,61 ± 4,01	76,92 ± 5,90
	III	8,17 ± 2,78	17,31 ± 5,30
Фракция выброса левого желудочка, %		62,95 ± 1,81	58,48 ± 2,24
Холестерол в плазме крови, ммоль/л		4,66 ± 0,25	5,25 ± 0,26
Гипертоническая болезнь III степе- ни, %		92,59 ± 2,61	91,67 ± 3,73
ХНМК, %		14,28 ± 3,55	17,31 ± 5,30
Хроническая венозная недостаточ- ность, %		18,37 ± 3,93	21,15 ± 5,72
Сахарный диабет 2-го типа, %		14,28 ± 3,55	15,39 ± 5,05
Дисфункция щитовидной железы, %		10,21 ± 3,07	3,85 ± 2,69
Дисфункция предстательной железы, %		18,37 ± 3,93	9,62 ± 4,13

Приложение

Окончание табл. П.1

Показатель	Больные ИБС	
	с умеренным послеоперацион- ным гемолизом	с выраженным послеоперацион- ным гемолизом
Патология желудочно-кишечного тракта:		
язвенная болезнь желудка и (или) ДПК, %	18,37 ± 3,93	17,31 ± 5,30
гастриты, %	66,33 ± 4,80	75,00 ± 6,06
Заболевания печени и желчевыводящих путей, %	25,51 ± 4,43	42,31 ± 6,92
Заболевания мочевыделительной системы, %	40,82 ± 6,34	21,15 ± 5,72 <i>p</i> < 0,05
в том числе с нарушением фильтрационной способности почек, %	21,42 ± 4,17	3,85 ± 2,69 <i>p</i> < 0,01
Заболевания легких, %	10,21 ± 3,07	32,69 ± 6,57 <i>p</i> < 0,01
Периоперационный риск по Euroscor, %	2,00 ± 0,23	2,96 ± 0,54

Примечание. Здесь и в табл. 2–19: NYHA (New York Heart Association) – Нью-Йоркская ассоциация сердца; ХНМК – хроническая недостаточность мозгового кровообращения; ДПК – двенадцатиперстная кишка; *p* – уровень статистической значимости различий между показателями у пациентов с умеренным и выраженным гемолизом.

Таблица П. 2

Спектр лекарственных препаратов, применяемых для лечения больных ишемической болезнью сердца до операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Лекарственный препарат	Больные ИБС			
	с умеренным послеоперационным гемолизом ($n = 52$)		с выраженным послеоперационным гемолизом ($n = 44$)	
	Доля больных, %	Доза, мг/сут	Доля больных, %	Доза, мг/сут
Нитраты (изосорбид-5-мононитрат)	$38,46 \pm 6,81$	$47,60 \pm 9,76$	$50,00 \pm 7,63$	$49,55 \pm 7,58$
Бета1-адреноблокаторы:				
бисопролол	$73,08 \pm 6,21$	—	$72,73 \pm 6,79$	—
метопролол	$57,69 \pm 6,92$	$5,08 \pm 1,65$	$40,91 \pm 7,49$	$5,00 \pm 1,02$
	$15,39 \pm 5,05$	$43,75 \pm 6,25$	$36,36 \pm 7,34$	$43,75 \pm 4,09$
			$p < 0,05$	
Блокаторы Ca^{2+} -каналов:				
фелодипин	$61,54 \pm 8,62$	—	$45,45 \pm 7,59$	—
амлодипин	$46,15 \pm 6,98$	$5,83 \pm 0,59$	$40,91 \pm 7,49$	$6,04 \pm 0,89$
	$15,39 \pm 5,05$	$4,38 \pm 0,63$	$6,82 \pm 3,84$	$5,00 \pm 0,00$
Ингибиторы АПФ:				
спироприл	$53,85 \pm 6,98$	—	$54,54 \pm 7,59$	—
периндоприл	$23,08 \pm 5,90$	$5,50 \pm 0,50$	$18,18 \pm 5,88$	$5,25 \pm 0,75$
эналаприл	$13,46 \pm 4,77$	$5,00 \pm 0,00$	$27,27 \pm 6,79$	$4,67 \pm 0,83$
	$15,39 \pm 5,05$	$16,25 \pm 8,00$	$2,27 \pm 2,27$	$20,00 \pm 0,00$
			$p < 0,05$	
фозиноприл	$3,85 \pm 2,69$	$5,00 \pm 0,00$	$22,73 \pm 6,39$	$7,00 \pm 1,23$
			$p < 0,01$	
Диуретики:				
индапамид	$15,39 \pm 5,05$	—	$18,18 \pm 5,88$	—
спиронолактон	$11,54 \pm 4,47$	$2,50 \pm 0,00$	$9,09 \pm 4,34$	$2,00 \pm 0,50$
фуросемид	$3,85 \pm 2,69$	$25,00 \pm 0,00$	$4,55 \pm 3,18$	$25,00 \pm 0,00$
	$3,85 \pm 2,69$	$35,00 \pm 5,00$	$4,55 \pm 3,18$	$25,00 \pm 5,00$
Антиагреганты:				
аспирин	$65,39 \pm 6,66$	—	$47,73 \pm 7,62$	—
клопидогрел	$65,39 \pm 6,66$	$77,94 \pm 3,64$	$47,73 \pm 7,62$	$85,00 \pm 5,53$
	$11,54 \pm 4,47$	$75,00 \pm 0,00$	$9,09 \pm 4,34$	$62,50 \pm 12,50$

Приложение

Окончание табл. П.2

Лекарственный препарат	Больные ИБС			
	с умеренным послеоперационным гемолизом (n = 52)		с выраженным послеоперационным гемолизом (n = 44)	
	Доля больных, %	Доза, мг/сут	Доля больных, %	Доза, мг/сут
Антикоагулянты:	57,69 ± 6,92	–	72,73 ± 6,79	–
гепарин	50,00 ± 7,00	18,85 ± 1,62	59,09 ± 7,50	18,08 ± 1,07
фраксипарин	7,69 ± 3,73		13,64 ± 5,23	
Статины:	69,23 ± 6,46	–	54,55 ± 7,59	–
аторвастатин	34,62 ± 6,66	22,22 ± 3,64	22,73 ± 6,39	20,00 ± 7,07
симвастин	38,46 ± 6,81	19,00 ± 1,00	36,36 ± 7,34	20,00 ± 0,00
Гипогликемические	7,69 ± 3,73	–	13,64 ± 5,23	–
Противоязвенные:	15,39 ± 5,05	–	13,64 ± 5,23	–
омепрозол	11,54 ± 4,47	26,67 ± 6,67	9,09 ± 4,34	30,00 ± 0,00
ранитидин	3,85 ± 2,69	300,00 ± 0,00	4,55 ± 3,18	300,00 ± 0,00
Антибиотики	7,69 ± 3,73	–	6,82 ± 3,84	–
НПВС	9,62 ± 4,13	–	9,09 ± 4,34	–

Примечание. АПФ – ангиотензин-превращающий фермент, НПВС – нестероидные противовоспалительные средства.

Таблица П.3
Показатели эритропоеза и эритролизиса у больных ишемической болезнью сердца до и после операции
в условиях искусственной вентиляции (А + в)

Показатель	Значения до операции (а - б)	Безопасные ИВС	
		с умеренным деконфузион- ным эффектом (а - в)	с выраженным постдеффузион- ным эффектом (а - в)
Концентрация гемоглоби- на, ммоль/л в плазме крови, ммоль/л	$7,67 \pm 0,47$ $p_1 < 0,05$	$71,73 \pm 0,97$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	$10,60 \pm 0,51$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,05$
Концентрация гемоглоби- на в плазме крови, ммоль/л	$14,17 \pm 1,28$ $136,70 \pm 10,78$	$63,00 \pm 8,27$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	$161,71 \pm 7,98$ $p_1 < 0,05$
Средняя скорость гемо- лизиса, г/л/ч		$0,0235 \pm 0,0033$	$0,0457 \pm 0,0039$ $p_1 < 0,001$
Средняя скорость гемо- лизиса, г/л/ч	$30,62 \pm 0,84$		$31,88 \pm 1,02$
Средняя скорость гемо- лизиса, г/л/ч	$7,41 \pm 0,44$ $10,00 \pm 0,47$ $p_1 < 0,001$	$18,72 \pm 0,76$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	$13,84 \pm 0,54$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$
Концентрация БРЭ в плазме крови, мМЕ/л	$11,24 \pm 1,00$ $14,91 \pm 0,29$ $p_1 < 0,05$	$22,65 \pm 1,64$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,001$	$11,10 \pm 0,34$ $p_1 < 0,05$
Концентрация ТБЭ в плазме крови	$1,27 \pm 0,20$ $3,78 \pm 0,29$ $p_1 < 0,001$	$7,32 \pm 1,27$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$	$1,95 \pm 0,22$ $p_1 < 0,02$

Примечание. Значения в табл. 1,5-19; p_1 - различия между группами до операции и группами по времени в послеоперационном периоде (в контроле); p_2 - по сравнению с показателями у пациентов с ишемической болезнью сердца, находящихся в отделении интенсивной терапии и искусственной вентиляции легких, находящихся в отделении интенсивной терапии и искусственной вентиляции легких.

Приложение

Таблица П. 4

**Характеристика перфузиологического этапа операции коронарного шунтирования
у больных ишемической болезнью сердца ($\bar{X} \pm m$)**

Показатель		Больные ИБС	
		с умеренным послеоперационным гемолизом (n = 52)	с выраженным послеоперационным гемолизом (n = 44)
Длительность искусственного кровообращения, мин		100,15 ± 2,73	123,10 ± 5,37 p < 0,001
Длительность ишемии миокарда, мин		65,92 ± 5,20	88,74 ± 7,19 p < 0,01
ОСП средняя, л/мин		5,27 ± 0,11	5,21 ± 0,09
ОСП максимальная, л/мин		5,38 ± 0,13	5,39 ± 0,11
pO ₂ среднее, мм рт. ст.		150,80 ± 5,87	149,18 ± 5,28
pO ₂ максимальное, мм рт. ст.		185,02 ± 6,02	207,54 ± 5,29 p < 0,05
HbO ₂ среднее, %		98,34 ± 0,51	98,57 ± 0,26
HbO ₂ минимальное, %		97,01 ± 0,82	97,20 ± 0,43
Hct средний, %		24,75 ± 1,12	24,53 ± 0,75
Hct минимальный, %		23,09 ± 0,77	22,88 ± 0,70
Температура перфузии средняя, °С		36,08 ± 0,14	36,12 ± 0,35
Температура перфузии минимальная, °С		35,44 ± 0,15	35,75 ± 0,27
Интраоперационная кровопотеря, мл		956,00 ± 27,73	1047,83 ± 20,75 p < 0,05
Диурез, мл		1930,00 ± 155,72	2173,91 ± 166,36
Интенсивность работы коронарного отсоса, мл/мин		683,34 ± 46,69	646,27 ± 50,12
Доля больных с различным количеством шунтированных артерий, %	2 артерии	25,00 ± 6,06	9,09 ± 4,38
	3 артерии	42,31 ± 6,92	45,83 ± 7,60
	4 артерии	28,85 ± 6,34	40,91 ± 7,49
	5 артерий	3,85 ± 2,69	4,55 ± 3,18

Примечание. ОСП – объемная скорость перфузии; pO_2 – парциальное давление кислорода в крови; HbO₂ – степень насыщения гемоглобина кислородом; Hct – гематокрит.

Таблица П.5
Агрессивная способность эритроцитов, содержащих гликоформы А' и В' крапчатых клещей
в крови и фибриногене в плазме крови у больных вирусического происхождения и после операции
в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Здоровые доб- роты (n = 30)	Таблица П.5			
		с умеренным постерфузион- ным гемолизом (n = 5)		с выраженным постерфуз- ционным гемолизом (n = 28)	
		до операции	после операции	до операции	после операции
Коэффициент агрегации эритроцитов, усл. ед.	$0,412 \pm 0,020$	$0,434 \pm 0,016$	$0,483 \pm 0,024$	$0,489 \pm 0,018$ $p_1 < 0,05$	$0,551 \pm 0,038$ $p_2 < 0,05$
Количество эритроцитов в агрегате, шт	$9,02 \pm 1,32$	$8,62 \pm 0,54$	$9,08 \pm 0,74$	$9,90 \pm 0,80$	$9,07 \pm 0,82$
Содержание в крови глико- формы А' эритроцитов, %	$91,70 \pm 1,21$	$87,40 \pm 1,47$ $p_1 < 0,05$	$95,22 \pm 1,20$ $p_1 < 0,01$	$91,82 \pm 2,55$	$92,33 \pm 1,12$
Содержание в крови глико- формы В' эритроцитов, %	$99,60 \pm 1,90$	$68,86 \pm 1,54$ $p_2 < 0,01$	$77,29 \pm 1,42$ $p_1 < 0,01$	$75,37 \pm 2,73$	$75,61 \pm 1,21$
Концентрация фибриногена в плазме крови, г/л	$3,31 \pm 0,15$	$2,44 \pm 0,16$	$2,0 \pm 0,14$	$4,29 \pm 0,13$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$	$3,54 \pm 0,21$ $p_2 < 0,05$

Приложение

Таблица П. 6

Морфологическая характеристика эритроцитов периферической крови у кардиохирургических больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

	Содержание		
	дискоцитов в крови, %	эхиноцитов в крови, %	эритроцитов с неэхиноцитарной трансформацией, %
Здоровые доноры ($n = 15$)	$97,62 \pm 0,75$	$1,28 \pm 0,41$	$0,93 \pm 0,35$
Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом ($n = 20$)			
До операции	$95,7 \pm 0,82$ $p_k < 0,05$	$2,40 \pm 0,59$ $p_k < 0,05$	$1,86 \pm 0,54$ $p_k < 0,05$
После операции	$97,42 \pm 0,91$	$1,34 \pm 0,64$	$0,81 \pm 0,34$
Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом ($n = 14$)			
До операции	$94,50 \pm 1,79$ $p_k < 0,05$	$1,42 \pm 0,37$ $p_2 < 0,05$	$2,80 \pm 0,56$ $p_k < 0,05$ $p_2 < 0,05$
После операции	$86,50 \pm 3,97$ $p_k < 0,01$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,01$	$9,38 \pm 2,67$ $p_k < 0,01$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,01$	$4,13 \pm 1,19$ $p_k < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Таблица П. 7

Механическая резистентность и деформируемость эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца до и после операции в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

	Механическая резистентность эритроцитов, %	Индекс ригидности эритроцитов, усл. ед.
Здоровые доноры ($n = 17$)	$2,82 \pm 0,44$	$76,68 \pm 10,31$
Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом ($n = 43$)		
До операции	$5,11 \pm 0,35$ $p_k < 0,001$	$83,68 \pm 13,90$
После операции	$5,56 \pm 0,36$ $p_k < 0,001$	$72,96 \pm 9,68$
Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом ($n = 21$)		
До операции	$3,65 \pm 0,41$ $p_2 < 0,05$	$144,02 \pm 16,57$ $p_k < 0,05$ $p_2 < 0,05$
После операции	$4,62 \pm 0,50$ $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$	$124,25 \pm 16,08$ $p_k < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Приложение

Таблица П. 8

Содержание холестерина и фосфолипидов в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца до и после операции в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Здоровые доноры (n = 15)	Больные ИБС			
		с умеренным постперфузионным гемолизом (n = 18)		с выраженным постперфузионным гемолизом (n = 16)	
		до операции	после операции	до операции	после операции
Холестерол, ммоль/мг белка	0,49 ± 0,02	0,66 ± 0,02 $p_k < 0,001$	0,61 ± 0,03 $p_k < 0,01$	0,58 ± 0,02 $p_k < 0,05$ $p_2 < 0,05$	0,60 ± 0,03 $p_k < 0,05$
Фосфолипиды, ммоль/мг белка	0,52 ± 0,01	0,47 ± 0,02 $p_k < 0,05$	0,49 ± 0,01 $p_k < 0,05$	0,46 ± 0,02 $p_k < 0,05$	0,43 ± 0,03 $p_k < 0,05$
Соотношение холестерол/фосфолипиды в мембране эритроцитов	0,95 ± 0,04	1,39 ± 0,03 $p_k < 0,001$	1,24 ± 0,03 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	1,25 ± 0,04 $p_k < 0,01$ $p_2 < 0,05$	1,40 ± 0,06 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Таблица П. 9

Содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и ее общая антиокислительная активность у больных ишемической болезнью сердца до и после операции в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Здоровые доноры (n = 16)	Больные ИБС			
		с умеренным постперфузионным гемолизом (n = 22)		с выраженным постперфузионным гемолизом (n = 15)	
		до операции	после операции	до операции	после операции
Содержание ТБК-активных продуктов в плазме крови, нмоль/мл	0,60 ± 0,09	1,86 ± 0,26 $p_k < 0,001$	2,71 ± 0,35 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	1,87 ± 0,20 $p_k < 0,001$	2,87 ± 0,29 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$
Содержание диеновых конъюгатов в плазме крови, усл. ед./мл	3,37 ± 0,09	3,91 ± 0,10 $p_k < 0,05$	3,86 ± 0,09 $p_k < 0,05$	3,80 ± 0,12 $p_k < 0,05$	3,80 ± 0,10 $p_k < 0,05$
Общая АОА плазмы крови, усл.ед./мин	0,50 ± 0,05	0,30 ± 0,03 $p_k < 0,05$	0,21 ± 0,02 $p_k < 0,01$ $p_1 < 0,05$	0,33 ± 0,04 $p_k < 0,05$	0,25 ± 0,01 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$

Приложение

Таблица П.10

Содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность ферментов, участвующих в антиоксидантной защите клеток, в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца до операции в условиях искусственного кровообращения и после нее ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Здоровые доноры ($n = 30$)	Больные ИБС			
		с умеренным постперфузионным гемолизом ($n = 68$)		с выраженным постперфузионным гемолизом ($n = 32$)	
		до операции	после операции	до операции	после операции
Содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах, нмоль/мл	$3,08 \pm 0,10$	$7,09 \pm 0,26$ $p_k < 0,001$	$7,39 \pm 0,27$ $p_k < 0,001$	$7,16 \pm 0,38$ $p_k < 0,001$	$8,12 \pm 0,44$ $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$
Содержание диеновых конъюгатов в эритроцитах, усл. ед./мл	$41,25 \pm 1,28$	$35,90 \pm 1,08$ $p_k < 0,05$	$36,42 \pm 1,01$ $p_k < 0,01$	$36,13 \pm 1,84$ $p_k < 0,05$	$35,88 \pm 1,09$ $p_k < 0,05$
Активность СОД в эритроцитах, усл. ед./мгНб	$0,55 \pm 0,05$	$0,37 \pm 0,03$ $p_k < 0,05$	$0,38 \pm 0,02$ $p_k < 0,001$	$0,32 \pm 0,03$ $p_k < 0,001$	$0,40 \pm 0,04$ $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$
Активность каталазы в эритроцитах, $\times 10^{-1}$ мккат/мгНб	$9,00 \pm 0,31$	$8,37 \pm 0,16$	$8,39 \pm 0,16$	$7,84 \pm 0,26$ $p_k < 0,05$	$7,55 \pm 0,24$ $p_k < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Активность Г-6-ФДГ в эритроцитах, мккат/мгНб	$7,97 \pm 0,33$	$6,39 \pm 0,46$	$7,48 \pm 0,56$ $p_1 < 0,05$	$5,90 \pm 0,46$ $p_k < 0,05$	$5,42 \pm 0,50$ $p_k < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Таблица П.1.

Содержание различных фракций фосфолипидов в мембране донорных или реципиентских биологиче-
ских до операции с искусственной кровью и после нее ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Усреднен- ные дан- ные (n = 13)	Выводы ИВС	
		с уменьшенным количеством донорных фосфолипидов (n = 15)	с увеличенным количеством донорных фосфолипидов (n = 12)
Липидофосфо- липиды	%	до операции $6,10 \pm 0,68$ $p_1 < 0,05$	до операции $3,72 \pm 0,41$ $p_2 < 0,05$
	$\times 10^{-3}$ ммоль/мг белка	после операции $26,35 \pm 1,95$ $p_3 < 0,01$	после операции $13,21 \pm 1,69$ $p_4 < 0,01$
Фосфолипид- фосфолипиды	%	до операции $7,93 \pm 0,30$ $p_5 < 0,05$	до операции $9,47 \pm 0,36$ $p_6 < 0,05$
	$\times 10^{-3}$ ммоль/мг белка	после операции $37,22 \pm 3,83$ $p_7 < 0,05$	после операции $33,67 \pm 3,27$ $p_8 < 0,01$
Фосфолипид- фосфолипиды	%	до операции $24,55 \pm 1,25$	до операции $20,23 \pm 1,46$ $p_9 < 0,05$
	$\times 10^{-3}$ ммоль/мг белка	после операции $115,39 \pm 4,50$ $p_{10} < 0,01$	после операции $131,22 \pm 2,90$ $p_{11} < 0,05$
Сфингомие- лин	%	до операции $14,17 \pm 0,90$	до операции $14,39 \pm 1,31$ $p_{12} < 0,05$
	$\times 10^{-3}$ ммоль/мг белка	после операции $68,06 \pm 5,08$	после операции $14,62 \pm 0,70$ $p_{13} < 0,001$
			$69,87 \pm 3,10$

Окончание табл. П.11

Показатель	Здоровые зоны (n = 15)	Выявленные ИБС	
		в умеренной степени сформированном (n = 15)	сильнейшим образом сформированном (n = 15)
Фосфатидил-серин	6,37 ± 0,68	до операции 9,24 ± 0,86 $p_k < 0,05$	до операции 7,20 ± 1,10 после операции 5,69 ± 1,20 после операции 5,43 ± 1,13
Фосфатидил-инозитол	31,43 ± 1,90	36,43 ± 2,72	35,28 ± 1,41
Фосфатидил-этаноламин	23,61 ± 0,53	31,40 ± 1,61	31,77 ± 0,60
Фосфатидил-холин	124,07 ± 3,20	100,58 ± 3,22 $p_k < 0,001$	106,67 ± 2,65 $p_k < 0,001$
Фосфатидил-глицерин	14,42 ± 1,06	15,48 ± 1,74	19,56 ± 1,60 $p_k < 0,05$ $p_l < 0,05$
	75,07 ± 1,10	72,56 ± 3,48	74,74 ± 3,26
			89,75 ± 3,01 $p_k < 0,05$ $p_l < 0,05$

Таблица П.12

Интенсивность, выраженная в гемоглобине, содержащем C1355* и C1357 – агрегирование и яркость
и состояние путей активации световых волн, исходящих из источника, содержащего до оптических
с искусственными вращением и после их завершения ($\lambda' + \lambda$)

Показатель	Значение показателя ($\lambda' - \lambda$)	Возраст ИБС		
		с умеренным постперфузион- ным гемоглобином ($\lambda' - \lambda$)	после операции до операции	с выраженным постперфузи- онным гемоглобином ($\lambda' - \lambda$)
Интенсивность мутационного гемоглобина, % мочевых	$1,026 \pm 0,012$	$1,003 \pm 0,008$	$0,984 \pm 0,008$ $p_2 < 0,05$ $p_1 < 0,05$	$0,971 \pm 0,014$ $p_2 < 0,05$ $p_1 < 0,05$
Содержание C1355 – агрегиро- ванных в крови, %	$77,18 \pm 10,23$	$58,09 \pm 9,74$	$65,15 \pm 8,60$	$57,83 \pm 11,27$
Содержание C1357 – агрегиро- ванных в крови, %	$84,65 \pm 7,13$	$73,34 \pm 8,40$	$83,53 \pm 9,07$	$60,12 \pm 7,18$
Функциональное агрегирование в клеточном пути комплексности, %	$120,03 \pm 7,12$	$133,08 \pm 8,83$ $p_2 < 0,05$	$101,73 \pm 6,06$ $p_1 < 0,001$	$96,72 \pm 15,11$ $p_2 < 0,05$
Функциональное агрегирование в клеточном пути комплексности, %	$42,08 \pm 11,15$	$36,51 \pm 8,55$	$37,82 \pm 9,22$	$28,61 \pm 11,07$
Функциональное агрегирование в альтернативного пути комплексности, %	$70,01 \pm 6,88$	$72,91 \pm 1,83$	$5,78 \pm 1,26$ $p_2 < 0,001$ $p_1 < 0,001$	$43,84 \pm 7,07$ $p_2 < 0,05$ $p_1 < 0,05$
Содержание ТКК. $\times 10^{-3} \text{ г/г/г/г}$	$235,12 \pm 26,31$	$359,95 \pm 44,72$ $p_2 < 0,05$	$2310,03 \pm 104,90$ $p_2 < 0,001$ $p_1 < 0,001$	$2023,37 \pm 68,97$ $p_2 < 0,001$ $p_1 < 0,001$

Таблица П.13

Параметры гиперполяризованного ответа клеток красной крови и средний объем эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца до операции с искусственным кровообращением и после их завершения ($X \pm m$)

Показатель	Скорость ответа ($n = 12$)	Больные ИБС		
		в умеренном гиперполяризованном гемодиализе ($n = 22$)		в гиперполяризованном гемодиализе ($n = 13$)
		до операции	после операции	до операции
V_0 , мэкзОН/(мин·клеток)	$4,79 \pm 0,44$	$4,98 \pm 0,34$	$5,31 \pm 0,44$	после операции $5,04 \pm 0,39$
ΔE , мВ	$1,56 \pm 0,06$	$1,56 \pm 0,09$	$1,55 \pm 0,10$	$1,65 \pm 0,06$
ΔT , с	$43,31 \pm 2,71$	$43,54 \pm 2,63$	$46,30 \pm 2,01$	$41,15 \pm 2,53$
V_0 , мэкзОН/(мин·клеток)	$1,76 \pm 0,12$	$1,25 \pm 0,11$	$1,26 \pm 0,10$	$1,48 \pm 0,13$
Средний объем эритроцитов, % к-л	$37,45 \pm 1,31$	$p_1 < 0,05$	$p_2 < 0,05$	$p_3 < 0,05$
		$92,68 \pm 1,12$	$82,12 \pm 0,85$	$86,50 \pm 0,91$
		$p_1 < 0,05$	$p_2 < 0,01$	$p_3 < 0,05$

Примечания. V_0 – скорость гиперполяризации мембраны эритроцитов при гиперполяризованном ответе (ПНО); K_0 – скорость ишемического мембранного ответа при ПНО; ΔE – мембранное напряжение мембранного потенциала при ПНО; ΔT – время, через которое достигается максимальная гиперполяризация мембраны эритроцитов при ПНО.

Приложение

Таблица П.14

Кластеризация кардиохирургических больных на основе уровня постперфузионной гемоглобинемии и лабораторных показателей до- и послеоперационного периода

Этап	Классификационный признак кластеризации	Кластер № 1 ($\bar{X} \pm m$)	Кластер № 2 ($\bar{X} \pm m$)	p
До операции	Индекс ригидности эритроцитов до операции, усл. ед.	67,15 ± 10,12	163,11 ± 10,04	0,0003
	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл	26,84 ± 4,65	51,24 ± 8,66	0,0447
	Содержание TNF-α в плазме крови до операции, пг/мл	4,56 ± 0,43	2,52 ± 0,39	0,0014
	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл	24,33 ± 1,59	48,38 ± 1,89	0,0000
После операции	Содержание ЕРО в плазме крови после операции, мМЕ/мл	22,78 ± 1,91	17,68 ± 1,48	0,0386
	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл	23,14 ± 1,60	46,75 ± 1,95	0,0000
	V_2 после операции, мэкВН+/(мин·л клеток)	0,53 ± 0,06	0,71 ± 0,06	0,0685
	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл	20,38 ± 3,00	49,20 ± 2,97	0,0001

Примечание. V_2 – скорость восстановления мембранного потенциала при ГПО; p – уровень статистической значимости кластеризации (значимости различий дисперсий образованных кластеров).

Приложение

Таблица П.15

Содержание эритроцитов и концентрация гемоглобина в крови у больных ишемической болезнью сердца до операции в условиях искусственного кровообращения и через 1 сут после нее ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Здоровые доноры ($n = 16$)	Больные ИБС			
		с умеренным постперфузионным гемолизом ($n = 22$)		с выраженным постперфузионным гемолизом ($n = 19$)	
		до операции	после операции	до операции	после операции
Содержание эритроцитов в крови, $\times 10^{12}/л$	$4,79 \pm 0,05$	$4,94 \pm 0,06$	$3,53 \pm 0,06$ $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,001$	$4,68 \pm 0,07$ $p_2 < 0,05$	$3,17 \pm 0,07$ $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$
Содержание гемоглобина в крови, г/л	$148,93 \pm 2,74$	$151,56 \pm 2,65$	$104,33 \pm 2,10$ $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,001$	$144,45 \pm 1,70$	$96,31 \pm 2,77$ $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,05$

Таблица П.16

Частота встречаемости антигенов и фенотипов (%) системы АВ0 эритроцитов при умеренном и выраженном гемолизе у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Больные ИБС	
	с умеренным постперфузионным гемолизом ($n = 98$)	с выраженным постперфузионным гемолизом ($n = 52$)
А-антиген	$44,86 \pm 5,02$	$48,07 \pm 7,00$
В-антиген	$23,47 \pm 4,30^*$	$36,53 \pm 6,74$
Н-антиген (0-фенотип)	$42,82 \pm 4,99$	$32,69 \pm 6,57$

Примечание. * – показатель отличался от частоты встречаемости А-антигена и Н-антигена (0-фенотипа) эритроцитов среди пациентов с умеренным гемолизом при уровне статистической значимости различий $p < 0,05$.

Приложение

Таблица П.17

Частота встречаемости антигенов системы Резус (%) эритроцитов при умеренном и выраженном гемолизе у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом ($n = 83$)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом ($n = 46$)
С-антиген	$79,52 \pm 4,45$	$58,69 \pm 7,34$ $p < 0,05$
с-антиген	$75,90 \pm 4,72$	$84,78 \pm 5,35$
D-антиген	$84,33 \pm 4,02$	$82,61 \pm 5,65$
E-антиген	$21,69 \pm 4,55$	$32,60 \pm 6,99$
e-антиген	$100,00 \pm 0,00$	$97,83 \pm 2,17$
СС-фенотип	$24,10 \pm 4,72$	$15,21 \pm 5,35$
Сс-фенотип	$55,42 \pm 5,49$	$43,48 \pm 7,39$
сс-фенотип	$20,48 \pm 4,46$	$41,30 \pm 7,34$ $p < 0,05$
D-фенотип	$84,33 \pm 4,02$	$82,61 \pm 5,65$
d-фенотип	$15,67 \pm 4,02$	$17,39 \pm 5,65$
EE-фенотип	$0,00 \pm 0,00$	$2,17 \pm 2,17$
Ee-фенотип	$21,69 \pm 4,55$	$30,43 \pm 6,86$
ee-фенотип	$78,32 \pm 4,55$	$67,40 \pm 6,99$

Таблица П.18

Характеристика послеоперационного периода у больных ишемической болезнью сердца, перенесших операцию коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатель	Больные ИБС	
	с умеренным послеоперационным гемолизом ($n = 52$)	с выраженным послеоперационным гемолизом ($n = 44$)
Длительность ИВЛ, ч	$10,37 \pm 0,74$	$9,64 \pm 0,95$
Минимальное pO_2 , мм рт. ст.	$38,95 \pm 2,24$	$35,05 \pm 1,27$
Минимальное насыщение гемоглобина кислородом ($Hb O_2$), %	$67,47 \pm 2,19$	$61,70 \pm 1,90$
Максимальное pCO_2 , мм рт. ст.	$42,79 \pm 1,04$	$42,91 \pm 0,67$
Наличие кровотечений, % случаев	$5,77 \pm 3,27$	$11,36 \pm 4,84$
Аутокровь	Доля пациентов, %	$11,36 \pm 4,84$
	Объем, мл	$450,00 \pm 0,00$

Приложение

Окончание табл. П.18

Показатель		Больные ИБС	
		с умеренным послеоперационным гемоллизом ($n = 52$)	с выраженным послеоперационным гемоллизом ($n = 44$)
Донорская эритромаасса	Доля пациентов, %	$19,23 \pm 5,52$	$54,55 \pm 7,59$ $p < 0,01$
	Объем, мл	$339,60 \pm 69,34$	$299,33 \pm 28,24$
Билирубин прямой, мкмоль/л		$6,70 \pm 0,71$	$5,84 \pm 0,57$
Билирубин не прямой, мкмоль/л		$12,14 \pm 1,13$	$11,09 \pm 0,66$
Протеинурия	Доля пациентов с протеинурией, %	$44,44 \pm 6,95$	$68,18 \pm 7,10$ $p < 0,05$
	Концентрация белка в моче, г/л	$0,17 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,04$
Содержание лейкоцитов в моче, количество клеток в поле зрения		$3,70 \pm 0,43$	$3,89 \pm 0,54$
Диурез на 2-е сут после операции, мл		$2053,91 \pm 129,19$	$1714,71 \pm 138,05$
Объем плеврального экссудата, мл		$256,32 \pm 39,59$	$461,25 \pm 64,90$ $p < 0,05$
Нитроглицерин	Доля пациентов, %	$55,77 \pm 6,96$	$52,27 \pm 7,62$
	Доза, мг/сутки	$35,36 \pm 5,80$	$46,25 \pm 9,48$
Пентамин	Доля пациентов, %	$17,31 \pm 5,30$	$25,00 \pm 6,60$
	Доза, мг/сутки	$212,50 \pm 42,70$	$70,00 \pm 12,25$ $p < 0,05$
Пипекуроний	Доля пациентов, %	$7,69 \pm 3,73$	$15,91 \pm 5,58$
	Доза, мг/сутки	$6,00 \pm 1,15$	$18,67 \pm 4,46$ $p < 0,05$
Потребность в наркотических анальгетиках (промедол, морфин), %		$1,92 \pm 1,92$	$20,45 \pm 6,15$ $p < 0,05$
Срок пребывания больных в палате интенсивной терапии, сут		$2,56 \pm 0,16$	$2,96 \pm 0,33$
Общая послеоперационная госпитализация больных, сут		$19,75 \pm 1,07$	$23,29 \pm 1,61$

Примечание. ИВЛ – искусственная вентиляция легких.

Приложение

Таблица П.19

Лекарственные препараты, применяемые у больных ИБС во время операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Лекарственный препарат	Больные ИБС			
	с умеренным послеоперационным гемолизом ($n = 50$)		с выраженным послеоперационным гемолизом ($n = 44$)	
	Доля больных, %	Общая доза за операцию	Доля больных, %	Общая доза за операцию
Кетамин, мг	100,00 \pm 0,00	55,22 \pm 7,27	100,00 \pm 0,00	55,68 \pm 6,84
Фентанил, мкг	100,00 \pm 0,00	190,00 \pm 13,05	100,00 \pm 0,00	197,27 \pm 18,38
Промедол, мг	84,00 \pm 5,24	23,16 \pm 1,72	81,82 \pm 5,88	27,78 \pm 2,37
Морфин, мг	28,00 \pm 6,41	11,43 \pm 1,43	20,45 \pm 6,15	12,50 \pm 2,50
Диазепам, мг	96,00 \pm 2,80	38,26 \pm 3,12	86,36 \pm 5,23	33,16 \pm 4,59
Димедрол, мг	80,00 \pm 5,71	20,00 \pm 0,00	81,82 \pm 5,88	19,44 \pm 0,56
Дроперидол, мг	36,00 \pm 6,86	3,75 \pm 0,47	40,91 \pm 7,49	2,81 \pm 0,46
Лидокаин, мг	50,00 \pm 7,14	345,45 \pm 39,00	65,91 \pm 7,23	270,00 \pm 24,78
Атропин, мг	92,00 \pm 3,88	0,70 \pm 0,08	90,90 \pm 4,39	0,73 \pm 0,07
Пентамин, мг	24,00 \pm 6,10	75,83 \pm 12,00	18,18 \pm 5,88	28,75 \pm 9,66 $p < 0,05$
Пипекуроний, мг	100,00 \pm 0,00	24,58 \pm 1,15	100,00 \pm 0,00	23,55 \pm 2,22
Суксаметоний, мг	68,00 \pm 6,66	287,50 \pm 22,13	90,90 \pm 4,39 $p < 0,05$	270,53 \pm 19,73
Нитроглицерин, мг	46,00 \pm 7,12	25,46 \pm 2,82	59,09 \pm 7,50	32,31 \pm 5,33
Гепарин, $\times 10^3$ Ед	100,00 \pm 0,00	25,53 \pm 2,89	100,00 \pm 0,00	25,44 \pm 3,15
Протамин, мг	100,00 \pm 0,00	263,64 \pm 15,21	100,00 \pm 0,00	271,48 \pm 16,82
Этамзилат, мг	80,00 \pm 5,71	652,78 \pm 35,81	50,00 \pm 7,63 $p < 0,01$	636,36 \pm 39,36
Аминокапроновая кислота, мг	68,00 \pm 6,66	210,92 \pm 37,14	79,55 \pm 6,16	233,33 \pm 42,17
Преднизолон, мг	32,00 \pm 6,66	106,25 \pm 13,15	36,36 \pm 7,34	75,00 \pm 12,5
Фуросемид, мг	38,00 \pm 6,93	11,50 \pm 1,50	22,73 \pm 6,39	10,00 \pm 0,00
Верапамил, мг	10,00 \pm 4,28	3,00 \pm 1,00	2,27 \pm 2,27	3,00 \pm 0,00
Антибиотики	100,00 \pm 0,00	—	100,00 \pm 0,00	—
Адреномиметики	8,00 \pm 3,88	—	0,00 \pm 0,00	—
Адреноблокаторы	12,00 \pm 4,64	—	9,09 \pm 4,34	—

Примечание. p – уровень статистической значимости различий между показателями у пациентов с умеренным и выраженным гемолизом.

Научное издание

**Чумакова Светлана Петровна
Уразова Ольга Ивановна
Шипулин Владимир Митрофанович
Новицкий Вячеслав Викторович**

**ПАТОЛОГИЯ ЭРИТРОЦИТА:
ПРЕДИКТОРЫ ГЕМОЛИЗА
В КАРДИОХИРУРГИИ**

Редактор **А.В. Базавлук**
Корректор **Д.А. Пилипенко**
Технический редактор **О.А. Турчинович**
Верстка **О.А. Турчинович**
Дизайн обложки **Л.Д. Кривцовой**
Оригинал-макет издательства «Печатная мануфактура»

Лицензия ИД № 03931 от 07.02.2001.
Подписано в печать 07.10.2015.
Формат 60×84¹/₁₆. Печать офсетная. Бумага офсетная.
Гарнитура «Newton». Печ. л. 13. Усл. печ. л. 12,09. Уч.-изд. л. 12,45.
Тираж 200 экз. Заказ № 506.

ООО «Печатная мануфактура».
634055, г. Томск, а/я 3967.
Тел./факс: 8 (382-2) 49-31-19, тел. 8 (382-2) 49-00-74.
E-mail: pechat@tomsk.ru