

На правах рукописи

Чумакова Светлана Петровна

**РОЛЬ ПРЕДСУЩЕСТВУЮЩЕЙ ПАТОЛОГИИ ЭРИТРОЦИТА В
ПАТОГЕНЕЗЕ ГЕМОЛИЗА ПРИ ИСКУССТВЕННОМ КРОВООБРАЩЕНИИ**

14.03.03 – патологическая физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Томск – 2013

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор

Уразова

Ольга Ивановна

доктор медицинских наук, профессор,
Заслуженный деятель науки РФ

Шипулин

Владимир Митрофанович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН,
директор ФГБУ «НИИ фармакологии» СО РАМН

Дыгай

Александр Михайлович

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент
РАМН, руководитель лаборатории радионуклидных методов
исследования ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН

Лишманов

Юрий Борисович

доктор медицинских наук, начальник отдела инновационных
проектов и программ, профессор кафедры молекулярной
медицины и клинической лабораторной диагностики ГБОУ
ВПО СибГМУ Минздрава России

Зима

Анастасия Павловна

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний» СО РАМН 650002, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.

Защита состоится: «___» _____ 2013 г. на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

И.В. Петрова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. На сегодняшний день искусственное кровообращение (ИК) является неотъемлемой частью сердечно-сосудистой хирургии, позволяя выполнять разнообразные вмешательства на сердце и аорте, среди которых – оперативное лечение ишемической болезни сердца с многососудистым поражением коронарного русла, коррекция врожденных и приобретенных пороков сердца, резекция аневризмы аорты или сердца, удаление опухолей и трансплантация органа [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007; Шипулин В.М., Карпов Р.С., 2009; Бокерия Л.А., 2012; Portoghesi M. et al., 2012]. Однако основной проблемой современной кардиохирургии до сих пор остается поиск путей коррекции нарушений гомеостаза, связанных с ИК, среди которых важную роль играет выраженный постперфузионный гемолиз [Wright G., 2001; Дементьева И.И. и соавт., 2008, 2010; Vercaemst L., 2008; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011].

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 [Mulholland J.W. et al. 2000; Дементьева И.И. и соавт., 2008]. В условиях постоянной деформации эритроцита изменяется проницаемость цитоплазматической мембраны для одновалентных катионов и кальция – клетка испытывает «деформационный стресс» [Морозова В.Т. и соавт., 2007; Bhattacharya A., 2011]. Кроме того, важное значение имеет артериальная гипероксия, контакт крови с воздушной фазой и синтетическими поверхностями экстракорпорального контура, что активизирует свободнорадикальное окисление, систему комплемента и гемостаз [Короткина Р.Н. и соавт., 2005; Akila A. et al., 2007; Дементьева И.И. и соавт., 2008; Deng Y.K. et al., 2010; Jacobs S. et al., 2011]. 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.

Массивная деструкция эритроцитов в пределах сосудистого русла сопровождается появлением в крови разрушенных стром эритроцитов и аденозиндифосфата, 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 [Воробьев А.И., 2005; Rother R.P. et al., 2005; Дуткевич И.Г., 2007; Кузник Б.И., 2010; Kato G.J., Taylor J.G., 2010; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011; Kahn M.J. et al., 2013]. Последнее усугубляет тяжесть ранних послеоперационных осложнений, таких как инфаркт

миокарда, инсульты и когнитивный дефицит, острая ишемия кишечника, дыхательная и почечная недостаточность [Бокерия Л.А. и соавт., 2004; Подкаменный В.А., 2006; Сигаев И.Ю. и соавт., 2008; Kieffer E. et al., 2008; Барбараш Л.С. и соавт., 2011; Baranowska K. et al., 2012; Sigurjonsson H. et al., 2012]. Показано, что у 40-100% больных после операции с ИК регистрируется дисфункция проксимальных канальцев почек, которая связана с альтерацией эпителия вследствие гипоксии и фильтрации свободного гемоглобина в мочу [Морозов Ю.А. и соавт., 2007, 2008; Vercaemst L., 2008; Haase M. et al., 2010, 2013].

Учитывая высокую значимость интраоперационного гемолиза в ранней реабилитации пациентов, главным принципом его профилактики 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 [Jonsson H. et al., 2004; Lawson D.S. et al., 2005; Дементьева И.И. и соавт., 2008, 2010; Vercaemst L., 2008; Simons A.P. et al., 2010; Nasso G. et al., 2011]. При этом совершенно не учитываются внутренние факторы организма больного, предрасполагающие к выраженной гемоглобинеми. Между тем, сотрудниками ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН (г. Томск) было отмечено, что у пациентов, оперированных с применением идентичных перфузионных систем примерно в равных условиях, выраженность постперфузионного гемолиза варьирует, что предполагает детерминирующее влияние на нее исходного клинического статуса пациента и свойств эритроцитов на момент хирургического вмешательства.

Немногочисленные работы относительно этой проблемы регистрируют лишь факт массивной гемоглобинеми после операций в условиях ИК у больных с серповидно-клеточной анемией, талассемией, генетически детерминированным дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах и пароксизмальной ночной гемоглобинурией [Gerrah R. et al., 2003; Horai T. et al., 2006; Chu S.H. et al., 2011; Chowdhry V. et al., 2012; Mennes I. et al., 2012]. Между тем, для кардиохирургических пациентов, не страдающих гематологическими заболеваниями, влияние дооперационного статуса эритроцитов на степень выраженности гемолиза остается не изученным. Учитывая, что дисфункция эритрона формируется при многих соматических заболеваниях и нервно-психических расстройствах [Новицкий В.В. и соавт., 2003, 2004, 2006], характер сопутствующей патологии может существенно модулировать свойства эритроцитов и выраженность постперфузионной гемоглобинеми.

В связи с вышеизложенным представляется актуальным изучение роли предсуществующей патологии эритроцита в патогенезе постперфузионного гемолиза, что вместе с выявлением факторов риска выраженной гемоглобинеми

позволит прогнозировать и осуществлять направленную первичную профилактику гемолитических расстройств у кардиохирургических больных.

Цель исследования: Изучить роль дооперационных нарушений структурно-метаболического статуса эритроцитов и их микрореологических свойств в патогенезе умеренного и выраженного гемолиза у больных ишемической болезнью сердца после операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения.

Задачи исследования:

1. Оценить вариабельность постперфузионной гемоглобинемии и регенераторную активность красного ростка системы крови во взаимосвязи с концентрацией гаптоглобина, эритропоэтина и фактора некроза опухолей α в крови до и после операции у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным гемолизом после искусственного кровообращения.
2. Охарактеризовать изменение агрегируемости, деформируемости и механической резистентности эритроцитов в зависимости от уровня экспрессии поверхностных гликофолинов А и В, соотношения холестерина и фосфолипидов в мембране и концентрации фибриногена в крови до и после операции у больных ишемической болезнью сердца с различной степенью выраженности постперфузионной гемоглобинемии.
3. Определить содержание общих фосфолипидов и особенности фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов в до- и послеоперационном периодах у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом.
4. Оценить содержание продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитах и плазме крови, ее общую антиокислительную активность и активность ферментов (супероксиддисмутаза, каталаза, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа) в эритроцитах до и после операции у больных ишемической болезнью сердца с различной степенью выраженности гемолиза при искусственном кровообращении.
5. Установить характер экспрессии молекул-ингибиторов системы комплемента CD35 и CD55 на эритроцитах, уровень активности комплемента и состояние путей его активации (классического, лектинового, альтернативного) до и после операции у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом.
6. Оценить изменение объема и проницаемости мембраны эритроцитов для низкомолекулярных гидрофильных веществ во взаимосвязи с проводимостью Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, активностью Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы (АТФазы) мембраны эритроцитов и уровнем внутриклеточного АТФ до и после операции у больных ишемической болезнью сердца с различной степенью

выраженности постперфузионного гемолиза.

7. Определить особенности антигенного состава эритроцитов по системам АВ0 и Резус и клинического статуса больных ишемической болезнью сердца до операции, ассоциированные с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом и разработать систему его прогноза.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное исследование влияния предсуществующей патологии эритроцитов и факторов интраоперационного нарушения их структурно-метаболических и микрореологических свойств на выраженность внутрисосудистого гемолиза после операции с ИК у кардиохирургических больных, не страдающих гематологическими заболеваниями и оперированных с применением идентичного перфузионного оборудования. Показано, что выраженная постперфузионная гемоглобинемия (40 мг/дл и более) развивается в 35% случаев коронарного шунтирования на остановленном сердце и определяется глубоким дооперационным дисбалансом гомеостаза эритроцитов, образующихся в условиях гиперактивации эритропоэза при нормальном уровне эритропоэтина и фактора некроза опухолей (TNF) α в крови. Напряжение эритропоэза опосредует неполноценность молодой популяции эритроцитов до операции, которая характеризуется низкой деформируемостью клеток, дефицитом внутриклеточных ферментов (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и каталазы), АТФ и поверхностных CD55-молекул при повышении проницаемости клеточной мембраны для низкомолекулярных гидрофильных веществ (мочевины). При этом установлено, что у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) с умеренным гемолизом данные параметры эритроцитов в дооперационном периоде не изменяются в связи с гиперпродукцией эритропоэтина и TNF- α 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.

В результате дисперсионного анализа обосновано, что наиболее значимыми предрасполагающими факторами выраженной постперфузионной гемоглобинемии у больных ИБС являются низкая деформируемость эритроцитов и гиперфибриногенемия, сопряженная до операции с гиперагрегируемостью эритроцитов, в то время как предсуществующее повышение проницаемости мембраны эритроцитов (для низкомолекулярных гидрофильных веществ) и отсутствие характерного для атерогенеза увеличения концентрации TNF- α в крови (на фоне активации эритропоэза) играют несколько меньшую роль. При этом степень выраженности умеренного гемолиза предопределяется снижением механической резистентности эритроцитов до операции.

Впервые доказано, что в основе патогенеза выраженной гемоглобинемии

после проведения ИК у кардиохирургических больных лежит интраоперационное потенцирование процессов перекисного окисления липидов в эритроцитах в результате сохраняющегося после операции дефицита ферментов (преимущественно Г-6-ФДГ), что опосредует нарушение фосфолипидного спектра эритроцитарной мембраны во время ИК (аккумуляцию фосфатидной кислоты и лизофосфатидилхолина при истощении фракций фосфатидилхолина и фосфатидилинозитола) при нарастании холестерол-фосфолипидного соотношения. Также обнаружено, что развитие выраженного гемолиза усугубляется за счет недостаточного сокращения объема эритроцита вследствие интраоперационного снижения проводимости $K^+(Ca^{2+})$ -каналов в условиях незначительного повышения продукции эритропоэтина, что потенцируется угнетением активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны после ИК на фоне предсуществующего дефицита АТФ.

В ходе исследований установлено, что наиболее значимым патогенетическим фактором формирования умеренной гемоглобинемии после ИК служит комплемент-зависимый лизис эритроцитов, сочетающийся с повышенным содержанием факторов классического пути комплемента в крови до операции и увеличением проницаемости мембраны клеток для низкомолекулярных гидрофильных веществ во время перфузии. При этом лизис эритроцитов ограничивается резко выраженным сокращением их объема благодаря нарастающей концентрации эритропоэтина в крови после ИК и исходно повышенной проводимости $K^+(Ca^{2+})$ -каналов мембраны эритроцитов.

На основе результатов сравнительного анализа установлено, что окислительно-антиокислительный дисбаланс в плазме крови, экспрессия CD35-молекул и гликофоринов A^+ и B^+ на эритроцитах, а также состояние лектинового пути активации комплемента не влияют на выраженность постперфузионной гемоглобинемии. Наряду с этим показано, что дефицит $CD55^+$ эритроцитов в крови у больных ИБС с выраженным гемолизом сочетается с гиперактивацией альтернативного пути комплемента до операции, но не способствует активации такового во время перфузии, так как предопределяет дооперационное истощение его факторов.

Впервые обнаружено, что экспрессия С-антигена системы Резус и отсутствие В-антигена системы АВ0 на эритроцитах имеют протективное значение в развитии постперфузионного гемолиза, на выраженность которого также влияет характер сопутствующей патологии (почек или легких) у больных ИБС до операции. По итогам исследования впервые разработаны способы дооперационного прогнозирования развития выраженного гемолиза после операции с ИК, а также величины постперфузионной гемоглобинемии у кардиохирургических больных.

Практическое и теоретическое значение работы. В результате

проведенных исследований получены новые данные фундаментального характера, расширяющие известные на сегодняшний день представления о патогенезе гемолиза при операциях с ИК и предикторах выраженной гемоглобинемии у кардиохирургических пациентов, не страдающих гематологической патологией. Доказана важная роль предрасполагающей патологии эритроцита в умеренной и выраженной интраоперационной деструкции клеток. Оценка структурно-метаболических свойств эритроцитов, состава плазмы крови и клинического статуса больных ИБС до операции позволяет прогнозировать выраженность постперфузионной гемоглобинемии с помощью разработанных систем количественного и качественного ее анализа, последняя из которых доступна для клинического использования и в последующем может стать основанием для проведения целенаправленной первичной профилактики выраженного гемолиза.

Дооперационные нарушения структурно-метаболических и микро-реологических свойств эритроцитов у больных ИБС с выраженной гемоглобинемией теоретически обосновывают возможность применения у таких пациентов кровезаменителей на основе низкомолекулярных гидроксипропилкрахмалов 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 клетки во время ИК. Нарушение эритропоэза, предшествующее развитию выраженной гемоглобинемии и определяющее неполноценность образующихся эритроцитов, является веским аргументом в пользу проведения дальнейших исследований по оценке эффективности профилактического курсового применения препаратов эритропоэтина до операции в сочетании с обязательным назначением микроэлементов. Продолжительную дооперационную профилактику выраженного гемолиза с применением препаратов эритропоэтина целесообразно выполнять больным ИБС, у которых прогнозируется развитие выраженной гемоглобинемии и подтверждается факт дисрегуляции эритропоэза: ретикулоцитоз на фоне нормального содержания эритропоэтина в крови при формировании неполноценных эритроцитов с низкой деформируемостью и недостаточностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы.

Наряду с этим, некорректируемые свойства эритроцитов, такие как отсутствие С-антигена системы Резус и наличие В-антигена системы АВ0, ограничивают возможности первичной профилактики выраженного постперфузионного гемолиза у больных ИБС, и являются основанием для проведения интраоперационных мер по элиминации свободного гемоглобина из сосудистого русла.

Положения, выносимые на защиту:

1. Степень выраженности интраоперационного гемолиза при искусственном кровообращении у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) определяется исходным (до операции) структурно-метаболическим статусом эритроцитов и активностью эритропоэза: формирование выраженной постперфузионной гемоглобинемии сопряжено со значительной стимуляцией эритропоэза до операции в условиях усиленного эритродиереза при нормальном содержании эритропоэтина и фактора некроза опухолей (TNF) α в крови, избыток которых на фоне интенсификации процессов эритропоэза и эритродиереза детерминирует развитие умеренного гемолиза после перфузии.
2. Ключевым фактором, предрасполагающим к развитию выраженной постперфузионной гемоглобинемии у больных ИБС, является низкая деформируемость эритроцитов на фоне ретикулоцитоза, что сочетается с повышенной агрегируемостью клеток, которая обусловлена гиперфибриногенемией и не зависит от числа гликофорин А⁺ и В⁺ эритроцитов в крови. Величину умеренной постперфузионной гемоглобинемии предопределяет исходно низкая механическая резистентность эритроцитов, которая при выраженном гемолизе выявляется только во время операции и не влияет на уровень гемоглобинемии.
3. Патогенетическим фактором выраженного постперфузионного гемолиза, определяющим степень его выраженности у больных ИБС, является интраоперационное потенцирование процессов липопероксидации в мембране эритроцитов вследствие предсуществующей недостаточности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и каталазы в клетках, что влечет за собой нарушение фосфолипидного спектра плазмолеммы (накопление лизофосфатидилхолина при истощении фосфатидилхолина и фосфатидилинозитола) и нарастание холестерол/фосфолипидного соотношения в ней. При этом усугубляющийся после операции окислительно-антиокислительный дисбаланс в плазме крови не влияет на вариабельность постперфузионной гемоглобинемии.
4. Патогенетическим фактором, детерминирующим развитие умеренного постперфузионного гемолиза, служит комплемент-зависимый лизис эритроцитов во время перфузии, обусловленный активацией системы комплемента на фоне дооперационного избытка факторов классического пути комплемента при нормальном содержании CD55⁺ эритроцитов в крови. В условиях сохраняющегося после перфузии дефицита CD55⁺ эритроцитов в крови механизм формирования выраженного гемолиза не связан с комплемент-зависимым лизисом эритроцитов ввиду истощения факторов альтернативного пути комплемента до операции. При этом численность CD35⁺ эритроцитов в крови и активность лектинового пути комплемента не влияют на выраженность

постперфузионной гемоглобинемии.

5. Развитие умеренного постперфузионного гемолиза ассоциировано с реализацией адаптивной реакции эритроцитов, заключающейся в резком сокращении объема клетки в ответ на возрастающую проницаемость ее мембраны (для низкомолекулярных гидрофильных веществ), что обусловлено длительным закрыванием $K^+(Ca^{2+})$ -каналов в условиях чрезмерной интраоперационной гиперпродукции эритропоэтина и сочетается с исходно нормальным содержанием АТФ в клетках при низкой активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов. Для выраженного гемолиза характерно интраоперационное нарушение регуляции объема эритроцита, опосредованное быстрым закрыванием $K^+(Ca^{2+})$ -каналов при незначительной гиперпродукции эритропоэтина и угнетении активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов в условиях исходно повышенной ее проницаемости и дефицита АТФ в клетках.
6. Наличие заболеваний легких до операции и сс-фенотипа эритроцитов системы Резус у больных ИБС предрасполагает к развитию выраженной гемоглобинемии после операции в условиях искусственного кровообращения, в то время как предсуществующая патология почек, наличие С-антигена системы Резус и отсутствие В-антигена системы АВ0 на эритроцитах – к развитию умеренного гемолиза. Данные характеристики в комплексе с содержанием фибриногена и эритроцитов, а также концентрацией цитокинов (эритропоэтина и $TNF-\alpha$) в крови и параметрами Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов позволяют на дооперационном этапе прогнозировать степень выраженности постперфузионной гемоглобинемии.

Апробация и реализация диссертации. Материалы диссертации доложены и обсуждены на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Высокотехнологичные методы диагностики и лечения заболеваний сердца, крови и эндокринных органов» (Санкт-Петербург, 2010), III Всероссийской научно-практической конференции «Многопрофильная больница: проблемы и решения» (Ленинск-Кузнецкий, 2010), Российской конференции с международным участием «Фундаментальные вопросы гематологии. Достижения и перспективы» (Екатеринбург, 2010), XI и XII Конгрессах молодых ученых «Науки о человеке» (Томск, 2010, 2011), V Всероссийской конференции с международным участием «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» (Москва, 2011), VI Российской конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2011), Межрегиональной научно-практической конференции «Диагностика и лечение анемий в XXI веке» (Рязань, 2011), IV и V Международных научных конференциях «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине» (Сочи, 2011, 2012), XVIII Всероссийском съезде

сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2012), Конгрессе гематологов России (Москва, 2012), Всероссийской конференции хирургов, посвященной 10-летию медицинского центра им. Р.П. Аскерханова (Махачкала, 2012), XIX Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» (Санкт-Петербург, 2013) и научных семинарах кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск, 2009-2013).

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.) на базе кафедры патофизиологии и Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и отделения сердечно-сосудистой хирургии ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН г. Томска.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 30 научных работы, в том числе 14 в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Внедрение. Результаты, основные положения и выводы диссертации внедрены в учебный процесс в ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России на кафедрах патофизиологии (в тематический раздел «Патофизиология системы крови», в курсы «Гематология» и «Основы общеклинического анализа»), госпитальной хирургии (в лекционный курс по сердечно-сосудистой хирургии), в практическую деятельность кардиохирургов и перфузиологов отделения сердечно-сосудистой хирургии ФГБУ НИИ кардиологии СО РАМН (г. Томск).

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 335 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов и списка используемой литературы. Работа иллюстрирована 28 рисунками и 31 таблицей. Библиографический указатель включает 580 источников, из них 204 отечественных и 376 зарубежных авторов.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Соискатель принимал непосредственное участие в разработке научной концепции, дизайна и планировании исследования, постановке его цели и задач. Автором лично выполнены все клиничко-лабораторные методы исследования; получены, проанализированы и интерпретированы эмпирические данные; подготовлены к публикации статьи и тезисы по теме диссертации.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика групп исследования

Настоящая работа основана на результатах комплексного клиничко-лабораторного обследования 150 пациентов (136 мужчин и 14 женщин) в возрасте

от 49 до 72 лет с ишемической болезнью сердца (ИБС), страдающих стенокардией напряжения III (реже II или IV) функционального класса и перенесших операцию коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения (ИК). Пациенты были госпитализированы в отделение сердечно-сосудистой хирургии ФГБУ «НИИ кардиологии» СО РАМН г. Томска (директор – академик РАМН, Заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор Р.С. Карпов; руководитель отделения – Заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор В.М. Шипулин; заведующий отделением – д-р мед. наук Б.Н. Козлов) с целью обследования и определения тактики дальнейшего лечения.

Диагноз ИБС устанавливался на основании жалоб и анамнеза больного, данных электрокардиографии, ультразвукового исследования сердца, кардиовентрикулографии, сцинтиграфии и эмиссионной компьютерной томографии миокарда. Длительность ИБС варьировала в пределах от 8 месяцев до 17 лет. У большинства пациентов регистрировалась недостаточность кровообращения, атеросклероз аорты, магистральных артерий конечностей и головного мозга, гипертоническая болезнь III степени, патология желудочно-кишечного тракта (язвенная болезнь, гастриты). Часть пациентов страдала заболеваниями печени и желчевыводящих путей (хронический холецистит, описторхоз, желчекаменная болезнь, гепатит В), почек (хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь, кисты, нарушение фильтрационной функции почек), легких (хроническая обструктивная болезнь легких, пневмофиброз, хронический бронхит), сахарным диабетом 2 типа (табл. 1).

Экстракорпоральная перфузия осуществлялась на аппарате ИК «Stokert» («Sorin Group Deutschland», Германия), оснащенный роликовыми насосами, с применением одноразовых мембранных оксигенаторов «Quadrox» («Maquet AG», Германия).

Ретроспективно больные ИБС были распределены на 2 группы, сформированные в зависимости от концентрации свободного гемоглобина в плазме крови после операции: с умеренным гемолизом (гемоглобинемия менее 40 мг/дл, 98 человек) и с выраженным гемолизом (гемоглобинемия 40 мг/дл и более, 52 человека). Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови 40 мг/дл была выбрана в качестве критерия распределения больных на группы, так как при гемоглобинемии свыше этого уровня наблюдаются клинические проявления внутрисосудистого гемолиза (прежде всего – желтуха) [Дуткевич И.Г., 2007].

Критериями исключения из исследования считали: обострение хронической сопутствующей патологии, наличие гематологических заболеваний (анемий, хронических лейкозов), острого респираторного заболевания в течение 1 месяца до хирургического вмешательства, назначение курсов оксигенотерапии, препаратов эритропоэтина или железа, выполнение сочетанных с коронарным

шунтированием операций, инфузию эритроцитарной массы во время перфузии, продолжительность искусственного кровообращения более 240 мин, отказ от исследования.

Таблица 1

Клиническая характеристика исследуемых групп больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Показатель		Больные ИБС с умеренным послеоперационным гемолизом	Больные ИБС с выраженным послеоперационным гемолизом
Количество больных:		98	52
Возраст, лет		59,42±1,08	59,38±1,22
Длительность ИБС, лет		5,08±0,94	5,33±1,04
Функциональный класс стенокардии напряжения	II, %	18,37±3,93	19,52±5,55
	III, %	76,53±4,30	71,15±6,34
	IV, %	5,10±2,23	9,62±4,13
Функциональный класс недостаточности кровообращения (по NYHA)	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
Гипертоническая болезнь III степени, %		92,59±2,61	91,67±3,73
Сахарный диабет 2 типа, %		14,28±3,55	15,39±5,05
Патология желудочно-кишечного тракта, %		84,68±3,59	88,5±5,83
Заболевания печени и желчевыводящих путей, %		25,51±4,43	42,31±6,92
Заболевания мочевыделительной системы, %		40,82±6,34	21,15±5,72
в том числе с нарушением фильтрационной способности почек, %		21,42±4,17	p ₂ <0,05 3,85±2,69 p ₂ <0,01
Заболевания легких, %		10,21±3,07	32,69±6,57 p ₂ <0,01
Длительность искусственного кровообращения, мин		100,15±2,73	123,10±5,37 p ₂ <0,001
Нормализованный индекс гемолиза, мг/дл		0,0235±0,0023	0,0657±0,0029 p ₂ <0,001

Примечание. Здесь и далее в табл. 2, 3, 4, 5, 6: ИБС – ишемическая болезнь сердца, NYHA (New York Heart Association) – Нью-Йоркская ассоциация сердца; p₂ – уровень статистической значимости различий между показателями у пациентов с умеренным и выраженным гемолизом.

В контрольную группу вошло 30 человек, находившихся в состоянии относительного здоровья и сопоставимых по полу и возрасту с группами пациентов с ИБС, не страдающих патологией кардиоваскулярной системы и системы крови, не имевших острого воспалительного процесса во время исследования и за 4 недели до его проведения. Учитывая возраст, допускали наличие хронических заболеваний в стадии ремиссии в соотношении, аналогичном таковому в группах больных ИБС.

Материал исследования

Материалом исследования служила гепаринизированная (50 Ед/мл) венозная кровь кардиохирургических больных и здоровых доноров в количестве 8 мл и сыворотка крови, полученная в стерильных условиях (готовили из 2 мл нестабилизированной крови, взятой в сухие стерильные пробирки), доставленные в лабораторию в течение 30 мин с момента ее получения. Взятие крови у больных ИБС проводили непосредственно до операции, а также после завершения ИК до инфузии препаратов красной крови. Исследования проводились в Центральной научно-исследовательской лаборатории (зав. – д-р мед. наук, профессор А.Н. Байков) и в лаборатории экспериментальной патофизиологии кафедры патофизиологии (зав. кафедрой – академик РАМН, д-р мед. наук, профессор В.В. Новицкий) ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Методы исследования

Содержание свободного гемоглобина в плазме крови измеряли бензидиновым методом, в гемолизате – гемиглобинцианидным методом (ЗАО «ЭКОлаб», Москва), подсчет ретикулоцитов осуществляли в суправитально окрашенных мазках периферической крови, содержание гаптоглобина в плазме крови – иммунотурбидиметрическим методом с помощью коммерческого набора «Haptoglobin» («Sentinel Diagnostics», Италия). Агрегационную способность эритроцитов исследовали микроскопическим методом, деформируемость – методом измерения начальной скорости фильтрации, механическую резистентность – по доли гемолиза после длительной ротации суспензии клеток красной крови, проницаемость эритроцитарной мембраны для низкомолекулярных гидрофильных веществ – с помощью мочевинового гемолиза. Содержание эритроцитов в крови и их средний объем оценивали, используя гематологический анализатор МЕК-6410 («Nihon Kohden», Япония). Экспрессию Rh-антигенов на эритроцитах определяли в реакции прямой гемагглютинации на плоскости с применением коммерческих цоликлонов анти-D, анти-C, анти-c, анти-E, анти-e Супер (ООО «Гематолог», Москва); ABO-фенотип эритроцитов и содержание фибриногена в крови – по данным клинических карт пациентов.

В эритроцитах и плазме крови определяли концентрацию ТБК-активных продуктов с помощью метода, основанного на колориметрии (при 532 нм) окрашенного комплекса, образующегося при взаимодействии малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), и содержание диеновых конъюгатов по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока при длине волны 233 нм. Для измерения общей антиокислительной активности плазмы крови оценивали динамику окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола в реакционной смеси, содержащей и не содержащей плазму крови. Активность супероксиддисмутазы в эритроцитах определяли по ее способности замедлять реакцию автоокисления адреналина при pH=10,2;

активность каталазы – по способности фермента разлагать пероксид водорода, образующий окрашенный комплекс с солями молибдата аммония; активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – кинетическим методом с помощью коммерческого набора «G6P-DH» («Sentinel Diagnostics», Италия).

В липидных экстрактах мембран эритроцитов измеряли общее содержание фосфолипидов по содержанию липидного фосфора и холестерола ферментативным методом с помощью коммерческого набора «Новохол-А» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск), а также фосфолипидный спектр мембраны эритроцитов методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Silufol UV 254» (Чехия). Выделение мембран эритроцитов осуществляли путем гипосмотического гемолиза по методу J.T. Dodge et al., липидный экстракт мембран эритроцитов получали с применением хлороформ-метаноловой смеси по J. Folch et al. Активность Na⁺/K⁺-АТФазы в мембране эритроцитов определяли путем оценки уровня накопленного неорганического фосфора в среде, содержащей АТФ, содержание АТФ в эритроцитах – методом тонкослойной хроматографии в смеси растворителей «диоксан : изопропанол : аммиак : вода». Проводимость Ca²⁺-зависимых K⁺-каналов (K⁺(Ca²⁺)-каналов) эритроцитов оценивали методом регистрации мембранного потенциала при Ca²⁺-индуцированном гиперполяризационном ответе эритроцитов.

Методом иммуноферментного анализа оценивали в крови концентрацию эритропоэтина и фактора некроза опухолей α (наборы «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» и «альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск)), содержание терминального комплекса комплемента (набор «Human terminal complement complex» («НВТ», Нидерланды)), в стерильной сыворотке определяли функциональную активность классического, лектинового и альтернативного путей комплемента (набор «Wieslab Complement system Screen» («BCM Diagnostics», США)). Вычисляли нормализованный индекс гемолиза [Kawahito S. et al., 2002].

С помощью метода прямой поверхностной иммунофлуоресценции оценивали экспрессию CD35, CD55, гликофоринов А и В на мембране эритроцитов, используя комплементарные моноклональные антитела, меченные флуоресцеина изотиоцианатом (FITC) фирмы «Santa Cruz Biotechnology, INC» (США).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью пакета программ «Statistica for Windows» (2000, версия 8.0) фирмы «Statsoft Inc.» и пакета программ «Microsoft Excel» корпорации «Microsoft». Для проверки гипотезы о нормальном законе распределения использовали тест Шапиро-Уилка. При соответствии нормальному закону распределения признака в исследуемых выборках проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t-критерия Стьюдента (в независимых выборках) и парного t-критерия Стьюдента (в зависимых выборках). Для оценки статистической

значимости отличий между несвязанными выборками с распределением вариантов, отличающимся от нормального закона распределения, использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. При исследовании динамики показателей в попарно связанных выборках, имеющих распределение, отличное от нормального, применяли тест Вилкоксона. Результаты исследований представляли как $\bar{X} \pm m$, где \bar{X} – среднее арифметическое, m – его ошибка.

Для качественных признаков рассчитывали частоту их встречаемости в популяции: w – выборочную долю и Sw – среднюю ошибку выборочной доли, выраженные в %. Проверку гипотезы о равенстве долей в двух исследуемых выборках проводили методом угловой трансформации, основанном на ϕ -преобразовании Фишера, с введением поправки Йейтса на непрерывность.

С целью установления взаимосвязей между количественными показателями вычисляли коэффициент корреляции Спирмена и проводили регрессионный анализ; для качественных признаков рассчитывали коэффициент ассоциации. С целью определения вклада изучаемых факторов в вариабельность результативного признака использовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ. При разработке способов прогнозирования выраженной гемоглобинемии у кардиохирургических больных рассчитывали величину отношения шансов ее развития (OR). Для изучения характера распределения больных по какому-либо признаку в общей популяции оперированных лиц применяли кластерный анализ.

Различия показателей в сравниваемых выборках, коэффициенты корреляции и ассоциации, формулы множественной линейной регрессии, результаты дисперсионного и кластерного анализа считали достоверными при уровне статистической значимости $p < 0,05$ [Лакин Г.Ф., 1980; Боровиков В.П., 2003].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время развитие внутрисосудистого гемолиза у кардиохирургических больных во время и после искусственного кровообращения (ИК) является неизбежным компонентом постперфузионных реакций организма при хирургических вмешательствах на остановленном сердце [Wright G., 2001; Vercaemst L., 2008]. Согласно результатам проведенного исследования, концентрация свободного гемоглобина в плазме крови у больных ИБС с умеренным (65% пациентов) и выраженным (35% пациентов) гемолизом во время операции, действительно, нарастала, превышая контрольные значения не только после ИК, но и до его проведения (табл. 2). Последнее, по-видимому, отражает дисфункцию эритроцитов на фоне атеросклероза, ведущую к ускоренной их гибели [Рязанцева Н.В., 2001; Новицкий В.В., и соавт., 2004; 2006; Солоха Л.Н., Пушников А.А., 2007; Geetha A. et al., 2007; Krzystek-Korpacka M. et al., 2010], как путем внутриклеточного, так и внутрисосудистого гемолиза. При этом первый

механизм оказывается основным в дооперационном периоде, второй – во время ИК, что подтверждается сочетанным нарастанием гемоглобинемии на фоне формирования дефицита гаптоглобина в плазме крови после операции (табл. 2), как маркера массивной внутрисосудистой деструкции эритроцитов [Glader В., 2004; Воробьев А.И., 2005; Рязанцева Н.В. и соавт., 2008; Уразова О.И., Новицкий В.В., 2008]. Между тем, кратность изменений концентрации свободного гемоглобина в плазме крови у больных ИБС была различной: при умеренной гемоглобинемии показатель увеличивался в 2,3 раза, при выраженной – в 5,6 раза (табл. 2).

Таблица 2

Показатели эритропоэза и эритродиереза у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операции в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n=30)	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=98)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=52)
Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови, мг/дл	7,67±0,43	9,12±0,32 $p_k < 0,05$	10,60±0,51 $p_k < 0,01$ $p_2 < 0,05$
		21,72±0,92 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,001$	56,25±2,95 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,001$; $p_2 < 0,001$
Концентрация гаптоглобина в плазме крови, мг/дл	114,17±12,81	136,70±10,78	161,71±7,98 $p_k < 0,05$
		63,00±8,41 $p_k < 0,05$; $p_1 < 0,05$	62,14±6,19 $p_k < 0,01$; $p_1 < 0,01$
Нормализованный индекс гемолиза, мг/дл	—	0,0235±0,0023	0,0657±0,0029 $p_2 < 0,001$
Содержание ретикулоцитов в крови, ‰	7,41±0,44	10,00±0,42 $p_k < 0,001$	12,88±0,54 $p_k < 0,001$; $p_2 < 0,01$
		18,72±0,76 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,05$	16,69±1,34 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,01$

Примечание: См. табл. 1. Здесь и далее в табл. 3, 4, 5: p_k – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров; p_1 – по сравнению с показателями у больных ИБС до операции; p_2 – между показателями у больных ИБС с умеренным и выраженным гемолизом на соответствующем этапе исследования.

Внутрисосудистое разрушение клеток крови при ИК связывают с механической травмой эритроцитов, обусловленной формированием турбулентного потока крови с критической величиной сдвиговой деформации, действием сил гидродинамического удара и поверхностного натяжения, влиянием повышенного давления в насосах аппарата ИК и отрицательного давления в коронарном отсое [Mulholland J. et al., 2000; Wright G., 2001; Дементьева И.И. и соавт., 2008; Vercaemst L., 2008], а также с гипероксемией и активацией системы

комплемента [Fromes Y. et al., 2002; Van den Goor J. et al., 2004; Короткина Р.Н. и соавт., 2005; Deng Y.K. et al., 2010].

При этом важным фактором, определяющим степень интраоперационного гемолиза, является длительность ИК [Wright G., 2001; Дементьева И.И. и соавт., 2008; 2010; Vercaemst L., 2008]. Следует отметить, что время ИК у больных с выраженным гемолизом было лишь на 23% больше, чем у пациентов с умеренной гемоглобинемией (табл. 1), в то время как уровень постперфузионной гемоглобинемии – в 2,6 раза (табл. 2). Более того, вычисление нормализованного индекса гемолиза, нивелирующего влияние длительности ИК на выраженность постперфузионной гемоглобинемии [Kawahito S. et al., 2002, Дементьева И.И. и соавт., 2010], обнаружило почти 3-кратное превышение данного показателя у кардиохирургических больных с выраженным гемолизом относительно пациентов с умеренной гемоглобинемией (табл. 2). Следовательно, массивный лизис эритроцитов нельзя объяснить только большей продолжительностью экстракорпоральной перфузии, что вместе с однотипностью применяемого перфузионного оборудования у пациентов с умеренной и выраженной гемоглобинемией позволяет предположить в последнем случае наличие предсуществующего качественного дефекта эритроцитов, который обуславливает снижение гемолитической стойкости клеток и, видимо, связан с нарушением их микрореологических свойств, антиоксидантного статуса или структурной организации мембраны.

При анализе агрегационных свойств эритроцитов было установлено, что у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом коэффициент агрегации эритроцитов был повышенным на всех этапах исследования (табл. 3) при нормальном количестве клеток в агрегате. Известно, что агрегируемость эритроцитов обратно пропорциональна величине их поверхностного заряда, который определяется наличием на поверхности клеток различных макромолекул: с одной стороны – электроотрицательных сиаловых кислот, а с другой – белков, адсорбированных из плазмы и экранирующих этот заряд [Левтов В.А. и соавт., 1982; Ройтман Е.В., 2001; Шперлинг И.А. и соавт., 2006; Кузник Б.И., 2010; Steffen P. et al., 2013].

На поверхности эритроцитов сиаловые кислоты находятся в составе гликофоринов [Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., 2001; Riquelme B. et al., 2003; Снегирева Л.В., Ивенов В.П., 2007]. Между тем, определение в крови больных ИБС числа эритроцитов, экспрессирующих гликофорины А и В, обнаружило снижение их относительного содержания только до операции у пациентов с умеренным гемолизом ($87,40 \pm 1,47\%$ $p_K < 0,05$ и $68,86 \pm 1,54\%$ $p_K < 0,05$ соответственно против $93,70 \pm 1,21\%$ и $79,60 \pm 1,90\%$ у здоровых доноров) при последующей нормализации величины показателя после хирургического

вмешательства. У больных с выраженным гемолизом показатель варьировал в пределах контрольных значений независимо от этапа исследования.

Причиной такого рода variability числа гликофорин-позитивных эритроцитов у пациентов с умеренным и выраженным гемолизом, по всей видимости, является различное содержание в крови ретикулоцитов (молодых форм эритроцитов), на которых экспрессия гликофоринов выше, чем на зрелых клетках, и снижается по мере старения эритроцитов или при патологии [Снегирева Л.В., Ивенков В.П., 2007; Liu J.J. et al., 2010; Griffiths R.E., et al., 2011]. Так, 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 больше, чем в группе сравнения (табл. 2).

Таблица 3

Микрореологические свойства эритроцитов, концентрация фибриногена в плазме крови и величина холестерол/фосфолипидного соотношения в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операции в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n=20)	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=68)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=32)
Коэффициент агрегации эритроцитов, усл.ед.	0,412±0,020	0,434±0,016	0,489±0,018 $p_k < 0,05$
		0,483±0,024	0,551±0,038 $p_k < 0,05$
Содержание фибриногена в плазме крови, г/л	3,31±0,15	3,44±0,16	4,06±0,13 $p_k < 0,05$; $p_2 < 0,05$
		3,01±0,14	3,33±0,20 $p_1 < 0,05$
Индекс ригидности эритроцитов, усл.ед.	76,68±10,31	83,68±13,90	144,02±16,57 $p_k < 0,05$; $p_2 < 0,05$
		72,96±9,68	124,25±16,08 $p_k < 0,05$; $p_2 < 0,05$
Механическая резистентность эритроцитов, %	2,82±0,44	5,11±0,35 $p_k < 0,001$	3,65±0,41 $p_2 < 0,05$
		5,56±0,36 $p_k < 0,001$	4,62±0,50 $p_k < 0,05$; $p_1 < 0,05$
Соотношение «холестерол/фосфолипиды» в мембране эритроцитов	0,95±0,04	1,38±0,03 $p_k < 0,001$	1,24±0,05 $p_k < 0,01$; $p_2 < 0,05$
		1,25±0,03 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,05$	1,40±0,05 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$

Примечание: См. табл. 2.

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 [Koury M.J., Bondurant M.C., 1992; Riley R.S. et al., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Dicato M. et al., 2009]. Увеличение численности ретикулоцитов в крови после операции, влекущее за собой нормализацию количества гликофорин А⁺ и гликофорин В⁺ эритроцитов, очевидно, обусловлено мобилизацией костномозгового резерва этих клеток вследствие интраоперационной кровопотери, гемодилюции и гемолиза.

Данные результаты позволяют заключить, что экспрессия гликофоринов А и В не связана с агрегационной активностью эритроцитов у кардиохирургических больных. По всей видимости, гиперагрегируемость эритроцитов до операции у больных ИБС с выраженным гемолизом обусловлена высоким содержанием фибриногена в крови, концентрация которого после операции у этих пациентов варьировала в пределах нормы, как и у больных с умеренной гемоглобинемией на обоих этапах исследования (табл. 3). Показано, что помимо неспецифической сорбции фибриногена на эритроцитах происходит также его специфическое связывание, экранирующее поверхностный заряд мембраны и способствующее агрегации клеток [Ройтман Е.В., 2001; Lominadzea D., 2002; Steffen P. et al., 2013]. Важное значение дооперационной гиперфибриногенемии в развитии гемолиза подтверждается ее положительной корреляцией с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после операции ($r = 0,53$; $p < 0,01$). Учитывая, что у больных с выраженным гемолизом до операции отмечался еще и профицит гаптоглобина (табл. 2), подобное состояние можно расценивать как следствие гиперпродукции интерлейкина (IL) 6, как основного регулятора синтеза этих белков [Вельков В.В., 2008; Brock M. et al., 2011; Nakata K. et al., 2012].

Помимо агрегируемости эритроцитов, реологические свойства крови зависят также от их деформируемости, отражающей способность клеток к упругой деформации, и механической резистентности, характеризующей стабильность эритроцитарной мембраны [Сторожок С.А. и соавт., 1997; George A. et al., 2010].

Оказалось, что у пациентов с выраженной гемоглобинемией вне зависимости от этапа исследования деформируемость эритроцитов понижена (т.е. индекс ригидности эритроцитов повышен) относительно здоровых доноров и больных с умеренным гемолизом (табл. 3). Низкая механическая резистентность клеток (т.е. большая доля гемолизированных клеток при механическом воздействии *in vitro*), напротив, была характерной для пациентов с умеренной гемоглобинемией и только до операции, а после операции определялась в обеих группах больных ИБС (табл. 3). Учитывая данные корреляционного анализа этих величин в дооперационном периоде с уровнем гемоглобинемии после ИК, можно заключить, что фактором, предопределяющим степень умеренного гемолиза, является исходное снижение стабильности мембраны эритроцитов ($r = 0,41$; $p < 0,05$; рис

1А), в то время как низкая деформируемость клеток красной крови предрасполагает к формированию выраженной постперфузионной гемоглобинемии ($r = 0,66$; $p < 0,05$; рис 1Б). При этом нарушение деформируемости и стабильности мембраны эритроцитов у больных ИБС может быть вызвано различными факторами: повышением вязкости внутриклеточной среды, изменением вязкостно-эластических свойств мембраны или дисфункцией белков цитоскелета [Ройтман Е.В. и соавт., 2001; Глушков В.С. и соавт., 2004; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Шилов А.М., 2008; Muravyov A., Tikhomirova I., 2012].

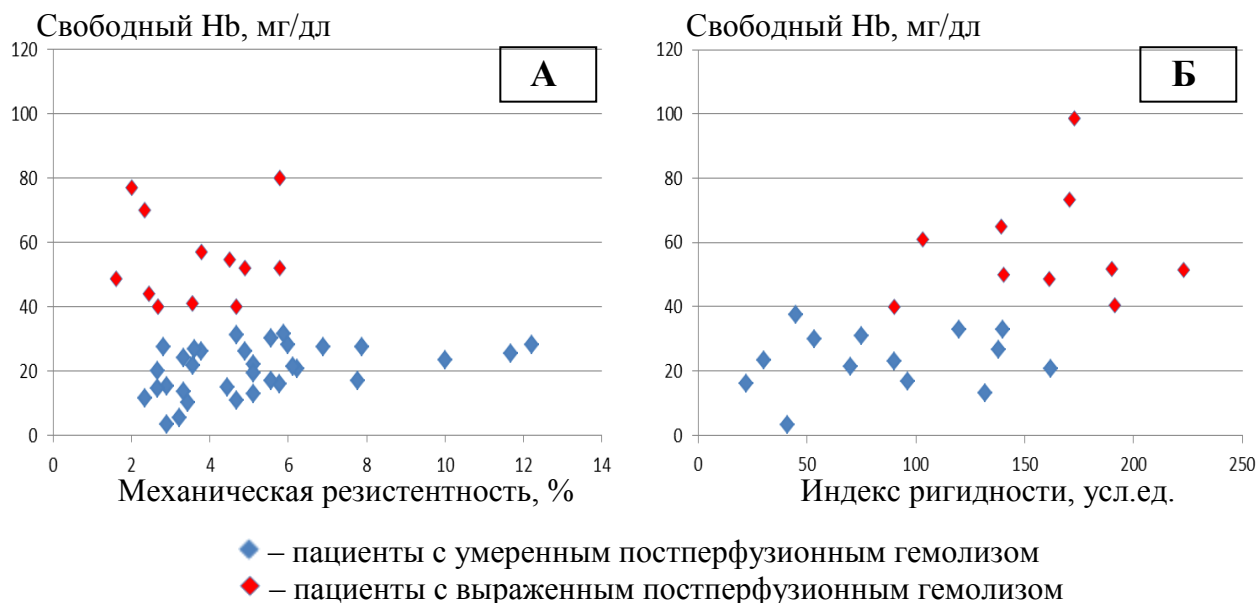


Рис. 1. Зависимость выраженности постперфузионной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца от механической резистентности (А) и деформируемости (Б) эритроцитов до операции в условиях искусственного кровообращения.

Процессы формирования цитоскелета эритроцитов могут существенно изменяться в условиях напряженного эритропоэза, когда ускоренная дифференцировка эритрокариоцитов сопровождается сокращением генерационного времени, необходимого для синтеза белковых молекул, а также миграцией в кровоток ретикулоцитов ранней степени зрелости [Al-Huniti N.H., 2004; Воробьев А.И., 2005; Шперлинг И.А., 2005; Griffiths R.E. et al., 2012]. Вполне возможно, что именно нарушение функционирования белков цитоскелета лежит в основе пониженной деформируемости эритроцитов у больных с выраженным гемолизом.

Вязкостно-эластические свойства клеточной мембраны, как известно, во многом определяются качественным составом липидного бислоя: микровязкость плазмолеммы прямо пропорциональна удельному содержанию холестерина (ХС) в ней и обратно пропорциональна количеству фосфолипидов (ФЛ) и степени ненасыщенности их жирных кислот [Raffy S., Teissie J., 1999; Васильева Е.М.,

2005; Шилов А.М. и соавт., 2008; Кононенко В.А., 2009; Шевченко О.Г., 2010; Bhattacharya A., 2011]. Так, содержание ХС ($0,62 \pm 0,03$ ммоль/мг белка; $p_k < 0,05$) и соотношение ХС/ФЛ (табл. 3) в мембране эритроцитов у больных ИБС обеих групп исследования оказались повышенными как до, так и после операции, а количество общих ФЛ, напротив, пониженным ($0,46 \pm 0,02$ ммоль/мг белка; $p_k < 0,05$), что характерно для дисфункции эритроцитов при атерогенезе [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Солоха Л.Н., Пушников А.А., 2007; Lausada N.R. et al., 2007; Шилов А.М. и соавт., 2008; Рагина Ю.И. и соавт., 2009; Шевченко О.Г., 2010; Larré J.M. et al., 2011].

Между тем, у больных с выраженным гемолизом, эритроциты которых обладали низкой деформируемостью и нормальной механической резистентностью, соотношение ХС/ФЛ в мембране клеток до операции оказалось повышенным всего на 30%, а у больных с умеренной гемоглобинемией, имеющих нормальную деформируемость эритроцитов и низкую механическую резистентность, – на 45% (табл. 3). Кроме того, после операции деформируемость клеток значительно отличалась между группами больных ИБС, в то время как механическая резистентность была сопоставимой при равной величине ХС/ФЛ-отношения (табл. 3). Следовательно, увеличение ХС/ФЛ-отношения в мембране эритроцитов у больных ИБС не может детерминировать снижение деформируемости клеток но, вероятно, определяет недостаточную стойкость эритроцитов к высокой сдвиговой нагрузке.

Важно отметить, что содержание ХС в мембране эритроцитов у больных ИБС после операции практически не изменялось, а количество общих ФЛ несколько возрастало при умеренном гемолизе и незначительно снижалось при выраженной гемоглобинемии, что сопровождалось существенными изменениями фосфолипидного спектра эритроцитарной мембраны. Так, до операции в мембране эритроцитов у больных с умеренной гемоглобинемией обнаруживалось повышение абсолютного содержания лизофосфатидилхолина (лФХ) при низкой концентрации фосфатидилинозитола (ФИ), фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) (табл. 4). Подобные изменения соотношения фракций ФЛ в мембране эритроцитов согласуются с концепцией типовой реакции клеток на повреждение при патологиях различного генеза, в том числе при атеросклерозе [Новицкий В.В. и соавт., 2003, 2004; Lausada N.R. et al., 2007; Свирко Ю.С., 2008; Zhang L. et al., 2010; Colley K.J. et al., 2011; Rosenson R.S., Hurt-Camejo E., 2012]. Между тем, у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом фосфолипидный спектр мембраны эритроцитов в дооперационном периоде характеризовался только дефицитом абсолютного содержания ФХ и ФЭА (табл. 4), что при наличии клинически верифицированного атеросклероза коронарных артерий, вероятно, обуславливалось циркуляцией в

крови большого числа молодых форм эритроцитов (табл. 2).

После хирургического вмешательства у больных ИБС с умеренной гемоглобинемией абсолютное содержание ФИ в мембране эритроцитов нормализовалось, отмечалась тенденция к восстановлению количества лФХ, что, вероятно, связано послеоперационным приростом числа ретикулоцитов в крови – на 87% (табл. 2). При выраженном гемолизе, наоборот, концентрации ФИ и ФХ в мембране снижались на фоне увеличения содержания лФХ (табл. 4). Накопление фосфатидной кислоты в мембране эритроцитов после операции отмечалось независимо от интенсивности гемолитических реакций (табл. 4), и, очевидно, было вызвано активацией фосфолипазы С и D, продуктом которых она является [Munnik T., Testerink C., 2009; Canonne J. et al., 2011; Peng X., Frohman M.A., 2012]. Между тем, послеоперационный прирост числа ретикулоцитов в крови на 30% у больных ИБС с выраженным гемолизом, по-видимому, не компенсировал убыли ФИ и ФХ (табл. 4) вследствие их гидролиза при активации фосфолипазы С и D [Munnik T., Testerink C., 2009; Canonne J. et al., 2011; Peng X., Frohman M.A., 2012], что к тому же сопровождалось увеличением количества лФХ (рис. 2), свидетельствующим о параллельной активации фосфолипазы A_2 в эритроцитах [Nigam S., Schewe T., 2000; Canonne J. et al., 2011; Rosenson R.S., Hurt-Camejo E., 2012]. Поскольку фосфолипаза A_2 гидролизует преимущественно ФХ, а фосфолипаза D обладает исключительной специфичностью к этому ФЛ [Peng X., Frohman M.A., 2012; Mebarek S. et al., 2013], то сочетанная активация данных ферментов могла опосредовать значительное послеоперационное снижение концентрации ФХ в мембране эритроцитов у больных с выраженным гемолизом (табл. 4), которое было сопряжено со степенью выраженности постперфузионной гемоглобинемии ($r = -0,66$; $p < 0,05$).

Таблица 4

Абсолютное содержание фракций фосфолипидов (ммоль/мг белка) в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца до и после операции в условиях искусственного кровообращения

Больные ИБС с умеренным гемолизом		Фракция фосфолипидов	Больные ИБС с выраженным гемолизом	
До операции	После операции		До операции	После операции
↑	↑	Лизофосфатидилхолин	Норма	↑
↓	Норма	Фосфатидилинозитол	Норма	↓
Норма	Норма	Сфингомиелин	Норма	Норма
↓	↓	Фосфатидилхолин	↓	↓↓
Норма	Норма	Фосфатидилсерин	Норма	Норма
↓	↓	Фосфатидилэтаноламин	↓	↓
Норма	↑	Фосфатидная кислота	Норма	↑

Примечание: ↑ - показатель выше нормы ($p < 0,05$), ↓ - ниже нормы ($p < 0,05$).

Следует отметить, что абсолютное содержание сфингомиелина и фосфатидилсерина в мембране эритроцитов соответствовало норме вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования (табл. 4).

Между тем, важным фактором, способным негативно влиять на структурно-функциональные характеристики эритроцитов и состояние липидного бислоя клеток, служат процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) их мембраны [Рязанцева Н.В., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2003, 2004; Васильева А.П. и соавт, 2005; Geetha A. et al., 2007; Krzystek-Korpacka M. et al., 2010; Елкина Н.М. и соавт., 2011; Boisselier E. et al., 2013]. При этом источником генерации активных форм кислорода (АФК) может быть как интрацеллюлярный матрикс эритроцита, так и плазма крови.

Анализ содержания ТБК-активных продуктов (продуктов ПОЛ, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК)) и диеновых конъюгатов в плазме крови у больных ИБС до операции выявил повышенные их значения по сравнению с нормой вне зависимости от степени выраженности постперфузионного гемолиза (в среднем до $1,86 \pm 0,17$ нмоль/мл ($p_k < 0,001$) и $3,85 \pm 0,08$ усл.ед./мл ($p_k < 0,05$) соответственно против $0,60 \pm 0,09$ нмоль/мл и $3,37 \pm 0,09$ усл.ед./мл у здоровых доноров). Это может быть обусловлено избыточным поступлением в кровоток АФК и продуктов ПОЛ из ишемизированных кардиомиоцитов и других клеток организма, находящихся в состоянии гипоксии при недостаточности кровообращения [Карпов Ю.А., Сорокин Е.В., 2001; Кузьменко Д.И., 2007; Voigt A. et al., 2013].

В послеоперационном периоде концентрация ТБК-активных продуктов в плазме крови у кардиохирургических больных еще более нарастала независимо от выраженности постперфузионного гемолиза (до $2,78 \pm 0,30$ нмоль/мл; $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,05$) на фоне сохраняющегося избытка диеновых конъюгатов. Это свидетельствует об интраоперационной интенсификации ПОЛ в тканях при экстракорпоральной перфузии, которая, с одной стороны, сопровождается артериальной гипероксией, а с другой – централизацией кровообращения и редукцией периферического кровотока [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007; Vercaemst L., 2008; Young R.W., 2012]. Наряду с этим, в условиях интраоперационного накопления продуктов ПОЛ в крови у больных ИБС исходно низкая общая антиокислительная активность плазмы крови ($0,32 \pm 0,03$ усл.ед./мин против $0,50 \pm 0,05$ усл.ед./мин в норме; $p_k < 0,05$) прогрессивно уменьшалась после операции вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (до $0,23 \pm 0,02$ усл.ед./мин; $p_k < 0,05$; $p_1 < 0,05$). Несомненно, в условиях интенсивной генерации АФК антиокислительный потенциал плазмы крови истощается, что

имеет место до операции и усугубляется во время ИК, когда дефицит антиоксидантов потенцируется значительной гемодилуцией. Таким образом, равный по величине недостаток антиоксидантов и избыток прооксидантов в плазме крови у больных ИБС не может быть причиной различной выраженности гемолитических реакций во время ИК, что сдвигает фокус исследований на интрацеллюлярный матрикс эритроцитов.

Изучение процессов пероксидации липидов мембраны эритроцитов позволило выявить наличие повышенного содержания ТБК-активных продуктов в эритроцитах у больных ИБС обеих групп исследования по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров как до, так и после операции (рис. 2), что отражает интенсификацию ПОЛ в эритроцитарной мембране при ИБС и вполне согласуется с данными литературы [Кленова Н.А., Фатенков О.В., 2004; Новицкий В.В., 2004; Coccia R. et al., 2007; Шилов А.М. и соавт., 2008; Belaia O.L. et al., 2009; Dandana A. et al., 2011; Ziobro A. et al., 2013]. При анализе уровня диеновых конъюгатов в эритроцитах у больных ИБС было обнаружено его понижение вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования ($35,90 \pm 1,08$ усл.ед./мл при $41,25 \pm 1,28$ усл.ед./мл у здоровых доноров; $p_k < 0,05$).

После операции концентрация ТБК-активных продуктов в эритроцитах возрастала по сравнению с дооперационным периодом только у больных с выраженной гемоглобинемией (рис. 2), что свидетельствует о потенцировании ПОЛ во время ИК лишь у данной категории пациентов. Кроме того, именно при выраженной гемоглобинемии в послеоперационном периоде отмечалась положительная корреляция между ее уровнем и концентрацией ТБК-активных продуктов в эритроцитах ($r = 0,58$; $p < 0,05$; рис. 3А). Следовательно, свободнорадикальное повреждение молекулярных структур эритроцитов лежит в основе патогенеза массивного гемолиза и не свойственно пациентам с умеренной гемоглобинемией.

При анализе внутриклеточных факторов антиоксидантной защиты было установлено снижение активности супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах до операции у больных ИБС обеих групп исследования (рис. 2). Так как СОД представляет собой индуцируемый фермент, активность которого зависит от парциального давления кислорода в среде [Pavliuk N.V. et al., 1998; Кузьменко Д.И., 2007; Zhao Y. et al., 2012], и поскольку заболевания легких, сочетающиеся в 30% случаев с артериальной гипоксемией [Новицкого В.В. и соавт., 2004], у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом встречались в 3 раза чаще, чем у лиц с умеренной гемоглобинемией (табл. 1), то тот факт, что активность СОД в эритроцитах у этих пациентов до операции была несколько ниже, чем у лиц с умеренным гемолизом, представляется вполне закономерным

(рис. 2). Во время ИК гипоксическая гипоксия устраняется путем создания артериальной гипероксии [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007; Vercaemst L., 2008; Young R.W., 2012], что объясняет позитивную динамику активности СОД в эритроцитах у пациентов с выраженным (но не с умеренным) гемолизом, величина которой, тем не менее, после ИК не достигала нормы (рис. 2).

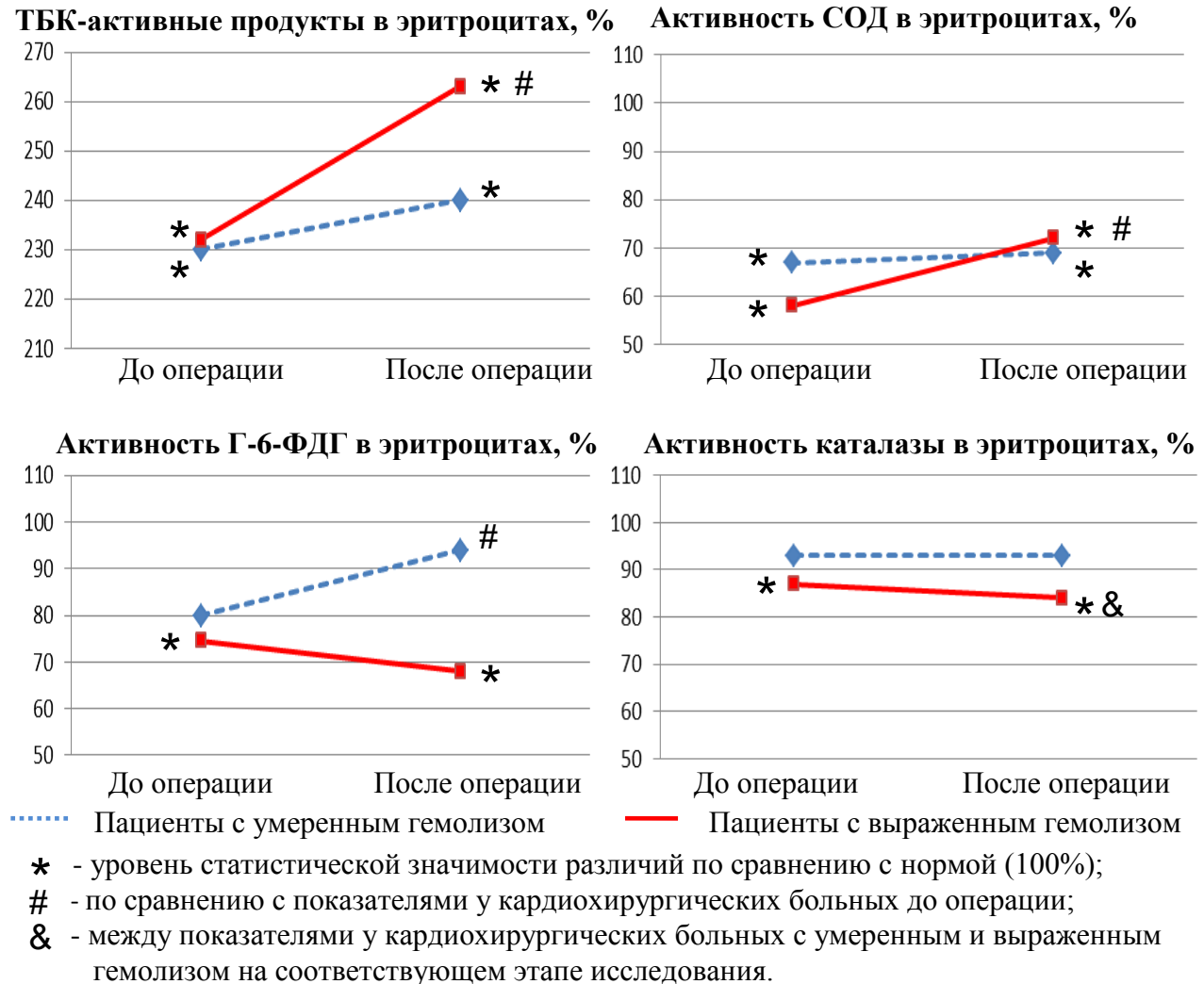


Рис. 2. Динамика активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) и содержания ТБК-активных продуктов в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом (в % от величины показателей у здоровых доноров).

Исследование активности каталазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) в эритроцитах констатировало низкий их уровень (по сравнению с нормой) у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом на всех этапах исследования, в отличие от нормальных их значений у пациентов с умеренной гемоглобинемией (рис. 2). Принимая во внимание тот факт, что до операции у больных с выраженным гемолизом количество ретикулоцитов в крови было больше (табл. 2), чем в группе сравнения, выявленная низкая активность ферментов у этой категории лиц не укладывается в традиционное представление о

высокой функциональной активности молодых форм эритроцитов, обладающих максимальным запасом метаболически активных молекул [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Воробьев А.И., 2005; Морозова Т.В. и соавт., 2007; Liu J.J. et al., 2010; Ney P.A., 2011; Ghashghaeinia M. et al., 2012]. По всей видимости, у больных с выраженным гемолизом имеет место функциональная неполноценность механизмов антиоксидантной 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. Кроме того, нельзя исключать и недостаточный синтез каталазы и Г-6-ФДГ в клетках красной крови при ускоренной дифференцировке эритрокариоцитов.

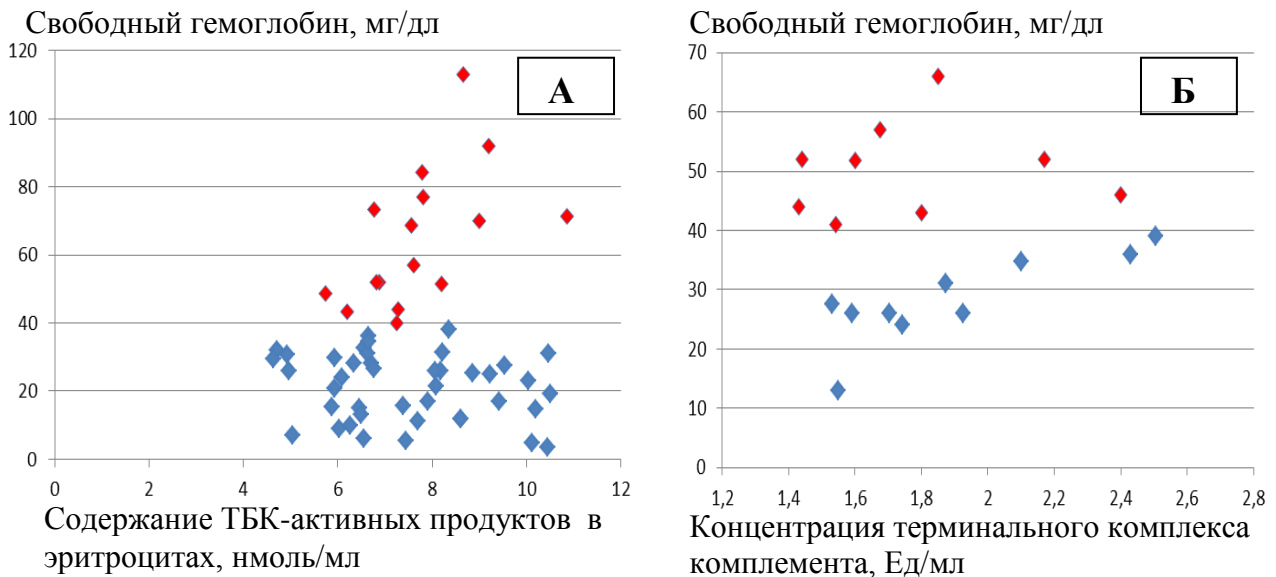


Рис. 3. Зависимость степени выраженности постперфузионной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца от содержания ТБК-активных продуктов в эритроцитах (А) и концентрации терминального комплекса комплемента в крови (Б) после операции в условиях искусственного кровообращения.

Примечание: см. рис. 1.

После операции у больных ИБС с умеренным гемолизом активность каталазы в эритроцитах оставалась в пределах нормы, при этом активность Г-6-ФДГ возрастала по сравнению с дооперационными значениями (рис. 2), что объясняется, очевидно, мобилизацией в кровь костномозгового резерва ретикулоцитов, обладающих высоким содержанием Г-6-ФДГ и антиоксидантов (кроме каталазы) [Sailaja Y.R. et al., 2003; Лакомая Ю.А., 2006; Морозова Т.В. и соавт., 2007; Liu J.J. et al., 2010; Ney P.A., 2011; Ghashghaeinia M. et al., 2012]. У больных с выраженной гемоглобинемией активность каталазы и Г-6-ФДГ в эритроцитах после ИК, по-прежнему, регистрировалась менее нормы, проявляя негативную тенденцию по отношению к дооперационным значениям (рис. 2).

Одним из эффектов активации ПОЛ в клетках является увеличение неспецифической проницаемости их мембраны, в том числе и для гидрофильных низкомолекулярных веществ, например, мочевины [Михайлович В.А. и соавт., 1993; Пасечник И.Н., 2001; Васильева Е.М., 2005; Belaia O.L. et al., 2009; Perrone S. et al., 2012]. На этом основано изучение проницаемости мембраны эритроцитов с помощью мочевинового гемолиза, т.е. чем меньше концентрация мочевины в растворе, при которой отмечается цитолиз 50% эритроцитов, тем выше проницаемость клеточной мембраны [Михайлович В.А. и соавт., 1993].

Оценка проницаемости мембраны эритроцитов позволила установить, что у больных с умеренным постперфузионным гемолизом уровень 50% цитолиза эритроцитов в растворе мочевины соответствовал норме до оперативного вмешательства и снижался после его завершения (до $0,984 \pm 0,008\%$ мочевины по сравнению с исходным значением $1,026 \pm 0,012\%$ мочевины; $p_k < 0,05$; $p_1 < 0,05$), отражая интраоперационное увеличение проницаемости эритроцитарной мембраны. В то же время, формированию выраженной постперфузионной гемоглобинемии уже предшествовало снижение показателя мочевинового гемолиза ($0,971 \pm 0,014\%$ мочевины; $p_k < 0,05$), которое сохранялось таковым и в послеоперационном периоде. Следовательно, проницаемость мембраны эритроцитов у этой категории лиц была повышенной еще до проведения ИК, выполняя, вероятно, роль предрасполагающего фактора в развитии выраженного гемолиза во время ИК. Сопоставляя данные, приходится констатировать, что интраоперационное изменение проницаемости эритроцитарной мембраны для низкомолекулярных гидрофильных веществ (отмечается при развитии умеренного гемолиза) не связано с потенцированием ПОЛ (регистрируется только при выраженной гемоглобинемии).

Другим механизмом, способным изменять проницаемость клеточных мембран, служит комплемент-зависимый лизис клеток, который в норме не затрагивает структуры макроорганизма, поскольку они несут естественные ингибиторы системы комплемента. Отсутствие подобных молекул на чужеродных поверхностях (микроорганизмах, модулях аппарата ИК и т.д.), как и недостаток таковых на собственных клетках организма, индуцирует активацию комплемента [Glovsky M. et al., 2004; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Testa L. et al., 2008].

В ходе исследования было показано, что содержание терминального комплекса комплемента (ТКК) в крови до операции у больных ИБС двух групп сравнения определялось выше значений у здоровых доноров (табл. 4). По данным литературы, усиление активности комплемента действительно отмечается при атеросклерозе [Лутай М.И., 2004; Lewis R.D. et al., 2011; Frauenknecht V., Schroeder V., 2012; Horváth Z. et al., 2013; Torzewski M., Bhakdi S., 2013]. После операции у

кардиохирургических больных содержание ТКК в сыворотке крови многократно возросло по отношению к исходным его значениям вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 4). Феномен чрезмерной активации системы комплемента в условиях ИК известен давно [Fromes Y. et al., 2002; Paparella D. et al., 2002; Van den Goor J. et al., 2004; Дементьева И.И. и соавт., 2008; Kubicki R. et al., 2013; Papadopoulos N. et al., 2013], однако важно заметить, что содержание ТКК в сыворотке крови положительно коррелировало с уровнем гемоглобинемии после операции только у больных с умеренным постперфузионным гемолизом ($r = 0,61$; $p < 0,05$), в отличие от пациентов другой группы исследования (рис. 3Б). Следовательно, формирование умеренной гемоглобинемии обусловлено комплемент-зависимым лизисом эритроцитов во время перфузии, который при этом не играет ведущей роли в патогенезе выраженного постперфузионного гемолиза.

Функциональная активность классического пути комплемента (отражает потенциальный резерв его факторов в крови) до операции у кардиохирургических больных с умеренным постперфузионным гемолизом превышала норму, проявляя аналогичную тенденцию у пациентов с выраженной гемоглобинемией (табл. 4). Подобные изменения, скорее всего, обусловлены процессом атерогенеза, который сопровождается гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (интерлейкина (IL) 1, IL-6 и фактора некроза опухолей (TNF) α) [Schlaf G. et al., 2001; Лутай М.И., 2004; Ait-Oufella H. et al., 2009; Libby P., 2012; Gu H. et al., 2012]. Кроме того, у этой категории больных до операции была зарегистрирована положительная корреляция между активностью классического пути системы комплемента и количеством ТКК в сыворотке крови ($r = 0,79$; $p < 0,05$), т.е. избыточное его образование до ИК у больных с умеренной гемоглобинемией является результатом гиперпродукции факторов классического пути. После ИК активность классического пути комплемента у кардиохирургических больных обеих групп сравнения снижалась ниже исходных цифр, оставаясь при этом в пределах нормы (табл. 4).

Функциональная активность альтернативного пути комплемента до операции у больных ИБС с выраженным гемолизом была недостаточной по отношению к таковой у здоровых доноров и пациентов с умеренной гемоглобинемией (табл. 4). Это, очевидно, отражает дефицит факторов альтернативного пути активации комплемента у больных с выраженным гемолизом, что возможно либо при недостаточном их синтезе, либо при чрезмерном потреблении [Ройт А. и соавт., 2000; Tsukamoto H., Horiuchi T., 2006]. Отрицательная корреляция между содержанием ТКК в крови и функциональной активностью альтернативного пути комплемента ($r = -0,86$; $p < 0,05$) у пациентов с выраженным гемолизом позволяет предполагать именно потребление факторов

последнего вследствие его гиперактивации. После операции определялось резкое снижение активности альтернативного пути комплемента у больных ИБС обеих групп исследования (табл. 4), что, по всей видимости, отражает массивное потребление его компонентов во время ИК при взаимодействии крови с чужеродными поверхностями аппарата [Paparella D. et al., 2002; Van den Goor J. et al., 2004; Nilsson B. et al., 2007; Marcheix B. et al., 2008]. Активность лектинового пути комплемента оставалась в пределах нормы независимо от выраженности постперфузионной гемоглобинемии и этапа исследования (табл. 4).

Таблица 4

Характеристика системы комплемента у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операции с искусственным кровообращением ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n=18)	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=36)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=20)
Содержание ТКК, $\times 10^{-3}$ Ед/мл	235,12 \pm 26,31	359,05 \pm 44,72 $p_k < 0,05$	433,20 \pm 36,18 $p_k < 0,05$
		2210,63 \pm 104,90 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,001$	2022,37 \pm 68,07 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,001$
Функциональная активность классического пути комплемента, %	100,03 \pm 7,12	133,08 \pm 8,85 $p_k < 0,05$	117,44 \pm 9,88
		103,43 \pm 6,06 $p_1 < 0,001$	96,72 \pm 14,14 $p_1 < 0,05$
Функциональная активность альтернативного пути комплемента, %	70,01 \pm 6,58	72,94 \pm 4,88	43,74 \pm 7,07 $p_k < 0,05$; $p_2 < 0,05$
		5,78 \pm 1,76 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,001$	1,37 \pm 0,65 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,01$

Примечание: См. табл. 2.

Причиной дооперационной активации альтернативного пути комплемента у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом можно рассматривать дефицит CD55-позитивных эритроцитов в крови до операции (60,12 \pm 4,19% против 84,65 \pm 7,13% у здоровых доноров; $p_k < 0,05$), который сохранялся и в послеоперационном периоде. В то же время численность CD35-положительных эритроцитов в крови у больных ИБС варьировала в пределах нормы вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования (72,18 \pm 10,23%). Обе молекулы, как известно, выполняют роль ингибиторов системы комплемента и при недостатке опосредуют его активацию [Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., 2001; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Alegretti A.P. et al., 2012; Lv W. et al., 2013]. Возможно, инициация комплемента по альтернативному пути ввиду дефицита CD55⁺ эритроцитов до операции у больных с выраженным гемолизом обуславливает увеличение проницаемости мембраны эритроцитов еще до ИК, а у больных с умеренной гемоглобинемией это

происходит только во время перфузии, что сопровождается интраоперационным повышением проницаемости цитолеммы эритроцитов.

Между тем, средний объем эритроцита у оперированных больных ИБС обеих групп соответствовал норме до операции и уменьшался в послеоперационном периоде, но более значительно у больных ИБС с умеренным гемолизом ($(83,13 \pm 0,85) \times 10^{-15}$ /л; $p_k < 0,05$; $p_1 < 0,01$), чем у пациентов с выраженной гемоглобинемией ($(86,50 \pm 0,91) \times 10^{-15}$ /л; $p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$). Таким образом, 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. Данный факт свидетельствует об участии механизмов поддержания ионного гомеостаза клетки в изменении объема эритроцитов после ИК.

Определение активности Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы (АТФазы) мембраны эритроцитов у больных ИБС с умеренным гемолизом установило низкие значения показателя до операции при нормальном содержании АТФ, что сохранялось в послеоперационном периоде (рис. 4) и вполне укладывается в современные представления о патологии периферического звена эритрона при атеросклерозе [Новицкий В.В. и соавт., 2003; Broncel M. et al., 2007; Кравец Е.Б. и соавт., 2010].

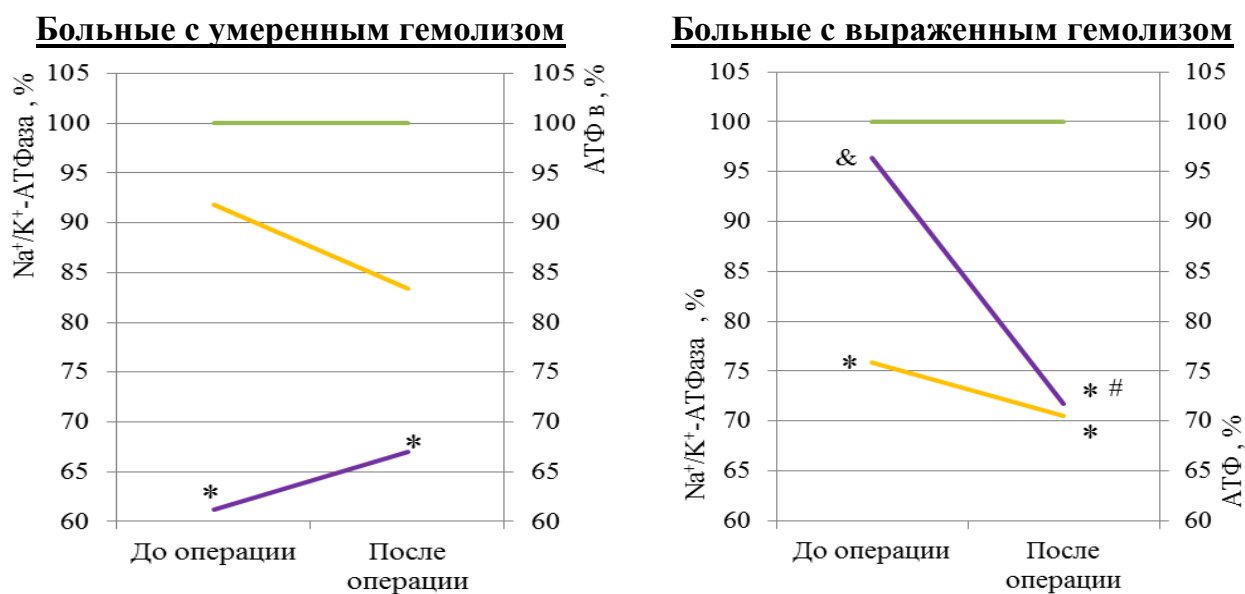


Рис. 4. Активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов и содержание АТФ в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.

Примечание: См. рис. 2; ■ - активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов, %; ■ - содержание АТФ в эритроцитах; ■ - здоровые доноры (100%).

При развитии выраженного гемолиза, наоборот, активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов до операции была нормальной (рис. 4), что, вероятно,

связано со значительным ретикулоцитозом у пациентов в дооперационном периоде, однако концентрация АТФ в клетках определялась на низком уровне и сохранялась таковой после хирургического вмешательства на фоне интраоперационного снижения активности фермента (рис. 4). Последнее, вероятно, обусловлено нарастанием во время ИК ХС/ФЛ-соотношения в мембране эритроцитов (табл. 3), содержания лФХ (табл. 4) и активности процессов свободнорадикального окисления (рис. 2), угнетающих активность Na^+/K^+ -АТФазы [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Васильева Е.М., 2005; Коновалова Т.Т., 2005; Кравец Е.Б. и соавт., 2010; Suhail M., 2010]. Следовательно, в послеоперационном периоде активность Na^+/K^+ -АТФаза эритроцитов была одинаково низкой и при умеренном, и при выраженном гемолизе, но в первом случае это сочеталось с нормальным содержанием АТФ в клетках, во втором – с его дефицитом, что, видимо, способствовало аккумуляции Na^+ в клетке и увеличению объема эритроцита.

Другим механизмом, способным влиять на объем клетки, является система Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов ($\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов), открывание которых при повышении внутриклеточных концентраций Ca^{2+} приводит к пассивному выходу ионов K^+ из клетки, что влечет за собой удаление Cl^- и H_2O [Maher A.D., Kuchel P.W., 2003; Begenesich T. et al., 2004; Трубочева О.А. и соавт., 2011; Yuan P. et al., 2011]. Данный механизм предохраняет эритроциты от осмотического лизиса при увеличении проницаемости мембраны и при комплемент-зависимом повреждении эритроцитов [Петрова И.В., 1999; Shen A.Y. et al., 2007; Атауллаханов Ф.И. и соавт., 2009; Föllner M. et al., 2010].

Изучение Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа (ГПО) эритроцитов показало, что амплитуда и скорость гиперполяризации мембраны эритроцитов у больных ИБС соответствовали показателям у здоровых доноров вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования ($1,56 \pm 0,06$ мВ и $4,79 \pm 0,44$ мэквОН $^-$ /(мин \times л клеток) соответственно), отражая нормальный процесс открывания $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов [Петрова И.В., 1999; Maher A.D., Kuchel P.W., 2003; Yuan P. et al., 2011].

Скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов до операции у больных с умеренным гемолизом была существенно ниже таковой у пациентов с выраженной гемоглобинемией и здоровых доноров (табл. 5), что согласуется с данными литературы об угнетении активности Ca^{2+} -АТФазы мембраны эритроцитов у лиц, страдающих атеросклерозом [Медведева И.В. и соавт., 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Этого не отмечалось в другой группе пациентов, очевидно, ввиду выраженного ретикулоцитоза (табл. 2). В послеоперационном периоде данный показатель проявлял тенденцию к снижению при умеренной гемоглобинемии, а при выраженной – к увеличению (табл. 5).

При этом время достижения максимальной величины потенциала мембраны при ГПО эритроцитов (ΔT) у пациентов с выраженным гемолизом сокращалось в сравнении с нормой после операции, чего не определялось до ИК, а также у больных с умеренным гемолизом на обоих этапах исследования (табл. 5).

Таблица 5

Параметры Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов, содержание эритропоэтина и фактора некроза опухолей α в крови у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операции с искусственным кровообращением ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n=12)	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=37)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=25)
Время достижения максимальной гиперполяризации мембраны (ΔT), с	45,31 \pm 2,71	43,54 \pm 2,83	41,15 \pm 2,53
		40,30 \pm 2,01	36,99 \pm 1,92 $p_k < 0,05$
Скорость восстановления мембранного потенциала, мэквН ⁺ /(мин \times л клеток)	1,76 \pm 0,12	1,35 \pm 0,11 $p_k < 0,05$	1,48 \pm 0,13
		1,26 \pm 0,10 $p_k < 0,05$	1,71 \pm 0,14 $p_2 < 0,05$
Концентрация ЕРО в крови, мМЕ/мл	11,24 \pm 1,00	14,93 \pm 0,90 $p_k < 0,05$	11,10 \pm 0,94 $p_2 < 0,05$
		22,65 \pm 1,64 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,001$	16,17 \pm 1,46 $p_k < 0,05$; $p_1 < 0,05$; $p_2 < 0,05$
Концентрация TNF- α в крови, пг/мл	1,77 \pm 0,30	3,78 \pm 0,29 $p_k < 0,001$	1,95 \pm 0,22 $p_2 < 0,05$
		7,52 \pm 1,27 $p_k < 0,001$; $p_1 < 0,05$	6,18 \pm 1,55 $p_k < 0,01$; $p_1 < 0,05$

Примечание: См. табл. 2, TNF- α – фактор некроза опухолей α , ЕРО – эритропоэтин.

Таким образом, у больных с умеренной гемоглобинемией из-за пониженной активности Ca^{2+} -АТФазы мембраны эритроцитов реверсия внутриклеточной концентрации Ca^{2+} происходит медленно, медленно закрываются и $K^+(Ca^{2+})$ -каналы, благодаря чему из клетки удаляется большее количество K^+ и объем эритроцита сильно уменьшается, предохраняя клетку от лизиса при возрастающей проницаемости мембраны во время ИК. При выраженном гемолизе большая (чем в другой группе больных) активность Ca^{2+} -АТФазы быстро элиминирует ионы Ca^{2+} из клетки, $K^+(Ca^{2+})$ -каналы быстро закрываются (т.к. сокращение ΔT) и объем эритроцита уменьшается незначительно, что при высокой проницаемости цитолеммы способствует ускоренному лизису клетки. Важная роль механизмов регуляции объема эритроцита в патогенезе гемолиза подтверждается положительной корреляцией этого показателя с концентрацией свободного гемоглобина в крови после операции ($r = 0,40$; $p < 0,01$) и результатами

дисперсионного анализа, установившими статистически значимый вклад данного параметра и величины ΔT в вариабельность гемоглобинемии после ИК ($p < 0,05$).

Не исключено, что причиной послеоперационного повышения активности Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах у больных с выраженным гемолизом (относительно другой группы пациентов) служит увеличение интрацеллюлярной концентрации Ca^{2+} [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Васильева Е.М., 2005; Mangialavori I. et al., 2011; Pengranichprakdee N. et al., 2012]. В настоящее время показано, что поступление Ca^{2+} в эритроциты происходит через неспецифические катионные каналы типа TRPC6, которые активируются при окислительном стрессе и воздействии простагландина E_2 [Kaestner L., Bernhardt I., 2002; Föllner M. et al., 2008; Lang E. et al., 2012]. С другой стороны, поступление Ca^{2+} в эритроциты может сдерживаться в присутствии эритропоэтина (ЕРО) [Myssina S. et al., 2003; Lang F., Qadri S.M., 2012].

Измерение концентрации ЕРО в плазме крови у кардиохирургических больных обнаружило, что у пациентов с умеренным гемолизом данный показатель статистически значимо превышал таковой в группе сравнения на обоих этапах исследования (табл. 5), эффективно предохраняя эритроциты от поступления Ca^{2+} . Важно заметить, что именно послеоперационное содержание ЕРО в сочетании с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после ИК позволило кластеризовать популяцию больных ИБС на пациентов с умеренным и выраженным гемолизом ($p < 0,05$ для концентрации ЕРО при $p < 0,001$ для свободного гемоглобина).

Следует отметить, что ЕРО поддерживает жизнеспособность эритроцитов, взаимодействуя с собственными рецепторами на их поверхности и ограничивая эритроцитоз [Глушков В.С., Сторожок С.А., 2009]. Очевидно, поэтому количество эритроцитов в крови до операции у больных с умеренным гемолизом было больше, чем у лиц с выраженной гемоглобинемией $((4,94 \pm 0,06) \times 10^{12}/л$ и $(4,68 \pm 0,07) \times 10^{12}/л$ соответственно; $p_2 < 0,05$) при равном содержании гемоглобина в крови (в среднем $148,26 \pm 2,13$ г/л). Кроме того, у больных с выраженным гемолизом, по всей видимости, имеет место дисрегуляция эритропоэза (так как ретикулоцитоз (табл. 2) выявлялся в отсутствие повышения концентрации ЕРО в крови (табл. 5)) и образование неполноценных эритроцитов (с низкой деформируемостью, активностью каталазы и Г-6-ФДГ, дефицитом АТФ и CD55). В то же время у пациентов с умеренной гемоглобинемией увеличение числа ретикулоцитов до операции сочеталось с повышением концентрации ЕРО в крови (табл. 5). ЕРО, как известно, контролирует не только пролиферацию эритрокариоцитов, но и экспрессию эритроид-специфичных генов, кодирующих синтез белков цитоскелета, антиоксидантных, гликолитических ферментов и других протеинов [Chateauvieux S. et al., 2011; Sarrazin S., Sieweke M.,

2011; Lin K.R. et al., 2013]. При этом высокое содержание TNF- α в крови до операции у больных с умеренным гемолизом (табл. 5), вероятно, оказывало протективное действие на эритропоэз, так как известно, что проапоптотическое действие этого цитокина на поздние клетки-предшественницы эритроцитов нивелируется в условиях избытка EPO [Pregi N. et al., 2009]. TNF- α ингибирует их пролиферацию только за счет увеличения генерационного времени, что способствует окончательной сборке белков цитоскелета в эритроцитах [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Chen K. et al., 2009; Liu J.J. et al., 2010]. Очевидно, поэтому регистрировалась отрицательная взаимосвязь содержания TNF- α в крови до операции с выраженностью гемоглобинемии в послеоперационном периоде ($r = -0,48$; $p < 0,05$). Более того, этот параметр оказался одним из двух показателей, позволяющих уже на этапе до операции дифференцировать кардиохирургических больных на пациентов с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом (по результатам кластерного анализа). Вторым фактором оказался индекс ригидности эритроцитов, что позволяет предполагать определяющую роль TNF- α в механизмах формирования цитоскелета.

Дооперационные различия цитокинового профиля крови у больных ИБС с умеренным и выраженным гемолизом, по-видимому, связаны с характером сопутствующей патологии и спектром применяемых препаратов. Так, лица с умеренным постперфузионным гемолизом чаще страдали патологией почек (табл. 1), которая в ряде случаев может способствовать гиперпродукции EPO при увеличении уровня TNF- α [Ермоленко В.М., Иващенко М.А., 2000; Bunn H.F., 2013]. Среди пациентов с выраженной гемоглобинемией чаще встречались хронические заболевания легких (табл. 1), которые сопровождаются избытком IL-6, подавляющего синтез EPO, и TNF- α [Markoulaki D. et al., 2011]. Кроме того, эти больные чаще применяли фозиноприл ($22,73 \pm 6,39\%$ против $3,85 \pm 2,69\%$ в группе с умеренным гемолизом, $p_2 < 0,05$), который, как ингибитор ангиотензинпревращающего фермента с сильным противовоспалительным эффектом, препятствует синтезу TNF- α и EPO [van der Meer P. et al., 2005; Hubert C. et al., 2006; Уранов В.Н., 2010].

Особенно интересным фактом в процессе исследования оказалось отчетливое преобладание 0-фенотипа эритроцитов системы АВ0 среди больных с умеренным гемолизом и более частая встречаемость экспрессии В-антигена на клетках у лиц с выраженной гемоглобинемией (табл. 6). Анализ частоты встречаемости антигенов и неполных фенотипов эритроцитов системы Резус обнаружил у больных с выраженным гемолизом превалирование ss-фенотипа при более редкой встречаемости С-антигена по сравнению с пациентами с умеренным постперфузионным гемолизом (табл. 6). Это означает, что С-антиген обладает протективным влиянием на гемолитическую стойкость эритроцитов и его

отсутствие на мембране (сс-фенотип) предрасполагает к выраженному постперфузионному гемолизу. Последнее подтверждается коэффициентом ассоциации данного признака с высокой интенсивностью гемолитических реакций после ИК ($r_a = 0,44$; $p < 0,05$).

Таблица 6

Частота встречаемости антигенов и фенотипов эритроцитов систем групп крови АВ0 и Резус при умеренном и выраженном гемолизе у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения ($S_w \pm w$)

Показатели	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=98)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=52)
А-антиген, %	44,86±5,02	48,07±7,00
В-антиген, %	23,47±4,30 *	36,53±6,74
0-фенотип, %	42,82±4,99	32,69±6,57
С-антиген, %	79,52±4,45	58,69±7,34; $p_2 < 0,05$
сс-фенотип, %	20,48±4,46	41,30±7,34; $p_2 < 0,05$

Примечание: См. табл. 1; *- показатель отличался от частоты встречаемости А-антигена и 0-фенотипа (отсутствие антигенов А и В) эритроцитов среди пациентов с умеренным гемолизом при уровне статистической значимости различий $p < 0,05$.

В итоге результаты настоящего исследования были положены в основу создания двух способов прогнозирования постперфузионной гемоглобинемии: первый позволяет предсказать концентрацию свободного гемоглобина в крови после операции (формула 1; коэффициент детерминации 0,96; $p = 0,02$); второй способ прогнозирует риск выраженного гемолиза при перфузии (формула 2; диагностическая чувствительность 85,7%; специфичность 84,0%, эффективность 84,8%) и если его величина превышает 6,0 баллов, то вероятность выраженного гемолиза составляет 82,0%.

$$Y = 139,60 - 1,43 \cdot X_{\text{ЕРО}} - 0,44 \cdot X_{\text{ТНФ}} - 29,20 \cdot X_{\Delta\text{Е}} - 38,64 \cdot X_{V_2} - 0,90 \cdot X_{\Delta\text{Т}} \quad (1),$$

где дооперационные показатели: $X_{\text{ЕРО}}$ – концентрация эритропоэтина в плазме крови, $X_{\text{ТНФ}}$ – концентрация фактора некроза опухолей α в плазме крови, $X_{\Delta\text{Е}}$ – амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов, X_{V_2} – скорость восстановления мембранного потенциала при гиперполяризационном ответе эритроцитов, $X_{\Delta\text{Т}}$ – время развития максимальной величины мембранного потенциала при ГПО эритроцитов.

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

где: ГРП – гемолитический риск 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 Т/л; $X_{\text{поч}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) болезней почек; $X_{\text{С}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) на эритроцитах С-антигена системы Резус.

Таким образом, полученные данные позволяют сформировать 2 схемы патогенеза постперфузионного гемолиза (рис. 6 и 7).

Развитие умеренного внутрисосудистого гемолиза у больных ИБС после ИК ассоциировано с сочетанной патологией почек до операции, что

сопровождается повышением содержания TNF- α и EPO в крови в этот период (рис. 6). 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-молекул, обуславливающих нормальную проницаемость мембраны при повышенной активности ПОЛ и резко увеличенном ХС/ФЛ-соотношении в мембране клеток красной крови (вследствие атеросклероза и длительной циркуляции их в кровотоке). Последнее, снижая механическую резистентность эритроцитов, вероятно, является основной причиной деструкции клеток в крупных сосудах кровеносного русла и причиной гемолиза у больных ИБС до операции. Однако усиленный эритродиерез, видимо, уравнивается сбалансированной активацией эритропоэза в костном мозге, который протекает на фоне повышенного содержания EPO, обеспечивающего не только адекватный синтез эритроцитарных белков, но и ингибирующего физиологический эриптоз, что, в итоге, определяет поддержание числа эритроцитов в пределах несколько повышенных значений (превышают таковые у больных с выраженным гемолизом) (рис. 6).

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 в виду 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 (рис. 6). Комплемент-зависимый лизис эритроцитов является основным патогенетическим фактором умеренного гемолиза и опосредует повышение неспецифической проницаемости мембраны эритроцитов для низкомолекулярных веществ, которое 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 EPO в плазме крови, блокирующего неселективные катионные каналы эритроцитов. К тому же протективное влияние 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

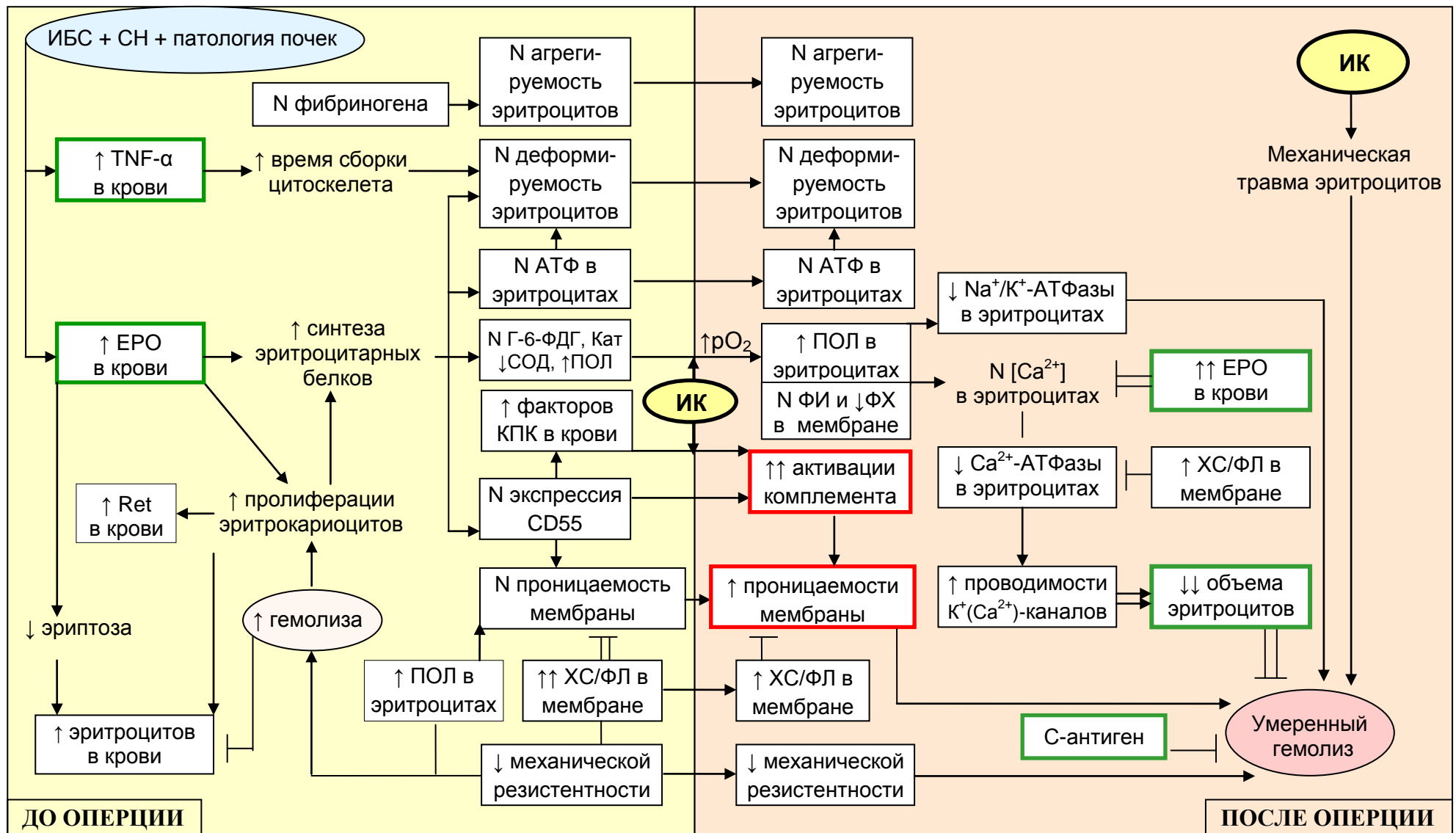


Рис. 6. Схема патогенеза внутрисосудистого гемолиза до и после операции у больных ишемической болезнью сердца с умеренной постперфузионной гемоглобинемией. *Примечание:* Кат – каталаза, Ret – ретикулоциты, КПК – классический путь активации комплемента; — ведущие патогенетические факторы, — факторы защиты, — усиление, — угнетение; в квадраты заключены результаты собственных исследований.

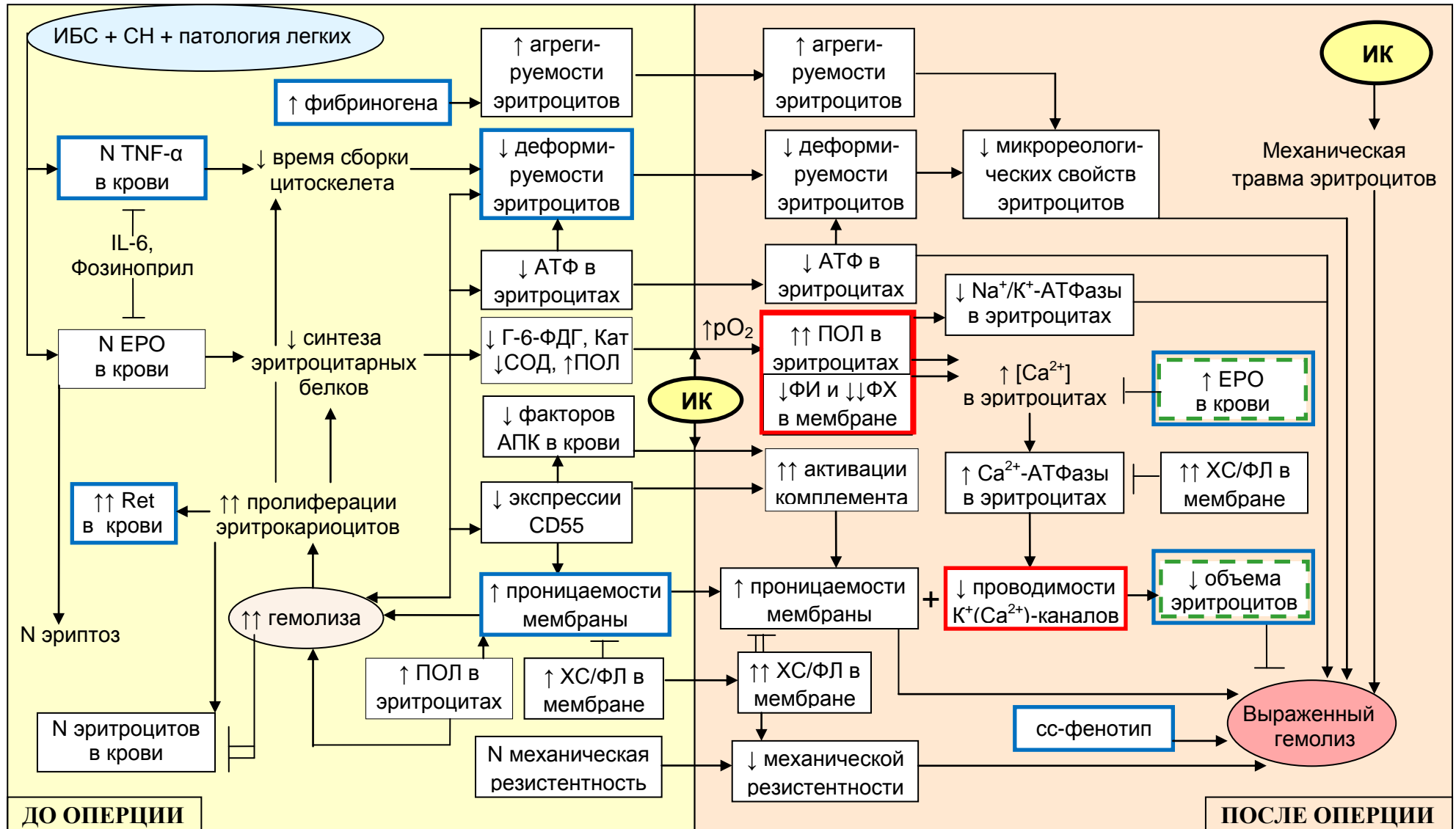


Рис. 7. Схема патогенеза внутрисосудистого гемолиза до и после операции у больных ишемической болезнью сердца с выраженной постперфузионной гемоглобинемией. *Примечание:* см. рис. 6; АПК – альтернативный путь активации комплемента; — — — слабо выраженные факторы защиты, — факторы риска (статистически подтвержденные корреляционным или дисперсионным анализом).

механической резистентностью (рис. 6).

Формированию выраженного постперфузионного гемолиза у больных ИБС предшествует сопутствующая патология легких, назначение фозиноприла и, возможно, избыток IL-6, что, несмотря на наличие атеросклероза и сердечной недостаточности, сочетается с нормальным содержанием TNF- α и EPO в крови до операции (рис. 7). В этом случае усиление гемолитических процессов при патологии компенсируется интенсивной пролиферацией эритрокариоцитов под влиянием продуктов распада клеток, однако не сопровождается соответствующим усилением синтеза эритроцитарных белков и пролонгированной сборкой цитоскелета, в результате чего вновь образованные эритроциты оказываются неполноценными и характеризуются низкой деформируемостью, дефицитом АТФ, Γ -6-ФДГ, каталазы и CD55-молекул. Последнее становится причиной гиперактивации системы комплемента (преимущественно по альтернативному пути) уже в дооперационном периоде, что, несмотря на умеренно повышенное ХС/ФЛ-соотношение в мембране, приводит к увеличению ее проницаемости уже до операции. 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 нормальным (на фоне активации эритропоэза) их содержанием в крови (рис.7).

Во время операции у кардиохирургических больных с выраженным постперфузионным гемолизом по причине исходно низкой экспрессии CD55 на эритроцитах активация системы комплемента при ИК потенцируется, но ввиду предсуществующего дефицита факторов альтернативного пути активации комплемента оказывается на уровне таковой в другой группе пациентов (рис. 7). При этом на первый план в патогенезе выраженного гемолиза выступает интраоперационная активация ПОЛ в эритроцитах, в которых при ятрогенной гипероксемии усугубляется недостаточность Γ -6-ФДГ и каталазы. Это способствует как непосредственной активации неспецифических катионных каналов в мембране эритроцитов, так и простагландин- E_2 -опосредованной их индукции в результате деятельности фосфолипазы A_2 , осуществляющей деградацию ФХ с образованием лФХ. Последнее обстоятельство, как и избыток внутриклеточного Ca^{2+} , усиливает исходно нормальную (из-за ретикулоцитоза) активность Ca^{2+} -АТФазы, которая быстро активируется и элиминирует Ca^{2+} из клетки, способствуя преждевременному закрыванию $K^+(Ca^{2+})$ -каналов. При этом ингибирующее влияние EPO на уровень внутриклеточного Ca^{2+} практически отсутствует вследствие слабовыраженного увеличения содержания цитокина в крови после операции. В результате объем клетки уменьшается незначительно, что отягощается ингибированием Na^+/K^+ -АТФазы в присутствии исходно низкого количества АТФ в клетке. Неблагоприятное действие на регуляцию клеточного

объема в этом периоде 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 (рис. 7).

Таким образом, настоящее исследование подтверждает важную роль исходных нарушений периферического звена эритрона в патогенезе гемолиза при искусственном кровообращении. При этом неэффективная регенерация красного ростка на фоне атеросклероза с формированием неполноценных клеток красной крови вызвана дисрегуляцией эритропоэза, сформированной еще до хирургического вмешательства и зависящей от характера сопутствующей патологии, спектра применяемых препаратов, и, возможно, генетически детерминированных особенностей больных ИБС (Резус- и АВ0-фенотипа эритроцитов). Дооперационная оценка структурно-метаболических свойств эритроцитов, позволяет не только предвидеть развитие выраженной постперфузионной гемоглобинемии, но и задает направления для таргетной терапии и первичной профилактики постперфузионных гемолитических расстройств.

ВЫВОДЫ

1. Степень выраженности внутрисосудистого гемолиза у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) после коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения варьирует: у 65% пациентов развивается умеренный, у 35% – выраженный гемолиз (при равнозначном дефиците гаптоглобина в плазме крови). Активность эритродиереза до операции выше у пациентов с выраженной постперфузионной гемоглобинемией и сочетается с гипергаптоглобинемией.
2. Усиление эритропоэтической функции костного мозга до операции у больных ИБС с умеренным гемолизом реализуется при избыточном содержании эритропоэтина и фактора некроза опухолей α (TNF- α) в крови, в отличие от пациентов с выраженной гемоглобинемией, у которых активация эритропоэза сочетается с нормальной концентрацией цитокинов в крови. После завершения искусственного кровообращения ретикулоцитоз, концентрация эритропоэтина и TNF- α в крови нарастают, при этом содержание эритропоэтина повышается в большей степени у больных с умеренным, чем с выраженным гемолизом.
3. Повышенная агрегируемость эритроцитов до и после операции у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом сочетается с гиперфибриногенемией до операции, сопряженной с уровнем гемоглобинемии после перфузии, и нормальной численностью гликофорин A⁺ и B⁺ эритроцитов

в крови на обоих этапах исследования. При развитии умеренного гемолиза агрегируемость эритроцитов и концентрация фибриногена в крови до и после операции сохраняются в пределах нормы, в то время как исходно пониженное содержание гликофорин А⁺ и В⁺ клеток восстанавливается после перфузии.

4. Формирование выраженного гемолиза после искусственного кровообращения ассоциировано с низкой деформируемостью эритроцитов в периоперационном периоде и интраоперационным снижением их механической резистентности при потенцировании увеличения холестерол/фосфолипидного соотношения в мембране клеток после операции. При развитии умеренного постперфузионного гемолиза снижение механической резистентности эритроцитов определяется уже до операции в сочетании с накоплением холестерина в мембране клеток при отрицательной его динамике после перфузии.
5. Пониженное содержание общих фосфолипидов в мембране эритроцитов у больных ИБС до и после операции независимо от степени выраженности постперфузионной гемоглобинемии определяется дефицитом фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина. Развитие выраженного гемолиза сопряжено с интраоперационным усугублением дефицита ФХ в мембране эритроцитов, истощением фракции фосфатидилинозитола (ФИ) и накоплением лизофосфатидилхолина (лФХ) в отличие от умеренной гемоглобинемии, формирующейся на фоне нормализации предсуществующего дефицита ФИ при сохранении профицита лФХ в мембране эритроцитов после операции. При этом аккумуляция фосфатидной кислоты в мембране эритроцитов после перфузии определяется как при умеренном, так и выраженном гемолизе.
6. Избыток ТБК-активных продуктов (взаимодействуют с тиобарбитуровой кислотой) и диеновых конъюгатов в плазме крови при недостаточности ее общей антиокислительной активности у больных ИБС, усугубляющийся после искусственного кровообращения, не влияет на степень выраженности постперфузионного гемолиза.
7. Формирование выраженной гемоглобинемии коррелирует с накоплением ТБК-активных продуктов в эритроцитах во время операции вследствие предсуществующей низкой активности каталазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах, активность которых до и после перфузии при умеренном гемолизе сохраняется в пределах нормы. Повышенное содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах у больных ИБС до операции вне зависимости от выраженности постперфузионной гемоглобинемии сочетается с дефицитом диеновых конъюгатов и низкой активностью супероксиддисмутазы в клетках, сохраняющимися после

искусственного кровообращения.

8. Развитие гемолиза различной степени выраженности у больных ИБС после перфузии сочетается с низкой активностью Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы (АТФазы) мембраны эритроцитов, которая при умеренной гемоглобинемии определяется предсуществующей недостаточностью фермента в условиях нормального содержания АТФ в клетках, а при выраженной гемоглобинемии – интраоперационной депрессией активности энзима на фоне исходного (до операции) дефицита АТФ, сохраняющегося после перфузии.
9. До и после операции у больных ИБС с умеренной гемоглобинемией медленное закрывание Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов при Ca^{2+} -индуцированном гиперполяризационном ответе эритроцитов сочетается с нормальным временем их открытого состояния, которое во время операции у больных ИБС с выраженной гемоглобинемией сокращается при сохранении нормальной скорости закрывания $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов. Кинетика открывания $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов эритроцитов у больных ИБС до и после операции соответствует норме вне зависимости от выраженности гемолиза.
10. Поддержание нормального объема эритроцита до операции у больных ИБС с умеренной гемоглобинемией осуществляется на фоне нормальной проницаемости мембраны клеток (для низкомолекулярных гидрофильных веществ) и после перфузии резко сокращается при ее увеличении. Развитию выраженного гемолиза предшествует высокая проницаемость мембраны эритроцитов, которая не влияет на объем клетки и сохраняется в послеоперационном периоде при незначительном уменьшении объема эритроцита.
11. Усиленная генерация терминального комплекса комплемента (ТКК) в крови до операции у больных ИБС с умеренным гемолизом сопряжена с гиперпродукцией факторов классического пути комплемента, у пациентов с выраженной гемоглобинемией – с недостаточностью альтернативного пути на фоне периоперационного дефицита CD55^+ эритроцитов в крови. Вне зависимости от выраженности гемолиза проведение искусственного кровообращения потенцирует избыток ТКК в крови при истощении факторов альтернативного пути, что у больных с умеренным гемолизом прямо пропорционально уровню гемоглобинемии и сочетается с нормализацией активности классического пути комплемента. Количество CD35^+ эритроцитов в крови и активность лектинового пути комплемента соответствуют норме до и после операции и не влияют на выраженность гемолиза.
12. Развитие выраженного постперфузионного гемолиза у больных ИБС ассоциировано с заболеваниями легких и отсутствием С-антигена системы Резус на эритроцитах. Формирование умеренной гемоглобинемии сочетается с

дооперационной патологией почек и отсутствием на эритроцитах В-антигена системы АВ0. Характер сопутствующей патологии, Резус-фенотип эритроцитов, содержание эритроцитов и фибриногена в крови составляют систему дооперационного прогноза развития выраженной гемоглобинемии, уровень которой предопределяется параметрами Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов, содержанием эритропоэтина и TNF- α в крови.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Взаимосвязь цитокинов и факторов бактерицидности нейтрофилов у кардиохирургических больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения / В.В. Новицкий, **С.П. Чумакова**, В.М. Шипулин, О.И. Уразова, Т.В. Перевозчикова, Т.Е. Сулова, Т.В. Емельянова // **Вестник РАМН**. – 2006. – №6. – С. 13-18.
2. Возрастная характеристика популяции эритроцитов периферической крови как прогностический критерий гемолиза после кардиохирургических операций / И.В. Мальцева, **С.П. Чумакова**, С.А. Никищенко, О.И. Уразова, В.М. Шипулин // Бюллетень Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. – 2010. – №2. – С. 250 (Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Высокотехнологичные методы диагностики и лечения заболеваний сердца, крови и эндокринных органов», г. Санкт-Петербург, 2010).
3. Информативность критериев оценки свободнорадикального окисления в крови у кардиохирургических больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения / **С.П. Чумакова**, И.В. Мальцева, А.Ю. Вагина, О.И. Уразова, В.М. Шипулин // Бюллетень Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. – 2010. – №2. – С. 132. (Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Высокотехнологичные методы диагностики и лечения заболеваний сердца, крови и эндокринных органов», г. Санкт-Петербург, 2010).
4. Целесообразность определения показателей перекисного окисления липидов при операциях в условиях искусственного кровообращения / **С.П. Чумакова**, А.Ю. Вагина, И.В. Мальцева, О.И. Уразова // Сборник статей по материалам XI конгресса молодых ученых и специалистов, 28-29 мая 2010 г. (Томск) / Под редакцией Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ, 2010. – С. 32-33.
5. Влияние структуры эритроцитарных мембран на выраженность интраоперационного гемолиза при искусственном кровообращении / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.М. Шипулин, А.Ю. Вагина // Материалы III Всероссийской научно-практической конференции «Многопрофильная больница: проблемы и решения». – Ленинск-Кузнецкий, 2010. – С. 248-249.
6. Патогенетические факторы интраоперационного гемолиза в кардиохирургии / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин // **Патологическая физиология и экспериментальная терапия**. – 2011. – № 4. – С.22-28.
7. Прогностическое значение дооперационного определения деформируемости эритроцитов в оценке риска развития постперфузионного гемолиза / **С.П. Чумакова**, И.В. Мальцева, О.И. Уразова, В.М. Шипулин // Материалы V Всероссийской конференции по клинической гемостазиологии и гемореологии в сердечно-

- сосудистой хирургии (с международным участием). – Москва, 2011. – С. 596.
8. Влияние агрегации эритроцитов на выраженность интраоперационного гемолиза при операциях с искусственным кровообращением / И.В. Мальцева, **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.М. Шипулин // Материалы V Всероссийской конференции с международным участием «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии». – Москва, 2011. – С. 342.
 9. Структурные особенности мембраны эритроцитов при постперфузионном гемолизе различной степени выраженности / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.М. Шипулин, В.В. Новицкий, И.В. Мальцева, А.Ю. Вагина, С.А. Никищенко // **Вестник уральской медицинской академической науки**. – 2011. – Т. 33, №1. – С. 73-76.
 10. Цитологические критерии прогноза гиповентиляционных осложнений у кардиохирургических больных после операций на остановленном сердце / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин, Т.В. Емельянова, О.А. Хохлов, О.В. Юрлова // **Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия**. – 2011. – №6. – С. 64-67.
 11. Состояние путей активации системы комплемента у кардиохирургических больных с различной степенью выраженности интраоперационного гемолиза / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин, О.А. Хохлов, О.Л. Терещенкова // Успехи современного естествознания. – 2011. – №10. – С. 51-52. (Материалы IV международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине», 22-25 сентября 2011 г., г. Сочи).
 12. Детерминирующая роль резус-фенотипа эритроцитов в реализации гемолитической стойкости клеток красной крови при операциях с искусственным кровообращением / О.А. Хохлов, **С.П. Чумакова**, И.В. Мальцева, О.В. Юрлова // Сборник статей по материалам XII конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», 28-29 мая 2011 г. (Томск) / Под редакцией Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ, 2011. – С. 41-42.
 13. Механическая резистентность эритроцитов у кардиохирургических больных при умеренном и выраженном постперфузионном гемолизе / И.В. Мальцева, **С.П. Чумакова**, О.А. Хохлов // Сборник статей по материалам XII конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке», 28-29 мая 2011 г. (Томск) / Под редакцией Л.М. Огородовой, Л.В. Капилевича. – Томск: СибГМУ, 2011. – С. 66-67.
 14. Роль аденозинтрифосфата эритроцитов в развитии постперфузионного гемолиза и его влияние на тяжесть анемии после кардиохирургических операций / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин, О.А. Хохлов, О.В. Юрлова // Сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции «Диагностика и лечение анемий в XXI веке», г. Рязань, 2011. – С. 30-31.
 15. Влияние АВ0-фенотипа эритроцитов на выраженность гемолиза и степень тяжести анемии у больных после операций с искусственным кровообращением / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.А. Хохлов, И.В. Мальцева // Патогенез. – 2011. – Т. 9, №3. – С. 70. (Материалы VI Российской конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция», 11–13 октября 2011 г., г. Москва).
 16. Современные подходы к прогнозированию и коррекции интраоперационного гемолиза в кардиохирургии / **С.П. Чумакова**, В.М. Шипулин, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, Т.В. Емельянова // **Вестник хирургии им. И.И. Грекова**. – Т. 171, №2. – С. 101-104.
 17. Влияние механической резистентности эритроцитов на выраженность гемолиза после

- операций с искусственным кровообращением / **С.П. Чумакова**, В.М. Шипулин, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, С.Э. Бармина, И.В. Мальцева, И.В. Пономаренко, Э.В. Сапрыкина // **Патология кровообращения и кардиохирургия**. – 2012. – №1. – С. 65-71.
18. Влияние агрегации эритроцитов на выраженность внутрисосудистого гемолиза при операциях в условиях искусственного кровообращения / И.В. Мальцева, **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин, О.А. Хохлов, С.Е. Одинцова, М.В. Корчагина // **Гематология и трансфузиология**. – 2011. – №6. – С. 28-32.
19. Связь АВ0- и резус-фенотипов эритроцитов с выраженностью интраоперационного гемолиза у кардиохирургических больных / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин, О.А. Хохлов, И.В. Мальцева, Т.В. Емельянова // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2013. – №1. – С. 40-42.
20. Факторы внутрисосудистого гемолиза у кардиохирургических больных после операций с искусственным кровообращением / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин, И.В. Мальцева, О.А. Хохлов, Т.В. Емельянова // **Вестник РАМН**. – 2012. – №7. – С. 15-19.
21. Механизмы регуляции объема эритроцитов у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом после операций на остановленном сердце / **С.П. Чумакова**, В.В. Новицкий, О.И. Уразова, И.В. Петрова, В.М. Шипулин, Э.В. Сапрыкина, О.А. Хохлов // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2012. – №6. – С. 106-109.
22. Показатели эритропоэза у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин, И.В. Мальцева, О.А. Хохлов, Ю.В. Колобовникова // **Гематология и трансфузиология**. – 2012. – №3 (Приложение). – С. 43. (Материалы Конгресса гематологов России 2-4 июля 2012 г., Москва).
23. Антиоксидантный потенциал эритроцитов и плазмы крови у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным гемолизом после операций с искусственным кровообращением / **С.П. Чумакова**, В.М. Шипулин, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, З.К. Амришева, И.В. Мальцева, Т.В. Емельянова, Э.В. Сапрыкина // **Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия**. – 2012. – Т. 5, №6. – С. 95-99.
24. Фенотипические особенности эритроцитов и активность эритропоэза у кардиохирургических больных с различной степенью выраженности постперфузионного гемолиза / В.В. Новицкий, **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.М. Шипулин, О.А. Хохлов, Ю.В. Колобовникова // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2012. – №6. – С. 69-75.
25. Неравномерная оксигенация крови как причина развития выраженного постперфузионного гемолиза у кардиохирургических больных после операций коронарного шунтирования / **С.П. Чумакова**, В.М. Шипулин, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, И.В. Мальцева, О.А. Хохлов // **Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева**. – 2012. – Т.13, №6 (Приложение). – С. 197. (Материалы XVIII Всероссийского съезда сердечно-сосудистых хирургов, 25-28 ноября 2012 г., Москва).
26. Роль эритропоэтина и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы эритроцитов в развитии постперфузионного гемолиза различной степени выраженности / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин, И.В. Мальцева, О.А. Хохлов // **Современные наукоемкие технологии**. – 2012. – №8. – С. 38-39 (Материалы V международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине», 27 сентября – 1 октября 2012 г., г. Сочи).

27. Коррекция энергетического метаболизма эритроцитов может снизить выраженность постперфузионного гемолиза и степень тяжести анемии после операций на остановленном сердце / **С.П. Чумакова**, В.М. Шипулин, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, О.А. Хохлов, О.Ю. Юрлова // Сборник научных трудов по материалам Всероссийской конференции хирургов, посвященной 10-летию медицинского центра им. Р.П. Аскерханова, 12-13 октября 2012 (г. Махачкала) – Махачкала: ДагПресМедиа. – 2012. – С. 128-129.
28. Характеристика системы комплемента у больных ишемической болезнью сердца при умеренном и выраженном гемолизе после операций с искусственным кровообращением / **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин, О.А. Хохлов, Т.В. Емельянова, М.А. Михайлова // **Кардиология**. – 2013. – №2. – С. 4-9.
29. Деформируемость эритроцитов и особенности фосфолипидного спектра их мембраны у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом / **С.П. Чумакова** // **Фундаментальные исследования**. – 2013. – №2-1. – С. 205-210.
30. Характеристика деформируемости эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным гемолизом после операций в условиях искусственного кровообращения / Ю.А. Попов, **С.П. Чумакова**, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин // Материалы XIX Межгородской конференции молодых ученых «Актуальные проблемы патофизиологии» / под ред. Т.Д. Власова, В.И. Николаева. – СПб.: Изд-во СПбГМУ, 2013. – С. 102-103.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат	CD – cluster of differentiation
АТФаза – аденозинтрифосфатаза	EPO – erythropoietin
АФК – активные формы кислорода	IL – interleukin
Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	TNF – tumor necrosis factor
ГПО – гиперполяризационный ответ	
ИБС – ишемическая болезнь сердца	
ИК – искусственное кровообращение	
(л)ФХ – (лизо)фосфатидилхолин	
ПОЛ – перекисное окисление липидов	
СОД – супероксиддисмутаза	
ТБК – тиобарбитуровая кислота	
ТКК – терминальный комплекс комплемента	
ФИ – фосфатидилинозитол	
ФЛ – фосфолипиды	
ФЭА – фосфатидилэтаноламин	
ХС – холестерол	