

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

На правах рукописи

Чумакова Светлана Петровна

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

Специальность:

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научные консультанты:

д-р мед. наук, профессор
О.И. Уразова

Заслуженный деятель науки РФ,
д-р мед. наук, профессор
В.М. Шипулин

Томск-2013

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	8
ВВЕДЕНИЕ.....	10
Глава 1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	21
1.1. Структурно-функциональные особенности эритроцитов	21
1.2. Механизмы гибели эритроцитов в норме и при патологии.....	25
1.2.1. Причины патологического усиления внутриклеточного гемолиза.....	27
1.2.2. Активация процессов внутрисосудистого гемолиза при патологии	31
1.3. Патогенетические факторы внутрисосудистого гемолиза при операциях с искусственным кровообращением.....	34
1.3.1. Механическая травма эритроцитов при операциях с искусственным кровообращением	35
1.3.2. Влияние искусственного кровообращения на реологические характеристики эритроцитов	37
1.3.3. Интраоперационное изменение структурно-метаболических свойств эритроцитов как причина модуляции их деформируемости	40
1.3.4. Роль механизмов свободнорадикального окисления в деструкции эритроцитов при искусственном кровообращении	42
1.3.5. Активация системы комплемента при операциях с искусственным кровообращением и ее роль в гемолитических реакциях	46
1.4. Патогенез органной дисфункции у кардиохирургических больных при массивном интраоперационном гемолизе.....	48
1.5. Современные подходы к прогнозированию и коррекции интраоперационного гемолиза в кардиохирургии.....	52
1.5.1. Унифицированный подход в дооперационной профилактике внутрисосудистого гемолиза путем подбора перфузиологического оборудования.....	53
1.5.2. Индивидуальный подход к терапии сформировавшейся гемоглобинемии после операций с искусственным кровообращением.....	56
1.5.3. Современные проблемы коррекции постперфузионной гемоглобинемии	59
1.6. Общие сведения об ишемической болезни сердца и методах ее лечения...	61

1.6.1. Современный взгляд на этиологию и патогенез атеросклероза	62
1.6.2. Основные принципы хирургического лечения ишемической болезни сердца.....	66
1.6.3. Состояние периферического звена эритрона, предшествующее хирургической реваскуляризации миокарда.....	71
Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	78
2.1. Объект исследования.....	78
2.1.1. Общая характеристика больных ишемической болезнью сердца и операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения.....	78
2.1.2. Краткая характеристика исследуемых групп больных ишемической болезнью сердца	81
2.3. Материал исследования.....	91
2.4. Методы исследования.....	91
2.4.1. Первичная пробоподготовка биоптатов периферической крови.....	91
2.4.2. Определение концентрации свободного гемоглобина в плазме крови бензидиновым методом.....	92
2.4.3. Вычисление нормализованного индекса гемолиза	93
2.4.4. Оценка содержания гаптоглобина в плазме крови.....	93
2.4.5. Определение Резус-фенотипа эритроцитов	94
2.4.6. Определение гематокрита, содержания эритроцитов в крови и их объема	94
2.4.7. Подсчет ретикулоцитов в суправитально окрашенных мазках периферической крови.....	94
2.4.8. Определение механической резистентности эритроцитов	95
2.4.9. Оценка деформируемости эритроцитов методом измерения начальной скорости фильтрации.....	96
2.4.10. Определение агрегационной способности эритроцитов	97
2.4.11. Оценка проницаемости мембраны эритроцитов для низкомолекулярных гидрофильных веществ методом мочевинового гемолиза..	98

2.4.12. Определение содержания ТБК-активных продуктов в эритроцитах и плазме крови.....	99
2.4.13. Определение содержания диеновых конъюгатов в эритроцитах и плазме крови.....	99
2.4.14. Определение общей антиокислительной активности в плазме крови....	100
2.4.15. Определение активности супероксиддисмутазы в эритроцитах	101
2.4.16. Определение активности каталазы в эритроцитах	102
2.4.17. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах.....	103
2.4.18. Определение концентрации гемоглобина в растворе гемиглобинцианидным методом	103
2.4.19. Метод выделения мембран эритроцитов	104
2.4.20. Определение белка микробиуретовым методом	105
2.4.21. Изучение липидного состава мембран эритроцитов.....	105
2.4.21.1. Получение липидного экстракта мембран эритроцитов.....	105
2.4.21.2. Определение содержания общего холестерина в липидном экстракте мембран эритроцитов.....	106
2.4.21.3. Определение общего содержания фосфолипидов в экстракте мембран эритроцитов	106
2.4.21.4. Изучение фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов.....	108
2.4.22. Определение активности Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов	108
2.4.23. Определение содержания аденозинтрифосфата в эритроцитах	109
2.4.24. Изучение параметров Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов	110
2.4.25. Определение поверхностных структур мембраны эритроцитов (CD35, CD55, гликофоринов А и В).....	112
2.4.26. Определение концентрации терминального комплекса комплемента, эритропоэтина и фактора некроза опухолей α в крови методом иммуноферментного анализа.....	113
2.4.27. Исследование функциональной активности системы комплемента в крови.....	115

2.5. Статистическая обработка результатов.....	117
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	119
3.1. Количественные показатели красной крови у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения	119
3.2. Показатели эритропоэза и эритродиереза у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	120
3.3. Агрегационная способность эритроцитов, содержание эритроцитов, экспрессирующих гликофорины А и В, и фибриногена в крови у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	122
3.4. Механическая резистентность и деформируемость эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения	124
3.5. Характеристика структурной организации липидной фазы мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	125
3.5.1. Общее содержание холестерина и фосфолипидов в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	125
3.5.2. Характеристика фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения	127
3.6. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и ее общая антиокислительная активность у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	130
3.7. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность ферментов в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	132
3.8. Параметры Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа клеток красной крови и средний объем эритроцитов у больных ишемической	

болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения	134
3.9. Активность Na^+/K^+ -АТФазы, проницаемость мембраны для низкомолекулярных гидрофильных веществ и содержание АТФ в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	135
3.10. Содержание эритроцитов, экспрессирующих молекулы-ингибиторы системы комплемента (CD35, CD55), и функциональная активность системы комплемента у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	137
3.11. Частота встречаемости антигенов и фенотипов системы АВ0 эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	139
3.12. Частота встречаемости антигенов и фенотипов системы Резус эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	140
3.13. Взаимосвязь количественных клинико-лабораторных показателей с выраженностью постперфузионной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	142
3.14. Разработка формулы множественной линейной регрессии, описывающей зависимость уровня постперфузионной гемоглобинемии от клинико-лабораторных показателей до операции у больных ишемической болезнью сердца.....	146
3.15. Результаты дисперсионного и кластерного анализа взаимосвязей постперфузионной гемоглобинемии и клинико-лабораторных показателей у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	149
3.16. Взаимосвязь качественных показателей клинического статуса больных ишемической болезнью сердца с выраженностью постперфузионной гемоглобинемии.....	155
3.17. Расчет отношения шансов развития выраженной и умеренной	

гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца после операции с искусственным кровообращением и разработка шкалы гемолитического риска перфузии для клинического использования.....	157
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	164
ВЫВОДЫ.....	276
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	280

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ЕРО – (erhytropoetein) эритропоэтин

HIF – (hypoxia inducible factor) гипоксия-индуцируемый фактор

IL – (interleukin) интерлейкин

IR – (rigidity index) индекс ригидности

NF-kB – (nuclear factor) нуклеарный фактор kB

NO – монооксид азота

NYHA – New York Heart Association Functional Classification

OR – (odds ratio) отношение шансов

TNF – (tumor necrosis factor) фактор некроза опухолей

TNF-R – (tumor necrosis factor receptor) рецептор для фактора некроза опухолей

АДФ – аденозиндифосфат

АОА – антиокислительная активность

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГЛЮТ – транспортер глюкозы

ГПО – гиперполяризационный ответ

ГРП – гемолитический риск перфузии

ГЭК – гидроксипропиленкрахмал

ДК – диеновые конъюгаты

ДФГ – дифосфоглицерат

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИК – искусственное кровообращение

КШ – коронарное шунтирование

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности

лФХ – лизофосфатидилхолин

МАК – мембраноатакующий комплекс

НАДН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотид

НАДФН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НИГ – нормализованный индекс гемолиза

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РЭС – ретикулоэндотелиальная система

СОД – супероксиддисмутаза

СРБ – С-реактивный белок

СРО – свободнорадикальное окисление

СФМ – сфингомиелин

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ФИ – фосфатидилинозитол

ФЛ – фосфолипиды

ФС – фосфатидилсерин

ФХ – фосфатидилхолин

ФЭА – фосфатидилэтаноламин

ХС – холестерол

ЧТКА – чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика

ВВЕДЕНИЕ

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 активирует свободнорадикальное окисление, систему комплемента и гемостаз [Короткина Р.Н. и соавт., 2005; Akila 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 и коллег [2001], отмечается в ходе каждой из более чем 1000 изученных ими 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 гемоглобинемии. 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 гемоглобинемии после операций в условиях ИК у больных с серповидно-клеточной анемией, талассемией, генетически детерминированным дефицитом глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах и пароксизмальной

ночной гемоглобинурией [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 гемоглобинемии.

В связи с изложенным представляется актуальным изучение роли предсуществующей патологии эритроцита в патогенезе постперфузионного гемолиза, что вместе с выявлением факторов риска выраженной гемоглобинемии 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 гликофоринов 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 (супероксиддисмутазы, каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) 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 $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -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 predisposing 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 возможности 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 предсуществующей 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), 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, некорригируемые 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 A^+ и B^+ 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⁺(Ca²⁺)-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⁺(Ca²⁺)-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- α) 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 №1 (в тематический раздел «Сердечно-сосудистая хирургия»), 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 клинико-лабораторные методы исследования; получены, проанализированы и интерпретированы эмпирические данные; подготовлены к публикации статьи и тезисы по теме диссертации.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структурно-функциональные особенности эритроцитов

Согласно классическим представлениям эритроциты являются безъядерными клетками крови, имеющими форму двояковогнутого диска, 98% белка которых приходится на гемоглобин, определяющий кислородотранспортную функцию этих форменных элементов крови. В силу структурных и метаболических особенностей эритроциты не способны к синтезу белков и липидов, окислительному фосфорилированию и поддержанию реакций цикла трикарбоновых кислот [Шифман Ф.Д., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Bhattacharya A., 2011]. Редукция данных обменных процессов и механизмов трансляции генетического материала в зрелых клетках эритроидного ряда позволила длительное время рассматривать эритроциты как клетки с ограниченными возможностями и изучать их лишь в качестве моделей клеточной мембраны [Rychlik B. et al., 2000; Кравец Е.Б. и соавт., 2010; Ghashghaeinia M. et al., 2012]. Между тем, эритроциты имеют много необычных особенностей.

Образование клеток красной крови происходит в красном костном мозге в результате энуклеации эритрокариоцитов, которая представляет собой аномальное клеточное деление оксифильного нормобласта с формированием разделительной пластинки между эксцентрично расположенным ядром и цитоплазмой. Дальнейшее сокращение нитей актина цитоскелета опосредует появление перетяжки, разделяющей клетку на ретикулоцит и «пиреноцит» – ядро, окруженное мембраной и тонким кольцом цитоплазмы, которое далее фагоцитируется костномозговыми макрофагами [Keerthivasan G. et al., 2011]. В течение 30-40 ч ретикулоциты созревают в костном мозге, избавляясь от ненужных компартментов (рибосом, митохондрий, эндоплазматического ретикулума) путем образования цитоплазматических везикул, которые сливаются с органеллами и подвергаются либо экзоцитозу, либо аутофагии при взаимодействии с лизосомами [Воробьев А.И., 2005; Ney P.A., 2011]. Достигая определенной степени зрелости, ретикулоциты приобретают свойство деформируемости и покидают костный мозг, проникая в кровь не между эндотелиоцитами костномозговых синусов, а через цилиндрические поры в цитоплазме этих клеток (диаметр пор не более 4 мкм) [Юшков Б.Г. и соавт., 2004; Liu J.J. et al., 2010].

В периферической крови эритроциты составляют основную часть ее форменных элементов, влияя тем самым на реологические свойства этой неньютоновской жидкости [Левтов В.А. и соавт., 1982; Ройтман Е.В., 2001]. Двигаясь по магистральным сосудам, эритроциты участвуют не только в поступательном, но и во вращательном движении (вокруг своей оси), благодаря чему они фильтруют и осаждают на своей поверхности и внутри себя компоненты плазмы крови. При этом максимально удаленные от оси вращения области эритроцита (торообразующие) наиболее уязвимы к повреждениям, в том числе иммунными комплексами [Кидалов В.Н. и соавт., 2002; Погорелов В.М. и соавт., 2008]. Кроме того, недавно установлено, что эритроциты подвергаются сепарации на уровне дуги аорты: наиболее молодые и полноценные клетки «отправляются» в головной мозг, а старые и дегенеративные – на периферию [Коваль Г.С. и соавт., 2008].

Проходя через различные участки кровеносного русла, эритроциты модулируют свои вязкостно-эластические свойства путем изменения степени сродства между белками цитоскелета, что регулируется уровнем фосфорилирования последних и внутриклеточным содержанием кальция [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Bhattacharya A., 2011]. Между тем, мембрана эритроцитов слабо проницаема для катионов, поскольку в ней отсутствуют Na^+ -каналы [Санников А.Г., 1999; Морозова В.Т. и соавт., 2007], а K^+ -каналы открываются только при увеличении концентрации внутриклеточного кальция [Орлов С.Н. и соавт., 1992; Föller M et al., 2008; Петрова И.В. и соавт., 2011]. В настоящее время показано, что поступление кальция в эритроциты происходит через неспецифические ионные каналы, хотя не исключается наличие в клетках рецептор-управляемых, механочувствительных и потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа (поскольку они блокируются производными дигидропиридина) [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Санников А.Г., 1999; Lang K.S. et al., 2005].

В норме эритроцит испытывает транзиторное повышение мембранной проницаемости для катионов при сдвиговой деформации («деформационный стресс») в магистральных сосудах, когда ионы Na^+ и Ca^{2+} поступают через участки пониженной плотности упаковки молекул липидного бислоя при его кренировании. Увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} опосредует

тесное взаимодействие белков цитоскелета, придающих прочность (стабильность) мембране и дисковидную форму клетке. По мере продвижения клеток по сосудистому руслу в эритроцитах за счет функционирования Na^+/K^+ - и Ca^{2+} -аденозотрифосфатаз (АТФаз) снижаются интрацеллюлярные концентрации Na^+ и Ca^{2+} , что сопровождается фосфорилированием белков цитоскелета, опосредующим снижением сродства таковых друг к другу и жесткости клетки в целом. Последнее обеспечивает проявление свойства деформируемости эритроцитов в микроциркуляторном русле [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Bhattacharya A., 2011]. Интересно, что *in vivo* при определенных условиях работа Na^+/K^+ -АТФазы может обращаться в Na^+/H^+ -АТФазу, транспортирующую соответствующие ионы по градиенту концентрации с образованием короткоживущих молекул АТФ, которые имеют сигнал-индуцирующее значение [Васильева Е.М., 2005].

Показано, что АТФ в эритроцитах находится в составе двух пулов – цитозольного и мембраносвязанного [Васильева Е.М., 2005; Кузник Б.И., 2010; Chu H. et al., 2012], и образуется исключительно анаэробным путем, потребляющим 90% поступающей глюкозы [Castagnola M. et al., 2010]. Не утилизируя кислород, эритроциты контактируют с его максимальными концентрациями в организме, поэтому обладают мощной системой антиоксидантной защиты, основными компонентами которой являются супероксиддисмутаза (СОД), каталаза и система глутатиона. В свою очередь, восстановление последнего осуществляется за счет окисления восстановленного никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН), который является продуктом пентозофосфатного шунта, потребляющего оставшиеся 10% глюкозы [Новицкий В.В. и соавт., 2004].

Удивительным является тот факт, что помимо ферментов и гемоглобина в зрелых клетках эритроидного ряда обнаружен нуклеарный фактор kB (NF- kB), фармакологическая блокада которого *in vitro* приводит к уменьшению количества восстановленного глутатиона в клетках, экспонированию фосфатидилсерина на внешней поверхности мембраны и гибели эритроцитов [Ghashghaeinia M. et al., 2012]. Кроме того, показано наличие цитокиновых рецепторов на мембране эритроцитов, в частности, рецепторов к интерлейкину (IL) 8, которые, как предполагается, служат эквивалентом растворимых рецепторов, акцептируя

избыток данного цитокина [Tziakas D.N. et al., 2008]. Наряду с этим, эритрокариоциты человека способны продуцировать в культуральную среду IL-1 β , -2, -4, -6, -10, фактор некроза опухолей α (TNF- α), тканевый фактор роста β 1, интерферон- γ [Козлов В.А., Сенников С.В., 2004].

Экспериментально доказано наличие на мембране зрелых клеток красной крови рецепторов к инсулину, эндотелину, фибриногену, гистамину, тромбоксану A₂, простаглицлину, церулоплазмину, α ₂-макроглобулину, эритропоэтину, а также α - и β -адренорецепторов [Сторожок С.А и соавт., 1997; Lang K.S. et al., 2005; Кузник Б.И., 2010]. Их роль в клетке еще до конца не изучена. В частности, поступление глюкозы в эритроциты не зависит от инсулина и происходит путем облегченной диффузии с помощью белка-переносчика ГЛЮТ-1 [Gould G.W., Holman G.D., 1993], а ингибирование гипоосмотического лизиса эритроцитов под влиянием катехоламинов имеет, видимо, иные пути реализации эффекта, чем в ядросодержащих клетках, поскольку в филогенезе эритроциты человека утратили систему «G-белок – аденилатциклаза» [Стрюк Р.И., Длусская И.Г., 2004].

Кроме того, эритроциты способны вступать в межклеточные контакты с тромбоцитами, лейкоцитами и эндотелием, что опосредуется молекулами межклеточной адгезии четвертого типа (CD242), экспонированными на эритроцитарной мембране [Hernand P. et al., 2000; Кузник Б.И., 2010]. В числе большого количества мембранных гликопротеинов, несущих антигенные детерминанты групп крови, есть и функциональные молекулы, определяющие, например, электростатические взаимодействия эритроцитов с другими объектами (гликофорины А, В, С, D) и степень активации системы комплемента (молекулы CD35, CD55, CD59) [Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., 2001; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Ney P.A., 2011].

По современным данным, эритроциты являются важными участниками коагуляционного и сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, являясь источниками фосфолипидных матриц, антигепаринового фактора, аденозиндифосфата (АДФ), NO, и модулируют ретракцию кровяного сгустка. В эритроцитах содержатся фибринакцелератор (возможно, гликофорин), фибринстабилизирующий фактор и естественные антикоагулянты (сорбированы из плазмы и депонированы), активаторы и ингибиторы фибринолиза. Кроме того, клетки красной крови, как

известно, транспортируют аминокислоты, белки, углеводы, ферменты, липиды, иммунные комплексы, продукты обмена, гормоны и другие биологически активные вещества, регулируют рН крови и участвуют в водно-солевом обмене [Резван С. Г. и соавт., 2000; Воробьев А.И., 2005; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Кузник Б.И., 2010].

Таким образом, роль эритроцитов в организме не ограничивается газотранспортной функцией, их свойства многообразны, а клеточная и молекулярная организация гораздо сложнее, чем кажется на первый взгляд. Выполняя жизненно важные задачи, клетки красной крови совершают кругооборот по организму более миллиона раз, проходя много сотен километров. За это время эритроциты подвергаются механическому повреждению, в них происходят метаболические изменения, которые через 90-120 суток после образования клеток приводят к их естественной гибели [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Воробьев А.И., 2005; Mandal D. et al., 2005; Морозова В.Т. и соавт., 2007].

1.2. Механизмы гибели эритроцитов в норме и при патологии

В норме у человека за 1 с разрушается 5 млн эритроцитов, за сутки – более 360 млрд. При этом физиологический эритродиализ на 80-90% обусловлен внутриклеточным гемолизом и лишь на 10-20% – внутрисосудистым [Воробьев А.И., 2005]. Гемолизом (гематолизисом, эритроцитоллизом) (греч. *Haima* – кровь, *lysis* – распад, разрушение, растворение) называется разрушение эритроцитов с выходом гемоглобина в окружающую их среду. Внутриклеточный гемолиз представляет собой разрушение клетками-киллерами (макрофагами, гранулоцитами, натуральными киллерами) «маркированных» иммуноглобулинами класса G эритроцитов в селезенке, печени и костном мозге. Внутрисосудистый гемолиз – это коплементозависимый лизис «маркированных» иммуноглобулинами класса M (реже G) эритроцитов в кровотоке. Чрезмерное усиление гемолитических реакций на фоне патологии опосредует формирование гемолитической анемии и может происходить как по первому, так и по второму пути. При этом наследственные гемолитические анемии сопровождаются усилением преимущественно внутриклеточного пути эритродиализа, а приобретенные – чаще всего активацией внутрисосудистого механизма разрушения эритроцитов

[Воробьев А.И., 2005; Рязанцева Н.В. и соавт., 2008; Уразова О.И., Новицкий В.В., 2008].

Патологический гемолиз происходит под влиянием различных факторов и, в зависимости от причин его вызывающих, выделяют следующие виды гемолиза: химический (возникает при действии лекарственных препаратов, различных кислот), механический (например, при соприкосновении эритроцитов с протезом клапана сердца, в аппарате искусственного кровообращения), физический (может быть обусловлен ионизирующей радиацией), биологический (развивается в результате воздействия ядов змей, насекомых), термический (при перепаде температур) [Уразова О.И., Новицкий В.В., 2008].

В основе гемолиза могут лежать иммунные процессы, в результате которых аллоиммунные или аутоиммунные антитела адсорбируются на эритроцитах, связываются с антигенами мембран эритроцитов и вызывают их разрушение. Механизм разрушения эритроцитов зависит от типа антител и антигенов мембраны эритроцитов, против которых они направлены. Так, полные холодовые агглютинины вызывают агглютинацию эритроцитов при пониженной температуре окружающей среды (оптимум $+4^{\circ}\text{C}$); неполные тепловые агглютинины (оптимум $+37^{\circ}\text{C}$) лишь нарушают проницаемость мембраны эритроцитов, что приводит к изменению формы и размеров клеток, и в дальнейшем – к уничтожению их макрофагами. Опсонины, сорбируясь на эритроцитах, облегчают их фагоцитоз клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС). Гемолизины присоединяют к эритроциту терминальный комплекс комплемента, который осуществляет лизис клеток красной крови в кровотоке [Рязанцева Н.В. и соавт., 2008; Уразова О.И., Новицкий В.В., 2008]. Большая часть поступившего в плазму свободного гемоглобина взаимодействует с гаптоглобином, препятствующим проникновению гемоглобина через гломерулярный фильтр, после чего данный комплекс поглощается тканевыми макрофагами с участием scavenger-рецепторов («рецепторов-мусорщиков») CD163 [Schaer C.A., et al., 2007; Levy A.P. et al., 2010]. Некоторое количество гемоглобина в плазме легко окисляется и в отсутствие воздействия ферментов распадается на гем и глобин. Гем связывается с гемопексином и транспортируется в печень [Воробьев А.И., 2005; Rother R.P. et al., 2005; Kato G.J., 2009; Tolosano E. et al., 2010].

Независимо от вида гемолиза метаболизм гема осуществляется в клетках РЭС и включает гидроксилирование α -метенового углерода, расщепление его под действием микросомальных гидроксилаз с освобождением окиси углерода и дальнейшим превращением в биливердин при участии гемоксигеназы [Воробьев А.И., 2005; Schaer C.A., et al., 2007; Vercaemst L., 2008; Vermeulen-Windsant I.C et al., 2011]. Биливердин восстанавливается в непрямой билирубин и поступает из РЭС в кровь для последующего метаболизма в печени. Поэтому характерными признаками любого гемолиза являются иктеричность кожи и слизистых вследствие гипербилирубинемии. При этом массивный внутриклеточный гемолиз чаще сочетается со сплено(гепато)мегалией, повышением содержания стеркобилиногена в кале и появлением уробилиногена в моче, в то время как внутрисосудистый – с увеличением концентрации свободного гемоглобина в плазме крови (гемоглобинемией), гемосидерина в моче (гемосидеринурией) или появлением гемоглобина в моче (гемоглобинурией) [Долгов В.В. и соавт., 2001; Воробьев А.И., 2005; Уразова О.И., Новицкий В.В., 2008].

1.2.1. Причины патологического усиления внутриклеточного гемолиза

Гиперактивация внутриклеточного эритроцитолита является следствием ускоренного старения эритроцитов, приводящего к изменению структурно-функциональных характеристик клетки и приобретению ею свойств, характерных для старых эритроцитов. Существует ряд гипотез, которые объясняют механизмы старения эритроцитов и их смерти: снижение активности ферментов эритроцитов, изменение баланса Ca^{2+} , углеводов мембраны и заряда эритроцитов, окислительная модификация структур клетки, появление антител к компонентам мембраны [Glader B., 2004]. Все эти факторы имеют место, однако истинный механизм старения эритроцитов еще до конца не изучен [Воробьев А.И., 2005]. В последние годы появились сведения о феномене запрограммированной гибели эритроцитов, которая отличается от апоптоза ядросодержащих клеток и поэтому называется эриптозом [Lang K.S. et al., 2005; Глушков В.С., Сторожок С.А., 2009].

Активация процессов эриптоза отмечается при дефиците эритропоэтина и была обнаружена у больных хронической почечной недостаточностью, требующей проведения гемодиализа, а также при сепсисе, малярии, серповидноклеточной

анемии, β -талассемии, дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), дефиците железа, гемолитико-уремическом синдроме и болезни Вильсона [Föller M. et al., 2008; Глушков В.С., Сторожок С.А., 2009]. Инициация эриптоза также возможна при деструкции рецепторов к эритропоэтину, экспрессированных на мембране зрелых клеток эритроидного ряда в небольших количествах. В норме взаимодействие рецептора с эритропоэтином поддерживает кальциевые каналы эритроцитарной мембраны в закрытом состоянии. Деградация этих рецепторов по мере старения эритроцитов (или по другим причинам) приводит к увеличению потока Ca^{2+} в их цитоплазму, который активирует фосфолипазу A_2 , Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы, Ca^{2+} -чувствительную скрэмблазу и повышает степень сродства белков цитоскелета друг к другу. В свою очередь скрэмблаза переносит молекулы фосфатидилсерина, локализованного в интактных эритроцитах на внутренней стороне мембраны, на внешний слой липидного бислоя, что является меткой для макрофагов, фагоцитирующих подобные клетки. Фосфолипаза A_2 инициирует деградацию мембранных фосфолипидов с образованием арахидоновой кислоты и фактора активации тромбоцитов. Открывание Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов приводит к выходу K^+ из клетки, а следовательно ионов Cl^- и молекул воды, что уменьшает объем эритроцита и повышает вязкость его интрацеллюлярного матрикса [Lang K.S. et al., 2005; Глушков В.С., Сторожок С.А., 2009]. Последнее вместе с тесным взаимодействием компонентов цитоскелета под влиянием Ca^{2+} и уменьшением эластичности мембраны эритроцитов из-за увеличения в ней соотношения «холестерол/фосфолипиды» снижает деформируемость эритроцитов [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Шилов А.М. и соавт., 2008; Lewalle A., Parker K.H., 2011; Akman T. et al., 2012].

Прогрессивное накопление Ca^{2+} в цитозоле стареющих эритроцитов является следствием дефицита АТФ и несостоятельности Ca^{2+} -АТФазы, что связано с угнетением активности ферментов гликолиза, пентозофосфатного пути и антиоксидантной защиты, а также с увеличением микровязкости клеточных мембран [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Bhattacharya A., 2011].

Известны случаи наследственно обусловленного дефицита ферментов гликолиза, среди которых наиболее частым является недостаточность пируваткиназы. Заболевание наследуется по аутосомно-рецессивному типу и

сочетается с макроцитозом эритроцитов и дефицитом калия в них [Воробьев А.И., 2005; Kato G.J., Taylor J.G., 2010]. Однако самой распространенной ферментопатией эритроцитов является сцепленный с полом наследственный дефицит Г-6-ФДГ, которым страдает до 2% мужского населения в России, до 25% в Азербайджане и Африке, до 62% в Израиле [Воробьев А.И., 2005] и более 400 млн человек в мире [Elyassi A.R., Rowshan H.H., 2009]. Фермент участвует в образовании восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФН), необходимой для восстановления глутатиона глутатионредуктазой, а его недостаточность обуславливает свободнорадикальное повреждение эритроцитов при употреблении окислителей с развитием гемолитического криза [Радченко В.Г., 2003; Elyassi A.R., Rowshan H.H., 2009].

В условиях физиологического старения эритроцитов окислительная модификация белковых структур клетки способствует деградации протеинов цитоскелета (фракции 4.1, 4.2, 6 и 7), а также агрегации белка полосы 3, который является анионным переносчиком и обеспечивает фиксацию цитоскелета в мембране эритроцитов [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Castagnola M. et al., 2010]. Врожденные аномалии цитоскелета эритроцитов описаны как наследственный сфероцитоз, обусловленный генетически детерминированным дефектом спектрина, анкирина, белка полос 3, 4.2, и как наследственный эллиптоцитоз, связанный с дефектом спектрина, анкирина или гликофорина С [Reinhardt D. et al., 2001; Воробьев А.И., 2005; An X., Mohandas N., 2008].

Изменение формы клеток красной крови также характерно для гемоглобинопатий, в основе которых лежит наследственно обусловленная качественная (серповидно-клеточная анемия) или количественная (талассемии) аномалия синтеза гемоглобина. Образование дрепаноцитов в первом случае и мишеневидных клеток во втором существенно снижает деформируемость таких эритроцитов [Радченко В.Г., 2003; Воробьев А.И., 2005].

При этом известно, что форма двояковогнутого диска является оптимальной для реализации деформируемости эритроцитов, поскольку обеспечивает максимальную поверхность клетки при заданном объеме и возможность изменения формы без изменения объема клетки [Ройтман Е.В., 2001; Шилов А. М. и соавт., 2008; Атауллаханов Ф.И. и соавт., 2009]. В ходе физиологического эритродиереза и

истощения ферментных систем геометрия клетки неизбежно меняется – снижается соотношение «поверхность/объем», т.е. происходит сферуляция эритроцитов [Морозова В.Т. и соавт., 2007; Шилов А.М. и соавт., 2008; Lewalle A., Parker K.H., 2011; Akman T. et al., 2012]. Одновременно имеет место уменьшение поверхности и объема клеток красной крови, что связано с удалением части поврежденной мембраны эритроцитов клетками РЭС или самими эритроцитами путем образования микровезикул [Шиффман Ф.Д., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Кузник Б.И., 2010]. Уменьшение объема стареющего эритроцита при неизменном содержании гемоглобина в клетке ведет к увеличению вязкости цитоплазмы, что вместе с нарастанием микровязкости мембраны, деградацией и увеличением сродства белков цитоскелета, а также утратой дисковидной формы клетки снижает ее деформируемость [Морозова В.Т. и соавт., 2007].

Между тем, способность эритроцитов к упругой деформации необходима для успешного прохождения через узкие фенистры «селезеночного фильтра», образованного ретикулярными клетками, ретикулярными волокнами, макрофагами, дендритными и эндотелиальными клетками. Задерживаясь в синусоидах селезенки, эритроциты пребывают в условиях умеренного закисления окружающего пространства, что служит дополнительным экстрацеллюлярным фактором, потенцирующим снижение их деформируемости, в результате чего они теряют способность проникать через выходные отверстия синусоидов [Воробьев А.И., 2005; Морозова В.Т. и соавт., 2007]. Ригидные эритроциты (стареющие и поврежденные) подвергаются эритрофагоцитозу или ремоделированию эндотелиальными клетками венозных синусов и селезеночными макрофагами. При гиперспленизме интенсивность внутриклеточного гемолиза нарастает даже в отсутствие первичной патологии эритроцитов, что обусловлено гиперплазией эндотелиальных и иммунных элементов селезенки вследствие инфекционных заболеваний и нарушений иммунитета, а также появлением в ней метастазов опухолей и очагов внекостномозгового кроветворения [Шиффман Ф.Д., 2001; Fens M.H. et al., 2010; Gottlieb Y. et al., 2012].

Примечательно, что клеточные элементы красной пульпы селезенки имеют уникальные антигенные характеристики и обладают подвижностью, что позволяет

им иммунологически тестировать и фагоцитировать аномальные, старые эритроциты, покрытые антителами или несущие собственные модифицированные детерминанты [Шиффман Ф.Д., 2001; Mandal D. et al., 2005]. Так, при естественном старении клеток красной крови происходит образование агрегатов белка полосы 3, которые становятся носителями неоантигенов и обуславливают образование и связывание с ними иммуноглобулинов класса G [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Govekar R.B. et al., 2012]. Данный процесс, как и микровезикуляция эритроцитов, усиливается при свободнорадикальном повреждении мембранных структур клетки [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Морозова В.Т. и соавт., 2007]. Иммунный механизм элиминации аномальных эритроцитов также активируется при гемобластозах, что связано с изменением антигенных свойств эритроцитов, образованных при опухолевой трансформации кроветворной ткани [Уразова О.И., Новицкий В.В., 2008].

Важно отметить, что даже в случае патологического усиления внутриклеточного гемолиза содержимое эритроцитов практически не поступает в плазму крови, аккумулируясь в клетках РЭС, где происходит катаболизм липидов и белков, включая глобиновую часть гемоглобина, по обычному для них пути, а гем метаболизируется с образованием железа, которое вновь используется организмом [Воробьев А.И., 2005; Gottlieb Y. et al., 2012]. Внутрисосудистый гемолиз, напротив, сопровождается поступлением в циркуляцию биологически активных компонентов цитоплазмы и мембраны эритроцитов, что оказывает системное действие на организм и требует включения более сложных механизмов утилизации продуктов деградации клеток красной крови [Kato G.J., Taylor J.G., 2010].

1.2.2. Активация процессов внутрисосудистого гемолиза при патологии

Еще в середине прошлого века было установлено, что в процессе внутрисосудистого гемолиза эритроциты проходят ряд стадий: прегемолитическая – сферуляция эритроцитов; осмотический гемоглобинолиз – распад и выход части гемоглобина в плазму, что связано с достижением эритроцитом критического объема (146% от первоначального) и увеличением размера пор в мембране более 6 нм; химический гемоглобинолиз – изменение химического состава (электрохимических и коллоидно-осмотических свойств) эритроцитов с полным

отщеплением гемоглобина; полное разрушение клеточной структуры [Гильдебрант Е., 1961; Атауллаханов Ф.И. и соавт., 2009]. При этом внутрисосудистая деструкция эритроцитов, по данным литературы, чаще всего обусловлена механическим повреждением, иммунными механизмами или паразитарной инвазией.

Первое сообщение о механическом гемолизе принадлежит R. Fleischer, который в 1881 г. описал у молодого солдата случай маршевой гемоглобинурии – появления гемоглобина в моче при длительной ходьбе/беге по твердой поверхности. Подобная аномалия встречается редко, однако в виду того, что никаких патологических изменений в эритроцитах на сегодняшний день обнаружить не удалось, принято считать, что данный феномен связан с необычным расположением сосудов стоп и близостью капиллярной сети к поверхности, где клетки крови подвергаются механическому воздействию [Воробьев А.И., 2005]. В настоящее время основной категорией лиц, подверженных механическому гемолизу, являются больные с протезированными сосудами или клапанами сердца, эритроциты которых находятся в условиях турбулентного потока при прохождении через небольшой (меньший, чем в норме) просвет искусственного клапана. Показано, что деструкция эритроцитов особенно велика, если завихрения потока крови локализованы в области ее контакта с чужеродной поверхностью протеза [Барбараш Л.С. и соавт., 1991; Erslev A.J., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Также механическая гемолитическая анемия отмечена при гемолитико-уремическом синдроме, злокачественной гипертензии, метастатическом раке, ангиосаркомах [Воробьев А.И., 2005].

В мировой литературе активно обсуждается проблема особенностей патогенеза гемолитической анемии при малярии и бабезиозе. Установлено, что при малярии помимо разрушения зараженных эритроцитов в момент выхода внутриклеточно расположенного малярийного плазмодия, погибают и неинфицированные клетки [Kai O.K. Roberts D.J., 2008]. Это связано с уменьшением деформируемости незараженных эритроцитов при малярии, сорбцией на их поверхности антител к паразиту и активацией эритроцитов, что активирует эритрофагоцитоз в РЭС, а дефицит молекул-ингибиторов комплемента (CD35 и CD55) на их мембране обуславливает активацию внутрисосудистого

гемолиза [Föller M et al., 2008; Kai O.K., Roberts D.J., 2008]. Кроме того, и малярия, и бабезиоз характеризуются появлением в мембране эритроцитов специфических каналов, увеличивающих проницаемость мембраны для органических и неорганических веществ [Alkhalil A. et al., 2007]. Персистируя в цитоплазме эритроцитов, возбудитель бабезиоза также способен вызывать их внутрисосудистое разрушение, инфицировать в течение 45 с новые клетки и приводить к органной дисфункции, что может стать причиной летального исхода (42% в Европе, 5% в США) [Mitrović S. et al., 2004; Hunfeld K.P. et al., 2008; Sun Y. et al., 2011].

В основе иммунных механизмов инициации внутрисосудистого гемолиза лежит перфорация клеточной мембраны эритроцитов мембраноатакующим комплексом комплемента, индуцирующая ионный дисбаланс клетки и ее осмотический лизис [Воробьев А.И., 2005; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007]. Между тем, активация системы комплемента возможна как по классическому пути с участием антител, так и в отсутствие таковых – по альтернативному и лектиновому механизмам [Ройт А. и соавт., 2000]. При этом антиэритроцитарные антитела появляются в крови в виду нескольких причин. Изоиммунные антитела попадают в организм человека «извне» и опосредуют посттрансфузионные гемолитические реакции при переливании крови, несовместимой по эритроцитарным антигенам. Гетероиммунные антитела нарабатываются на гаптены (химические вещества, вирусы), взаимодействующие с белками эритроцитов, аутоиммунные – на собственные не измененные антигены эритроцитов. Образование трансиммунных антител имеет значение только в неонатологии, поскольку они являются причиной внутрисосудистого гемолиза у плода вследствие поступления антител через плаценту от матери, больной аутоиммунной гемолитической анемией [Воробьев А.И., 2005; Уразова О.И., Новицкий В.В., 2008].

Кроме того, активация системы комплемента без участия антител возможна при повышенной чувствительности клеток красной крови к его литическому действию. Так, приобретенный дефицит гликозилфосфатидилинозитола, фиксирующего молекулы-ингибиторы системы комплемента CD55 и CD59 в мембране эритроцитов, определяет манифестацию пароксизмальной ночной

гемоглобинурии [Kelly R. et al., 2009]. Появление гемоглобина в моче отмечается в ночное время, когда развивается незначительный физиологический ацидоз, активирующий систему комплемента и комплемент-зависимый лизис эритроцитов [Воробьев А.И., 2005; Kim Y. et al., 2010]. Кроме того, дефицит CD55 имеет место при малярии и хронической почечной недостаточности, требующей проведения гемодиализной терапии [Ohi H. et al., 2003; Mahajan R.C. et al., 2011].

Таким образом, физиологический процесс разрушения эритроцитов достаточно динамичен и его патологическое усиление связано с действием ряда факторов, характерных для определенных заболеваний. Между тем, механизм интенсификации гемолиза значительно усложняется при сочетанном действии этих факторов, что имеет место во время экстракорпоральной перфузии.

1.3. Патогенетические факторы внутрисосудистого гемолиза при операциях с искусственным кровообращением

Изобретение аппарата искусственного кровообращения (ИК) в середине прошлого века совершило революционный прорыв в области торакальной хирургии. Главным преимуществом данной технологии до сих пор является уникальная возможность обездвиживать сердце различными способами, в том числе и путем перфузии сердечной мышцы гиперкалиевым гипокальциевым кардиоплегическим раствором, охлажденным до $+4-12^{\circ}\text{C}$ [Шаталов А.Е., Шнайдер Ю.А., 2004; Бокерия Л.А., Вольгушев В.Е., 2005]. При этом функцию жизнеобеспечения организма на период хирургических манипуляций берет на себя аппарат ИК, имеющий одноразовый физиологический и многоразовый механический блоки. К физиологической части принадлежат все детали, соприкасающиеся с кровью, главные из которых – оксигенатор и артериальный насос. Механический блок обеспечивает работу энергозатратных модулей (насосы, теплообменник) и служит каркасом для одноразовой перфузионной системы [Меньшугин И.Н., 1998; Никитин К.Б., 2003].

Однако внедрение экстракорпоральных технологий в медицину неизбежно сопряжено с комплексом патофизиологических реакций организма на экстремальное воздействие и серьезными нарушениями гомеостаза. Поэтому одним из первых и до сих пор нерешенных вопросов кардиохирургии остается

проблема травматизации форменных элементов крови в экстракорпоральном контуре с развитием внутрисосудистого гемолиза, выраженность которого традиционно используется в качестве индикатора перфузионной травмы клеток крови [Дементьева И.И. и соавт., 2008]. Так, по данным G. Wright [2001], в каждой из нескольких сотен изученных им операций автор отмечал гемоглобинемию, выраженность которой, по его данным, максимальна спустя 120 мин после начала ИК [Wright G., 2001], по другим – через 90 мин [Дементьева И.И. и соавт., 2008], по третьим – через 2 ч после окончания ИК и даже через 2 суток после хирургического вмешательства не достигает дооперационных значений [Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Последнее объясняется формированием сублетальных повреждений в эритроцитах во время ИК, которые заключаются в нарушениях структурно-метаболического статуса клеток и проявляются негативной модуляцией их реологических характеристик, что предопределяет разрушение до 15% таких эритроцитов через 24 ч после операции [Valeri R. et al., 2006; Vercaemst L., 2008].

Несомненно, проведение ИК оказывает сложное, многоплановое действие на организм пациента, а механизм развития постперфузионного гемолиза сочетает в себе комплекс патогенетических факторов.

1.3.1. Механическая травма эритроцитов при операциях с искусственным кровообращением

Еще в 1969 г. E. Peirce определил причины гемолиза, обусловленные техническими особенностями аппаратов ИК, – это механическое воздействие насоса; силы поверхностного натяжения в пузырьковых оксигенаторах; силы сдвига вследствие резких изменений площади поперечного сечения канюль и трубок; струйные силы, возникающие при высокой скорости движения клеток крови [Дементьева И.И. и соавт., 2008]. Позже J. Mulholland и его коллеги (2000) перечислили основные динамические силы, приводящие к травме клеток крови: положительное и отрицательное давление, напряжение сдвига, силы гидродинамического удара, а также неэндотелизованная поверхность экстракорпорального контура, интерфаза «кровь – газ».

Силы, возникающие во время ИК, большей частью перпендикулярны, поэтому они относительно хорошо переносятся клетками крови. Однако форменные элементы крови особенно восприимчивы к воздействию напряжения сдвига, которое является тангенциальной силой [Hansbro S.D. et al., 1999]. Способность эритроцитов сохранять свою целостность в условиях экстремальной сдвиговой деформации зависит от стабильности их мембраны, которая определяется состоянием белкового цитоскелета и структурой липидного матрикса цитолеммы. Насыщенные жирные кислоты оказывают большее сопротивление сжатию (чем ненасыщенные), но обеспечивают меньшее растяжение бислоя; холестерол увеличивает не только сопротивление сжатию, но и препятствует разрыву мембраны. Между тем, при температурах выше фазового перехода фосфолипидный бислой не обладает жесткостью, поэтому поведение эритроцитов как упруго твердого тела, в основном, обусловлено состоянием цитоскелета. Увеличение сродства его компонентов друг к другу повышает стабильность мембраны и тем выше, чем больше количество Ca^{2+} , поступившего в клетку во время сдвиговой деформации [Сторожок С.А и соавт., 1997]. Однако избыток этого катиона индуцирует ряд деструктивных процессов в клетке – активацию скрэмблазы, фосфолипаз, потерю калия и эриптоз [Глушков В.С., Сторожок С.А., 2009].

Считается, что самой травматичной для клеток крови частью экстракорпорального контура является кардиотомный отсос. При попадании воздуха в линию отсоса интенсивность гемолиза возрастает примерно в три раза [Wright G., 2001]. J. Mulholland et al. (2000) показали, что повреждение клеток крови за счет кардиотомного отсоса не имеет основного значения. Наибольший прирост свободного гемоглобина они наблюдали при сочетанном воздействии на кровь интерфазы «воздух – кровь» и отрицательного давления, чем при действии этих факторов в отдельности. При этом скорость движения клеток крови не является ведущим фактором в развитии травмы форменных элементов. Решающее значение имеет высокая скорость поступления воздуха в линию отсоса [Mulholland J. et al., 2000].

Разрушение эритроцитов под действием выраженных напряжений сдвига происходит в тех частях экстракорпорального контура, где наблюдаются высокие

линейные скорости потока, при которых происходит нарушение ламинарного движения крови с переходом его в турбулентное течение [Wright G., 2001; Kameneva M. et al., 2004]. Это наблюдается в местах сужений экстракорпорального контура, например, в катетерах и канюлях. Показано, что в стандартных артериальных канюлях с внутренним диаметром 6-8 мм невозможно поддержать ламинарный поток крови уже при объемной скорости потока более 3 л/мин. Однако при скоростях перфузии до 5 л/мин граница перехода ламинарного потока в турбулентный превышает незначительно [Wright G., 2001]. При этом уровень сдвиговой деформации может достигать как порога сублетальных повреждений клеток красной крови (свыше $21\text{--}43 \text{ Н/м}^2$), так и гемолитического порога (более 150 Н/м^2) [Svenmarker S. et al., 2000; Vercaemst L., 2008]. Не исключено, что существенный вклад в появление гемолиза вносит переливание отмытых аутоэритроцитов из дренажной крови или крови, излившейся в операционную рану. Это, по-видимому, связано с нарушением свойств мембраны эритроцита в процессе аппаратной обработки [Дементьева И.И. и соавт., 2008; Yazer M.H. et al., 2008].

Механическая травма эритроцитов становится причиной непосредственного повреждения клеток в перфузионных системах. Однако проведение ИК сопряжено и с рядом других факторов, индуцирующих опосредованную альтерацию эритроцитов путем изменения их реологических характеристик, определяющих судьбу клеток красной крови в условиях нефизиологического кровотока.

1.3.2. Влияние искусственного кровообращения на реологические характеристики эритроцитов

Как известно, основными параметрами, модулирующими реологические свойства крови, являются вязкость плазмы, агрегационная способность и деформируемость красных клеток крови. Последние два фактора, наряду со стабильностью мембраны эритроцитов, не влияющей на текучесть крови, регламентируют поведение клеток в потоке и реализуются, преимущественно, в различных компартментах кровеносного русла. Агрегация эритроцитов проявляется при низких скоростях движения крови, что в пределах организма имеет место в капиллярах и емкостных сосудах [Левтов В.А. и соавт., 1982;

Ройтман Е. В., 2001]. Биологическая роль деформируемости – оксигенация тканей, поэтому ее значение наиболее важно в микроциркуляторном русле при умеренной скорости движения крови. Стабильность мембраны эритроцитов обеспечивает сохранение целостности клеток в магистральных артериях, где эритроциты не участвуют в газообмене, а их главной задачей становится выживание при высоких скоростях потока [Сторожок С.А. и соавт., 1997]. Проводя аналогию с организмом человека, в аппарате ИК проявление агрегируемости эритроцитов наиболее вероятно в кардиотомном резервуаре, где собирается кровь пациента из венозной магистралей и дренажей; проявление деформируемости клеток – в оксигенаторе, имитирующим легочную капиллярную сеть; проявление свойств стабильности мембраны – в артериальном насосе, магистральных, канюлях, вакуумных дренажах, которые имеют малый просвет и сопряжены с воздействием высокого давления [Меньшугин И.Н., 1998; Солтоски П.Р. и соавт., 2005].

Агрегируемость красных клеток крови в основном зависит от поверхностного заряда мембраны эритроцитов (за счет наличия сialовых кислот в составе гликофоринов), морфологии клеток, ионного состава среды, содержания поверхностно-активных веществ, концентрации фибриногена, иммуноглобулинов, а также от контакта с инородными поверхностями [Ройтман Е. В., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Henkelman S. et al., 2012]. При этом на форму эритроцитов влияет интенсивность внутриклеточного метаболизма, поскольку дефицит АТФ в клетках угнетает деятельность ионных насосов, опосредуя накопление Ca^{2+} и появление эритроцитов с множественными выростами – эхиноцитов, обладающих высоким агрегационным потенциалом [Осетров И.А. и соавт., 2006]. Между тем, для агрегации эритроцитов необходимо присутствие в среде высокомолекулярного соединения (фибриногена, другого белка или полисахарида), которое, адсорбируясь на поверхности эритроцитов, выступает в роли мостиков между клетками и опосредует сближение их на расстояние, лимитируемое электростатическими силами отталкивания отрицательно заряженных поверхностей мембран. При этом прочность агрегатов прямо пропорциональна концентрации фибриногена или высокомолекулярного агреганта в крови [Левтов В.А. и соавт., 1982; Яхно Т.А., 2011].

Поскольку содержание белковых компонентов плазмы крови во время ИК

снижается вследствие гемодилюции, то агрегация эритроцитов после экстракорпоральной перфузии имеет аналогичную тенденцию [Graaff R. et al., 2004; Morariu A.M. et al., 2006]. Благоприятное значение этого феномена предопределило интерес исследователей к изучению агрегируемости эритроцитов при операциях на остановленном сердце.

О постперфузионном изменении деформируемости эритроцитов имеется достаточно много сведений, демонстрирующих как снижение показателя после ИК [Hirayama T. et al., 1985, 1986; Zhang S., Yao S., 2004], так и неизменные его значения [Svenmarker S. et al., 2000]. Деформируемость эритроцитов характеризуется способностью видоизменять свою форму в сдвиговом потоке, сохраняя объем и площадь поверхности клеток на исходном уровне [Ройтман Е. В. и соавт., 2001; Шилов А.М. и соавт., 2008; Атауллаханов Ф.И. и соавт., 2009; Akman T. et al., 2012]. Это свойство эритроцитов во многом зависит от их геометрии (оптимальна форма двояковогнутого диска) и вязкостно-эластических свойств клетки в целом, которые складываются из микровязкости эритроцитарной мембраны, состояния цитоскелета и текучести интрацеллюлярного матрикса (обусловленна внутриклеточной концентрацией гемоглобина) [Катюхин Л.В., 2003; Шилов А.М. и соавт., 2008; Lewalle A., Parker K.H., 2011; Akman T. et al., 2012]. Между тем, неизвестно, какой из этих факторов имеет наибольшее значение в патогенезе интраоперационного угнетения деформируемости эритроцитов.

Существенным образом вязкостно-эластические свойства эритроцитов могут изменяться под влиянием инфузионных сред, которые применяются как для заполнения первичного объема аппарата ИК, так и для компенсации кровопотери [Fransen E.J. et al., 2001]. Так, полиглюкин и (особенно) реополиглюкин существенно ухудшают деформируемость эритроцитов, модифицированный желатин (гелофузин) и 6% гидроксипропилоккрахмал (ГЭК) 450/0,7 на данный показатель не влияют, а 6% ГЭК 130/0,42 (волювен), 5% ГЭК 200/0,5, 10% ГЭК 200/0,5 и 20% альбумин повышают способность клеток красной крови к деформации. Наиболее выраженное дезагрегантное действие обнаружено у альбумина, реополиглюкина и 6% ГЭК 130/0,42. В то же время полиглюкин, гелофузин и особенно 6% ГЭК 450/0,7 способствуют усилению агрегации эритроцитов [Герасимов Л.В. и соавт., 2008].

Показано, что некоторые инфузионные среды изменяют морфологию красных клеток крови. Так, инкубация эритроцитов в 10% NaCl характеризуется почти полной утратой клетками дисковидной формы, 10% раствор глюкозы вызывает заметно меньшие изменения, а волювен, 20% раствор альбумина и реополиглюкин не оказывают влияния на морфологию эритроцитов [Eising G.P. et al., 2001; Бурова О.О. и соавт., 2006; Герасимов Л.В. и соавт., 2008,]. Кроме того, по мере пребывания эритроцитов в гипертонической среде число эритроцитов, сохраняющихся при внесении в изотонический раствор, снижается [Циркин В.И. и соавт., 2009].

Изменения поверхностной архитектоники, деформируемости и агрегируемости эритроцитов могут влиять на способность этих клеток перемещаться в просвете капилляров, обеспечивая газотранспортную функцию крови, и противостоять сдвиговой деформации в аппарате ИК. При этом морфофункциональные свойства эритроцитов во многом определяются метаболическим статусом клеток.

1.3.3. Интраоперационное изменение структурно-метаболических свойств эритроцитов как причина модуляции их деформируемости

Несомненно, важным аспектом в механизмах нарушения способности эритроцитов к упругой деформации на фоне ИК является ионный дисбаланс и нарушение энергетического метаболизма клеток. Достаточно давно установлено, что проведение экстракорпоральной перфузии повышает содержание Na^+ и Ca^{2+} в клетках красной крови, снижая уровень внутриклеточного K^+ [Hirayama T. et al., 1985, 1986; Zhang S., Yao S., 2004]. Высокая проницаемость мембраны эритроцитов для катионов вызвана уменьшением плотности упаковки липидного бислоя при сдвиговой деформации [Сторожок С.А. и соавт., 1997]. При этом на долю дисбаланса Na^+/K^+ -соотношения приходится примерно 20% постперфузионного повышения ригидности клеток красной крови, а ведущая роль принадлежит прогрессивному накоплению Ca^{2+} в эритроцитах [Hirayama T. et al., 1986]. В физиологических концентрациях Ca^{2+} индуцирует повышение деформируемости этих клеток, опосредованное образованием инозитолтрифосфата и активацией протеинкиназы С. Избыток данного катиона обеспечивает тесное взаимодействие

белков цитоскелета между собой за счет кальмодулин-зависимой активации аддуцина, снижая деформируемость эритроцитов, и индуцирует открывание Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, выход ионов K^+ , воды и нарастание вязкости цитоплазмы [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Санников А.Г., 1999; Петрова И.В. и соавт., 2011].

Немаловажную роль в нарушении ионного гомеостаза эритроцитов во время ИК играет дисфункция молекул активного транспорта. Так, активность Na^+/K^+ - и Ca^{2+} -АТФаз в мембране эритроцитов при гипотермической перфузии снижается [Zhang S., Yao S., 2004; Deng Y.K. et al., 2010]. Однако в виду активации процессов ресинтеза АТФ в эритроцитах, подвергнутых деформационному стрессу [Санников А.Г., 1999], концентрация данного макроэрга после ИК уменьшается незначительно [Cavaliere F. et al., 1999; Бокерия Л.А. и соавт., 2004]. Это важно, поскольку, обеспечивая фосфорилированное состояние белков цитоскелета, в котором они обладают пониженным сродством друг к другу, АТФ повышает деформируемость эритроцитов [Санников А.Г., 1999; Ipsaro J.J., Mondragón A., 2010]. В целом, метаболизм глюкозы в эритроцитах при непродолжительных перфузиях (около 45 мин) существенно не нарушается: содержание адениловых нуклеотидов, аденозина, ксантина, гипоксантина, НАД, соотношения лактат/пируват в клетках красной крови не изменяется, но увеличивается концентрация НАДФ, лактата (поступает из плазмы) и пирувата [Cavaliere F. et al., 1999; Бокерия Л.А. и соавт., 2004].

Кроме того, работа ионных насосов и собственно деформируемость эритроцитов сильно зависят от вязкостно-эластических свойств липидного бислоя, которые определяются соотношением холестерол/фосфолипиды и содержанием ненасыщенных жирных кислот в мембране. Деформируемость эритроцитов снижается при увеличении доли холестерола в мембране и снижении степени ненасыщенности жирных кислот, которые в норме составляют около 17% всех жирно-кислотных остатков [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Шилов А.М. и соавт., 2008; Heiner A.L. et al., 2008].

В условиях физиологических температур фосфолипидный бислой представляет собой жидкокристаллическую структуру, однако претерпевая фазовый переход, который для многих насыщенных жиров находится в области $+18-25^{\circ}\text{C}$, поверхностное натяжение в мембране сильно нарастает, что чревато ее

электрическим пробоем и деструкцией клетки [Антонов В.Ф., 1998]. Между тем, действие низких температур на клетки крови при ИК свойственно не только гипотермическим перфузиям, но и нормотермическим, так как пассаж холодного (+4-12⁰С) кардиоплегического раствора по сердцу завершается поступлением его в правое предсердие и общий контур экстракорпоральной циркуляции [Меньшугин И.Н., 1998; Шаталов А.Е., Шнайдер Ю.А., 2004; Бокерия Л.А., Вольгушев В.Е., 2005]. В виду того, что ненасыщенные жирные кислоты претерпевают фазовый переход при более низких температурах (чем насыщенные), уменьшение содержания таковых в мембране ухудшает резистентность эритроцитов не только к механическому, но и к термическому воздействию. При этом основной причиной данного явления в эритроцитах, не способных к синтезу жиров, служит активация механизма перекисного окисления липидов (ПОЛ).

1.3.4. Роль механизмов свободнорадикального окисления в деструкции эритроцитов при искусственном кровообращении

В ходе ИК газообмен осуществляется с помощью оксигенатора, в который подается воздушная смесь с повышенным содержанием кислорода для компенсации гемодилюции, что создает высокое парциальное давление этого газа в крови – гипероксемию [Короткина Р.Н. и соавт., 2005]. Последняя наиболее выражена при гипотермических перфузиях, когда возрастает растворимость кислорода в плазме крови и сродство гемоглобина к кислороду, в результате чего кислород аккумулируется в эритроцитах, инициируя процессы свободнорадикального окисления [Belboul A. et al., 1993; Давыдкин И.Л. и соавт., 2002; Короткина Р.Н. и соавт., 2005; Deng Y.K. et al., 2010].

Взаимодействуя с основным белком эритроцитов – гемоглобином (Fe^{2+}), кислород опосредует неферментативное окисление его до метгемоглобина (Fe^{3+}) с образованием супероксидного радикала ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Однако, благодаря функционированию метгемоглобинредуктазы, метгемоглобин в норме восстанавливается при участии молекул НАДН в гемоглобин, а супероксид-радикал с помощью СОД подвергается утилизации, восстанавливаясь до пероксида водорода (H_2O_2) [Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Последний менее активен, чем $\text{O}_2^{\cdot-}$, но служит источником образования высокореакционного гидроксил-радикала

(НО \cdot). Кроме того, генерация свободных радикалов также возможна в реакциях с участием молекулярного кислорода и ионов металлов с переменной валентностью (Cu $^{2+}$, Fe $^{2+}$) [Pawlak W. et al., 1998; Владимиров Ю.А., 2000; Кузьменко Д.И. и соавт., 2007; Geetha A. et al., 2007].

Влиянию свободных радикалов особо подвержены ненасыщенные жирные кислоты клеточной мембраны, ненасыщенные углеводороды и стерины, а также ароматические аминокислотные остатки белков, которые, отдавая свой водород свободным радикалам, изменяют собственную структуру [Pawlak W. et al., 1998; Суханова Г.А., Серебров В.Ю., 2000]. Даже в норме производство активных форм кислорода (АФК) в эритроцитах происходит постоянно и с достаточно высокой скоростью, поэтому клетки обладают мощной системой антиоксидантной защиты, к основным ферментам которой относят СОД, каталазу и глутатионпероксидазу [Pawlak W. et al., 1998; Суханова Г.А., Серебров В.Ю., 2000; Кузьменко Д.И. и соавт., 2007; Ogasawara Y. et al., 2008; Antonelou M.H. et al., 2011].

О кинетике СОД во время ИК единого представления не существует. По данным разных авторов, активность фермента в эритроцитах и плазме крови может как повышаться [Ochoa J.J. et al., 2003], так и снижаться на всех этапах операции независимо от температурного режима перфузии [Короткина Р.Н. и соавт., 2005; Deng Y.K. et al., 2010], либо вообще не изменяться [Iskesen I. et al., 2006]. СОД является «первой линией защиты» эритроцитов от АФК и принадлежит к группе металлоферментов, поскольку в качестве кофермента содержит в своем составе атомы металлов (Cu, Zn или Mn). СОД превращает супероксидные анионы в пероксид водорода, чем обеспечивается протекция клеточных структур от действия анион-радикалов и гидроксильных радикалов, которые могут образовываться из супероксидного радикала кислорода [Pawlak W. et al., 1998; Кузьменко Д.И. и соавт., 2007]. Утилизация менее цитотоксичного пероксида водорода происходит с помощью двух ферментов – глутатионпероксидазы и каталазы. Несмотря на то, что активность каталазы в эритроцитах превышает таковую в других клетках и тканях, ключевая роль в регуляции свободнорадикального окисления принадлежит глутатионпероксидазе и системе глутатиона в целом [Кузьменко Д.И. и соавт., 2007; Whillier S. et al., 2011].

При операциях с ИК активность ферментов обмена глутатиона (глутатионтрансферазы, глутатионредуктазы) и уровень восстановленного глутатиона в эритроцитах или существенно не меняется [Inal M. et al., 1999; Короткина Р.Н. и соавт., 2005], или снижается на протяжении экстракорпоральной перфузии и после нее [Давыдкин И.Л. и соавт., 2002; Iskesen I. et al., 2006; Akila A. et al., 2007]. Глутатионпероксидаза – это негемовый, селен-содержащий фермент, катализирующий реакцию восстановления пероксида водорода или гидропероксида жирной кислоты (ROOH) за счет окисления восстановленного глутатиона (G-SH). В результате образуются соединения, не обладающие цитотоксическими свойствами, такие как вода, органические спирты и окисленный глутатион. Восстановление последнего происходит с помощью НАДФН-зависимой глутатионредуктазы [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Кузьменко Д.И. и соавт., 2007; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Елкина Н.М. и соавт., 2011; Rybka J. et al., 2011]. При этом основным источником НАДФН является пентозофосфатный путь, в котором важную роль играет Г-6-ФДГ, катализирующая реакцию превращения глюкозо-6-фосфата в 6-фосфат-глюконолактон с образованием одной молекулы НАДФН. Данный фермент обеспечивает функционирование всей системы глутатиона и, как следствие, поддержание жизнеспособности эритроцитов [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Ogasawara Y. et al., 2008]. Сообщается, что у больных с недостаточностью Г-6-ФДГ отмечается высокий уровень гемоглобинемии после операции с ИК, обуславливающий развитие тяжелой анемии и выполнение частых гемотрансфузий [Gerrah R. et al., 2003; Chowdhry V. et al., 2012].

Активность каталазы при ИК в условиях умеренной гипотермии (до +26⁰С) меняется неоднозначно в зависимости от этапа операции, но в целом имеет положительную тенденцию [Давыдкин И.Л. и соавт., 2002; Ochoa J.J. et al., 2003; Akila A. et al., 2007], хотя есть сообщения и о снижении активности фермента во время перфузии [Inal M. et al., 1999]. Каталаза осуществляет восстановление H₂O₂ до двух молекул воды, при этом донором электронов является сам пероксид водорода [Дубинина Е.Е., 2001; Кузьменко Д.И. и соавт., 2007; Krzystek-Korpacka M. et al., 2010]. На фоне глубокой гипотермии (+25-21⁰С) активность каталазы и других ферментов антиоксидантной защиты эритроцитов угнетается, что

способствует активации ПОЛ [Давыдкин И.Л. и соавт., 2002; Короткина Р.Н. и соавт., 2005].

Интенсификация процессов свободнорадикального окисления во время ИК становится важным механизмом повреждения молекул интрацеллюлярного матрикса (повышается содержание метгемоглобина) и мембранных структур эритроцитов, доказательством чего служит увеличение в клетках мембранно-связанного гемоглобина. Фиксация молекул гемоглобина на внутренней поверхности мембраны эритроцитов происходит вследствие погружения триптофановых остатков белка в фосфолипидный слой в области анкирина (белок цитоскелета) [Давыдкин И.Л. и соавт., 2002; Кленова Н.А., Фатенков О.В., 2004]. В итоге нарастает микровязкость липидного бислоя, повышается ригидность клетки, что для эритроцита означает снижение деформируемости, механической резистентности и гемолиз [Pawlak W. et al., 1998; Ройтман Е.В. и соавт. 2001; Кармен Н.Б. 2004; Watanabe N. et al., 2007]. Кроме того, деструкция мембраны эритроцитов в результате активации ПОЛ приводит к усилению физиологического процесса микровезикуляции, который становится патологическим: поврежденные участки мембраны выпячиваются наружу с образованием везикулы и затем сливаются [Ройтман Е.В. и соавт. 2001; Морозова В.Т. и соавт. 2007].

Неоспоримым является факт увеличения содержания продуктов ПОЛ в плазме крови и снижения ее антиоксидантной активности во время ИК [Curello S. et al., 1995; Ochoa J.J. et al., 2003; Кленова Н.А., Фатенков О.В., 2004; Iskesen I. et al., 2006]. Данный процесс наиболее ярко выражен в момент снятия зажима с аорты, что позволяет рассматривать реперфузию ишемизированного во время ИК миокарда как основной источник образования свободных радикалов и продуктов ПОЛ [Iskesen I. et al., 2006; Osaka M. et al., 2006; Akila A. et al., 2007]. Между тем, эритроциты проявляют функциональную устойчивость к окислительному стрессу лишь при невысокой концентрации малонового диальдегида в сыворотке крови [Ройтман Е.В. и соавт., 2001]. Увеличение степени ее окисленности *in vitro* сопровождается уменьшением осмотической резистентности и деформируемости эритроцитов, повышением мембранной проницаемости, эритроцитарной агрегации и деструкции клеток [Ройтман Е.В. и соавт. 2001; Кленова Н.А., Фатенков О.В., 2004].

Модуляция структурно-функциональных и метаболических свойств эритроцитов на протяжении экстракорпоральной перфузии оказывает опосредованное влияние на гемолитическую стойкость клеток красной крови, в то время как прямой цитолитический эффект связан с влиянием системы комплемента.

1.3.5. Активация системы комплемента при операциях с искусственным кровообращением и ее роль в гемолитических реакциях

В виду непосредственного контакта крови с чужеродной поверхностью экстракорпорального контура и воздушной фазой проведение ИК индуцирует активацию системы комплемента и гемостаза [Chambers S.D. et al., 1996 Дементьева И.И. и соавт., 2008]. Так, экспериментально доказано свойство синтетических поверхностей, в частности биodeградируемых покрытий на основе природного полисахарида хитозана, вызывать гемолиз эритроцитов после контакта с нативной кровью [Самсонова Н.Н. и соавт., 2007]. При этом, если степень активации тромбоцитов и гранулоцитов зависит от наличия и вида покрытия перфузионных систем, то на активацию системы комплемента данный факт оказывает неоднозначное влияние [Чарная М.А. и соавт., 2006]. По одним данным, степень активации системы комплемента одинакова в покрытых и непокрытых системах [De S.F., et al., 2002; Чарная М.А. и соавт., 2006; Draaisma A.M. et al., 2006], по другим – меньше в покрытых системах, чем в непокрытых [Lindholm L. et al., 2004; Gunaydin S. et al., 2010], при этом вид покрытия значения не имеет [Noguchi M. et al., 2003; Jacobs S. et al., 2011].

Нахождение крови в неэндотелизированной перфузионной системе, которая лишена естественных ингибиторов комплемента, индуцирует спонтанный гидролиз тиоэфирной связи в молекуле С3-компонента, т.е. запускает альтернативный путь активации комплемента, приводящий к формированию компонентов С3а и С5а [Ройт А. и соавт., 2000; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007]. Нейтрализация гепарина в конце ИК стимулирует классический механизм запуска системы комплемента с появлением в плазме С4а и дальнейшим ростом концентрации С3а [Fromes Y. et al., 2002; Paparella D. et al., 2002; Van den Goor J. et al., 2004]. Содержание последнего остается высоким и после проведения ИК, положительно

коррелируя с его длительностью и риском послеоперационных осложнений [Wan S. et al., 1997; Kubicki R. et al., 2013]. Кроме того, транслокация эндотоксинов через ишемизированную стенку кишечника во время ИК активирует систему комплемента как по классическому, так по лектиновому и альтернативному путям [Винницкий Л.И. и соавт., 1997; Wan S. et al., 1997].

Независимо от механизма инициации каскада реакций в системе комплемента он завершается формированием гидрофобного мембраноатакующего комплекса C5b-C9, способного в виде порообразующей молекулы встраиваться в липидный бислой клетки и вызывать ее лизис за счет увеличения проницаемости мембраны. Однако гемолитический эффект системы комплемента определяется не только степенью активации его компонентов. Мембрана эритроцитов содержит белки, обладающие протективным действием в отношении литической атаки системы комплемента на клетки крови, в связи с чем ее конечный деструктивный эффект зависит от соотношения белков индукторов и ингибиторов системы комплемента [Ройт А. и соавт., 2000; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Pangburn M.K. et al., 2008; Piccoli A.K. et al., 2011].

Белок DAF (decay-accelerating factor – фактор, ускоряющий распад; он же CD55), несущий антигены системы Cromer, прерывает ассоциацию C4b и C3b, а гликопротеин CD59 связывает компоненты комплемента C8 и C9, что предотвращает формирование мембраноатакующего комплекса. Оба белка удерживаются в мембране с помощью особой якорной структуры – гликозилфосфатидилинозитола. Рецептор комплемента CR1 (CD35), с которым ассоциированы антигены системы Knops, фиксирует компоненты комплемента C3b и C3d, прерывая как классический, так и альтернативный пути активации системы комплемента. При этом плотность молекул CR1 на поверхности эритроцитов в популяции сильно варьирует [Lachmann P.J., 1991; Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., 2001; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Pangburn M.K. et al., 2008; Piccoli A.K. et al., 2011].

Следует отметить, что в литературе отсутствует информация о динамике уровня презентации данных структур на эритроцитах в процессе ИК и его влиянии на выраженность постперфузионного гемолиза. Однако покрытие

экстракорпорального контура молекулами CD55 в 2 раза снижает степень активации системы комплемента [Watkins N.J. et al., 1997; Luo J. et al., 1998].

Таким образом, патогенез перфузионной травмы эритроцитов достаточно сложен и затрагивает все аспекты жизнедеятельности клеток красной крови. Поэтому трудно выделить ведущие механизмы интраоперационного разрушения эритроцитов. Между тем, верификация таковых позволила бы проводить таргетную терапию и профилактику гемолиз-индуцированной органной дисфункции у кардиохирургических больных в послеоперационном периоде.

1.4. Патогенез органной дисфункции у кардиохирургических больных при массивном интраоперационном гемолизе

Совокупность множества негативных факторов экстракорпоральной перфузии может обусловить развитие массивного интраоперационного цитолиза эритроцитов в сосудистом русле и, частично, в клетках ретикулоэндотелиальной системы. Нарастая в первые минуты ИК, концентрация свободного гемоглобина в плазме крови уже через 30 мин достигает отметки 500% от исходного [Дементьева И.И. и соавт., 2008; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. При этом повышение уровня гемоглобинемии более 20-30 мг/дл (при разрушении около 5 мл эритроцитов) сопровождается видимым изменением цвета плазмы, более 40-60 мг/дл (при гемолизе 5-10 мл эритроцитов) – возникновением желтухи через 6-12 ч после начала гемолиза, а свыше 200 мг/дл – поступлением свободного гемоглобина в мочу и окрашиванием ее в красно-бурый цвет (гемоглобинурия) [Дуткевич И.Г., 2007]. Однако, по данным И.И. Дементьевой и соавт. [2008], почечный порог для свободного гемоглобина во время ИК может существенно снижаться на фоне гипоксии почек до 50 мг/дл, обуславливая сочетанное повреждение этих органов даже при интраоперационном гемолизе невысокой интенсивности [Davis C. et al., 1999; Haase M. et al., 2010].

Безусловно, почки являются наиболее уязвимым органом при развитии постперфузионного гемолиза [Davis C. et al., 1999; Haase M. et al., 2010]. Даже в норме незначительные количества свободного гемоглобина, несвязанного с гаптоглобином, могут фильтроваться в клубочках почек и затем реабсорбироваться канальцевым эпителием [Воробьев А.И., 2005]. В условиях ИК избыточное

поступление свободного гемоглобина в почечные канальцы первоначально уравнивается его интенсивной реабсорбцией. В перегруженных гемоглобином эпителиоцитах это вещество метаболизируется, в результате чего образуется свободное железо, которое, наряду с железом гема, индуцирует генерацию АФК в почечном эпителии (взаимодействует с эндогенным пероксидом водорода) и его свободнорадикальное повреждение [Kristiansen M. et al., 2001; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. При дальнейшем нарастании гемоглобинемии, если количество поступившего в канальцевый аппарат гемоглобина превышает реабсорбционные возможности эпителиоцитов, то в условиях кислой среды мочи данный белок преципитирует в просвете канальцев, вызывая их обструкцию [Everse J., Hsia N., 1997; Haase M. et al., 2010].

Универсальным механизмом развития органной дисфункции любой локализации, в том числе и почечной, является нарушение микроциркуляции, в чем свободный гемоглобин принимает непосредственное участие. Освобождаясь из эритроцитов, гемоглобин взаимодействует с эндогенным вазодилатирующим фактором – монооксидом азота (NO). При этом дезоксигемоглобин связывается с NO обратимо, образуя нитрозилгемоглобин, а оксигемоглобин – необратимо с образованием нитрата и метгемоглобина [Reiter C.D. et al., 2002; Rother R.P. et al., 2005; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Последний обладает высоким сродством к кислороду, что наряду с вазоконстрикцией потенцирует интраоперационную гипоксию в тканях, вызванную гемодилюцией, кровопотерей, гемолизом и централизацией кровообращения [Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Кроме того, внутрисосудистый гемолиз сопровождается высвобождением из эритроцитов аргиназы-1, превращающей L-аргинин (предшественник NO) в L-орнитин, что, теоретически, должно редуцировать образование NO. Однако на практике этот механизм не оказывает существенного влияния на интраоперационную вариабельность уровня NO [van de Poll M.C. et al., 2008; Kato G.J., Taylor J.G., 2010].

Снижая биодоступность NO, свободный гемоглобин индуцирует микроциркуляторные расстройства и повреждение органов. Установлено, что концентрация свободного гемоглобина в плазме крови более 10 мг/дл потенциально может ингибировать вазодилатацию *in vivo* [Jeffers A. et al., 2006].

Поэтому клинические последствия высокой гемоглобинемии, помимо нарушений гемокоагуляции, включают в себя и дистонии, вовлекающие в патогенез гемолитических расстройств сердечно-сосудистую, дыхательную, пищеварительную, мочевыделительную и половую системы [Rother R.P. et al., 2005].

Экспериментально было показано, что свободный гемоглобин вызывает дозозависимое увеличение систолического и диастолического кровяного давления (купируется введением нитропрусида натрия), а также приводит к сужению легочных сосудов вплоть до развития легочной артериальной гипертензии [Erhart S.M. et al., 2000; Deem S. et al., 2002]. Также сообщалось о непосредственном эффекте свободного гемоглобина угнетать сократительную функцию левого желудочка у кроликов [Vercaemst L., 2008].

Негативное влияние свободного гемоглобина на желудочно-кишечный тракт заключается в инициации абдоминальных болей, дисфагии, судорог пищевода, интенсивность которых зависит от уровня гемоглобинемии и NO в крови [Hirsch D.P. et al., 1998; Rother R.P. et al., 2005]. Наряду с этим, внутривенное введение раствора свободного гемоглобина крысам вызывало нарушение микроциркуляции как в тонком, так и в толстом кишечнике, что проявлялось увеличением содержания интестинального липид-связывающего протеина (маркер повреждения энтероцитов подвздошной кишки) в крови и было подтверждено гистологически [Hanssen S.J. et al., 2011].

В почках альтерации подвергаются, главным образом, проксимальные каналы. При этом точным предиктором почечной дисфункции в послеоперационном периоде служат пиковые концентрации свободного гемоглобина в плазме крови во время ИК, в то время как гемоглобин в моче еще не определяется [Meyer C. et al., 2010; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Более того, имеются сведения о развитии эректильной дисфункции на фоне внутрисосудистого гемолиза у мужчин, больных пароксизмальной ночной гемоглобинурией [Rother R.P. et al., 2005].

Несмотря на плейотропное влияние гемоглобинемии на организм кардиохирургических пациентов, самым грозным осложнением постперфузионного гемолиза может стать развитие синдрома диссеминированного внутрисосудистого

свертывания крови и полиорганной недостаточности [Воробьев А.И., 2005]. В присутствии высоких концентраций свободного гемоглобина тромбоциты усиливают свои агрегационные свойства и адгезивность к протромботическим поверхностям, коими являются поврежденная сосудистая стенка и неэндотелизированная поверхность аппарата ИК. Этот эффект также обусловлен гемолиз-индуцированной редукцией пула эндогенного NO, который в норме опосредует дезагрегацию агрегированных тромбоцитов и угнетает их адгезию посредством увеличения концентрации циклического гуанозинмонофосфата в клетках [Зубаиров Д.М., 2000; Rother R.P. et al., 2005; Кузник Б.И., 2010; Kato G.J., Taylor J.G., 2010]. Кроме того, сообщается о способности свободного гемоглобина взаимодействовать с серотониновыми рецепторами тромбоцитов и гладкомышечных клеток микрососудов, что приводит к агрегации кровяных пластинок и спазму сосудов микроциркуляторного русла [Кармен Н.Б., 2004].

Наряду с этим, склонность к тромбообразованию вследствие гиперагрегации тромбоцитов на фоне гемоглобинемии усугубляется активацией коагуляционного звена гемостаза. По данным Zhou Z. и коллег (2009), свободный гемоглобин способен ингибировать специфические протеазы, разрушающие фактор Виллебранда, оказывая тем самым прокоагулянтное и проагрегантное действие. В то же время стромы разрушенных эритроцитов, содержащих тканевой тромбопластин, активируют систему гемостаза по внешнему пути и выступают в роли фосфолипидных матриц для взаимодействия факторов свертывания крови [Дуткевич И.Г., 2007]. К тому же формирование дефицита NO вследствие его связывания со свободным гемоглобином обуславливает недостаточное ингибирование фибринстабилизирующего фактора, что повышает прокоагулянтный потенциал крови, но, с другой стороны, оказывает противоположный эффект, увеличивая содержание в крови продуктов деградации фибрина и антитромбин-тромбинового комплекса [Shao J. et al., 2001; Rother R.P. et al., 2005]. Между тем, именно дисбаланс в системе гемостаза лежит в основе диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. Клинически подтверждением важной роли гемоглобинемии в активации системы гемостаза служат частые тромботические осложнения у больных микросфероцитозом,

серповидно-клеточной анемией, талассемией, пароксизмальной ночной гемоглобинурией [Воробьев А.И., 2005; Kato G.J., Taylor J.G., 2010].

Таким образом, интраоперационные нарушения регионарного кровотока в жизненно важных органах, усугубляемые массивным внутрисосудистым гемолизом, определяют их дисфункцию в постперфузионном периоде вплоть до формирования органной и полиорганной недостаточности. Показано, что после операций с ИК почечная недостаточность манифестирует примерно у 4% прооперированных [Сигаев И.Ю. и соавт., 2008], у 40-100% больных имеют место субклинические нарушения клубочковой фильтрации и дисфункция проксимальных канальцев почек [Подкаменный В.А., 2006; Морозов Ю.А. и соавт., 2007, 2008; Mariscalco G. et al., 2011; Lamy A. et al., 2012], дыхательная недостаточность отмечается у 2% пациентов [Подкаменный В.А., 2006; Сигаев И.Ю. и соавт. 2008], респираторные осложнения – у 8% [Mariscalco G. et al., 2011; Lamy A. et al., 2012], острая ишемия кишечника – у 6% [Kieffer E. et al., 2008], инсульты – у 2-7,5% [Подкаменный В.А., 2006; Sigurjonsson H. et al., 2012], поражение центральной нервной системы в виде когнитивного дефицита (по данным разных авторов) – у 12,5-73% [Бокерия Л.А. и соавт., 2004; Барбараш Л.С. и соавт., 2011; Baranowska K. et al., 2012]. Полиорганная недостаточность встречается редко, но служит основной причиной смерти среди пациентов палат интенсивной терапии и реанимации хирургических стационаров, а при операциях с ИК составляет треть от общей смертности (6-15%) [Онищенко Н.А. и соавт., 2001; Kieffer E. et al., 2008; Polomsky M., Puskas J.D., 2012].

Учитывая широкий спектр органных расстройств после операций с ИК и важную роль внутрисосудистого гемолиза в механизмах их реализации, а также высокую значимость дисфункции жизненно-важных органов в послеоперационной реабилитации пациентов, актуальной проблемой современной перфузиологии и кардиохирургии является поиск возможностей прогнозирования и коррекции постперфузионных гемолитических реакций.

1.5. Современные подходы к прогнозированию и коррекции интраоперационного гемолиза в кардиохирургии

Анализируя данные литературы, можно сказать, что в настоящее время существуют два подхода в концепции активного управления выраженностью гемоглобинемии после операций с ИК. Первый является унифицированным для всех пациентов и позволяет еще накануне операции предвидеть определенный уровень постперфузионной гемоглобинемии, принимая во внимание особенности технического и методического обеспечения экстракорпорального кровообращения [Vercaemst L., 2008]. Вторым подходом индивидуальный, так как интраоперационная коррекция гемоглобинемии проводится только у тех пациентов, у которых уже развился внутрисосудистый гемолиз, угрожающий жизни больного вследствие высокой активности процесса и/или исходно существующей дисфункции органов (особенно почек) [Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Данный способ представляет собой, по сути, лечебные мероприятия, в то время как унифицированный метод можно отнести к мерам первичной профилактики постперфузионного гемолиза.

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

В ходе развития индустрии экстракорпоральных технологий было разработано и апробировано множество модификаций аппаратов ИК и их отдельных компонентов – насосов, оксигенаторов, перфузионных магистралей, коронарных отсосов, фильтров и т.д. Поэтому, учитывая недостатки и преимущества отдельных элементов системы экстракорпорального кровообращения, можно предвидеть степень интраоперационной гемоглобинемии и, таким образом, влиять на выраженность гемолиза.

Первые сведения о различных гемолитических эффектах перфузиологических устройств были получены в 1958 г., когда в Национальном Институте Здоровья V.O. Björk сделал доклад о гемолизе, вызываемом механическими насосами. Он показал, что пальцевый насос вызывает почти в 3 раза более выраженную травму крови по сравнению с двухжелудочковым насосом [Wright G., 2001]. Сегодня в кардиохирургии чаще применяются **насосы** роликового и центрифужного типов. При этом показано, что роликовые насосы

полного сдавления вызывают больший гемолиз, чем насосы с неполной окклюзией [Hansbro S.D. et al., 1999; Vercaemst L., 2008]. Характер потока крови (пульсирующий или не пульсирующий) не влияет на степень выраженности гемолиза [Kang Y.J. et al., 2010]. Наиболее предпочтительным является использование центрифужных насосов, обладающих минимальным (на сегодняшний день) травмирующим влиянием на клетки крови [Morgan I.S. et al., 1998; Nasso G. et al., 2011]. Наряду с этим, в некоторых исследованиях продемонстрировано отсутствие явных преимуществ последних перед роликовыми конструкциями [Hansbro S.D. et al., 1999; Vercaemst L., 2008]. Сравнительная характеристика центрифужных насосов различных фирм-производителей обнаружила меньший гемолитический эффект у «Rota-flow» («Jostra», Германия) и «Cobe Revolution» («Cobe Cardiovascular, Inc.», США) в сравнении с «Medtronic Biomedicus» («Medtronic, Inc.», США) [Lawson D.S. et al., 2005]. Кроме того, недавно разработан насос турбинного типа с низким уровнем гемолиза и тромбообразования [Патент № WO2010013355, Japan, 2010].

Как, известно, пузырьковые **оксигенаторы**, в отличие от мембранных, вызывают массивный гемолиз. Среди наиболее современных мембранных оксигенаторов Д-703, -705, -902 и -905 («Dideco», Италия), «Gish Vision» («GISH Biomedical, Inc.», США), «Baxter» («Baxter», США), «Quadrox» («Jostra», Германия), «Hility» («Medos», Германия) и «Spiral Gold» («Bentley», США) максимальным деструктивным влиянием на эритроциты обладают Д-902, Д-703 и «Baxter», а минимальным – «Quadrox» и «Hility» [Дементьева И.И. и соавт., 2008, 2010]. Эксплуатация оксигенаторов с относительно низким («Quadrox BE-НМО 2000», «Jostra», Германия) и высоким («Capiox SX18», «Terumo Cardiovascular Systems Corporation», США) гидравлическим сопротивлением не оказывает влияния на интенсивность гемолиза [Simons A.P. et al., 2010]. При этом уровень сдвиговой деформации в современных оксигенаторах обычно не достигает гемолитического порога и порога сублетальных повреждений клеток красной крови, что в сочетании с правильным использованием устройства (согласно инструкции производителя) обеспечивает почти нулевое влияние данного компонента ИК на степень постперфузионного гемолиза. Считается, что уровень гемоглобинемии можно снизить, применяя оксигенаторы с гепариновым

покрытием. В непокрытых системах этого можно добиться путем предварительной обработки устройств альбумином [Vercaemst L., 2008].

Безусловно, свойства поверхности **магистралей** экстракорпорального контура определяют выраженность постперфузионного гемолиза. Изучение биосовместимости полимерных материалов установило, что наиболее сильным гемолитическим эффектом обладают гидрированный и винилпиридин-бутадиеновый каучуки, тефлон и полиэтилен, минимальным – силикон и стекло [Пестун А.Ф. и соавт., 2001]. В кардиохирургии использование перфузионных магистралей из латекса ассоциировано с высокой степенью гемолиза, а из силастика, поливинилхлорида и силикона – с низкой. При этом гепариновое покрытие поливинилхлоридных трубок усиливает гемоглобинемию в сравнении с таковыми без покрытия [Harmand M.F., Briquet F., 1999]. В целом о влиянии биосовместимых покрытий аппарата ИК на гемолитическую стойкость эритроцитов однозначных сведений нет: по одним данным, протективный эффект отмечается [Fransen E.J. et al., 2005; Vercaemst L., 2008], по другим, – нет [Harmand M.F., Briquet F., 1999].

В целом, гладкие и гидрофобные перфузионные магистрали, выполненные из биосовместимых материалов и обеспечивающие линейную скорость кровотока не более 100 см/с, вызывают минимальную травму клеток крови [Vercaemst L., 2008]. Для снижения выраженности интраоперационного гемолиза в аортальных канюлях (самых узких сегментах экстракорпорального контура) давление капли не должно превышать 100 мм рт. ст., а в венозных дренажах присасывающее давление должно быть менее –40 мм рт. ст. [Cirri S. et al., 2001]. При этом альтерация эритроцитов незначительно выше при использовании вакуумного типа дренажной системы в сравнении с классической гравитационной [Bevilacqua S. et al., 2002].

Известно, что самой травматичной частью аппарата ИК является **коронарный отсос**, и степень гемолиза положительно зависит от скорости его работы и количества аспирированного воздуха [Wright G., 2001]. В связи с этим минимизировать повреждение клеток крови в коронарном отсосе можно, применяя широкие трубки, предотвращая поступление воздуха в катетер и его окклюзию тканями операционной раны. Кроме того, в последние годы разработаны автоматизированные дренажные системы с датчиком, регистрирующим количество

излившейся крови в операционную рану и темп ее поступления (так называемые «интеллектуальные отсосы»). Применение подобных систем позволяет снизить концентрацию свободного гемоглобина в кровотоке на 20% по сравнению с мануальным коронарным отсосом [Wright G., 2001; Vercaemst L., 2008].

Считается, что выраженность гемолиза может значительно возрасти (до 1000 мг/дл и более) при интраоперационном переливании больших объемов донорской эритроцитарной массы и при операциях в условиях глубокой гипотермии, а также несколько увеличиться вследствие аппаратной отмывки дренажной крови. Увеличение длительности ИК, как фактора, включающего в себя комплекс гемолиз-индуцирующих воздействий различных компонентов аппарата, сопровождается линейным ростом концентрации свободного гемоглобина в плазме крови со средней скоростью 15-20 мг/дл×ч [Wright G., 2001; Дементьева И.И. и соавт., 2008; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011].

Таким образом, информация о технических характеристиках модулей аппарата ИК и вычисление динамических показателей потока крови служат основанием для комплектации наименее травматичной перфузионной системы. Однако подобный подход не дает желаемого решения проблемы. Существуют дополнительные факторы, потенцирующие гемолиз, которые не зависят от вида оборудования и методики ИК: тяжелая сопутствующая патология, продолжительная операция или выраженная кровопотеря, обуславливающая проведение многочисленных гемотрансфузий и сепарации излившейся в рану крови [Дементьева И.И. и соавт., 2008; Yazer M.H. et al., 2008; Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B., 2009; Plebani M., Lippi G., 2009]. В этих условиях возникает необходимость удаления из кровотока большого количества свободного гемоглобина и предотвращение развития гемолитических осложнений у ряда пациентов.

1.5.2. Индивидуальный подход к терапии сформировавшейся гемоглобинемии после операций с искусственным кровообращением

С целью редукции гемоглобинемии в настоящее время разработаны способы экстракорпоральной и эндогенной очистки крови от свободного гемоглобина. К таковым относятся традиционные для кардиохирургии методы гемофильтрации и

форсирования диуреза во время ИК [Дементьева И.И. и соавт., 2008; Hei F. et al., 2009]. Последний представляет собой обязательный элемент общепринятой лечебной программы посттрансфузионных гемолитических осложнений, основные принципы которой могут быть применимы и для кардиохирургических больных с массивным гемолизом. Если консервативные меры оказываются недостаточными, то рекомендуется проводить лечебный обменный плазмаферез, как наиболее эффективный способ элиминации свободного гемоглобина из кровотока [Дуткевич И.Г., 2007]. Вместе с тем, переливание больших количеств донорской плазмы создает высокий риск заражения гемотрансмиссивными инфекциями. Поэтому более предпочтительным в условиях ИК является проведение селективной экстракорпоральной очистки крови путем быстропоточной гемофильтрации с использованием крупнопористых фильтров (до 100 кДа), так как обычные гемофильтры имеют диаметр пор 20-50 кДа, что позволяет удалять лишь димеры гемоглобина (около 32 кДа), а не собственно гемоглобин (около 68 кДа) [Glogowski K. et al., 2001; Nitescu N. et al., 2002].

Значимая реверсия гемоглобинемии также достигается путем центрифужной или аппаратной (с помощью Cell Saver) отмывки крови [Nitescu N. et al., 2002]. При этом последняя не влияет на свойства циркулирующих эритроцитов после переливания отмытых клеток, хотя перед инфузией осмотическая стойкость и деформируемость отмытых эритроцитов несколько снижается, особенно при выполнении многократной центрифужной отмывки [Дементьева И.И. и соавт., 2008; Gu Y.J. et al., 2008]. Реинфузия сильно поврежденных клеток крови или необработанной аутокрови с массивным гемолизом в принципе нежелательна [Vercaemst L., 2008; Nakamura K., Kawahito K., 2011].

Современный фармакологический подход в лечении гемолитических осложнений после ИК включает в себя несколько направлений медикаментозного воздействия. Достаточно давно изучается метод стимуляции эндогенных механизмов очищения организма от свободного гемоглобина путем введения экзогенного гаптоглобина, который связывает свободный гемоглобин, обеспечивает его последующую деградацию в клетках РЭС и препятствует фильтрации гемопротеина в почках, улучшая тем самым их функцию [Quimby K.R. et al., 2010; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. При этом профилактическое

назначение гаптоглобина следует проводить с осторожностью, а его терапевтическое введение должно учитывать количество свободного гемоглобина, гаптоглобина и клиренс креатинина во время или после ИК [Glogowski K. et al., 2001; Vercaemst L., 2008].

На роль лечебных препаратов при гемолитических осложнениях также претендуют доноры монооксида азота (NO), предназначенные, с одной стороны, для восполнения дефицита эндогенного NO, с которым связывается свободный гемоглобин, а с другой – для конверсии последнего в метгемоглобин, не взаимодействующий с NO [Vercaemst L., 2008; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Показано, что применение ингаляционного NO снижает гемоглобинемию и легочную гипертензию у больных с гемолитическими анемиями и у пациентов, оперированных с ИК [Reiter C.D. et al., 2002; Ochoa J. et al., 2003; Winterhalter M. et al., 2010]. Между тем, короткое время полужизни NO in vivo (0,05-1,80 мс) ограничивает эффективность ингаляционного NO пределами легочной ткани [Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Этот недостаток устраняется с помощью применения «длительно живущих» нитритов (нитрита натрия), выступающих в роли источника нитрит-аниона (NO_2^-), который рассматривался ранее как инертный продукт окисления NO, но, как оказалось, способен превращаться обратно в NO [Lundberg J.O. et al., 2008; Shiva S., Gladwin M.T., 2009]. Благодаря этому нитриты опосредуют экстрапульмональные эффекты ингаляционного NO, который, следует отметить, обладает меньшими побочными эффектами, чем препараты NO с внутривенным введением [Ochoa J. et al., 2003; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Управление биодоступностью NO также возможно путем применения аргинина (предшественник NO) и цитрулина (предшественник аргинина), однако эффективность подобной терапии еще изучается [Morris C.R. et al., 2003; Luiking Y.C. et al., 2009].

Недавно опубликованы экспериментальные данные о позитивном влиянии очень низких концентраций ингаляционного CO, способного имитировать некоторые эффекты NO (угнетение активации и агрегации тромбоцитов, воспалительного ответа, регуляция сосудистого тонуса) и неспособного, в отличие от NO, реагировать с активными формами кислорода и образовывать высоко реактивный пероксинитрит (ONOO) [Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Другая

попытка влиять на гипертензивный эффект дефицита NO при гемоглобинемии была предпринята N. Sabaа и коллегами (2008), введившими мышам растворимые рецепторы для эндотелина-1, секреция которого в норме подавляется NO. Однако в клинических исследованиях эффективность как первого, так и второго способа коррекции последствий гемолиза еще не доказана [Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011].

Кроме того, помимо доноров NO, терапия осложнений внутрисосудистого гемолиза может осуществляться с помощью хелаторов железа (рекомбинантного человеческого трансферрина и лактоферрина у новорожденных, дефероксамина у взрослых), которые позволяют избежать перегрузки организма железом, участвующим в патогенезе дисфункции почек при ИК [Davis C. et al., 1999]. Для предотвращения внутриканальцевой коагуляции свободного гемоглобина в условиях кислой реакции мочи и профилактики острой почечной недостаточности рекомендуется проводить инфузии бикарбоната натрия, опосредующего защелачивание мочи [Haase M. et al., 2007, 2010]. К тому же замечено, что применение некоторых препаратов (статинов, пентоксифилина, полиэтиленгликоля с молекулярным весом 20 кДа, мелатонина) способно повышать гемолитическую стойкость эритроцитов [Vercaemst L., 2008].

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

1.5.3. Современные проблемы коррекции постперфузионной гемоглобинемии

Несмотря на прогресс современной перфузиологии и кардиохирургии, проблема интраоперационного разрушения эритроцитов во время ИК до сих пор остается открытой, что обусловлено недостатками существующих методик коррекции гемоглобинемии. Так, проведение гемофильтрации снижает уровень гемоглобинемии, но сопровождается удалением из кровотока низкомолекулярных биологически активных субстанций, необходимых для поддержания гомеостаза организма (ионов, глюкозы, аминокислот, альбумина, гуморальных факторов

иммунитета и др.), и создает дополнительную травму клеток крови [Conlisk A.T. et al., 2009]. Форсированный диурез активно выводит свободный гемоглобин из плазмы крови, но ускоряет его поступление в почки, где при высокой концентрации этого белка возможна его преципитация и Fe-зависимое повреждение эпителия почечных канальцев, способствующее развитию острой почечной недостаточности [Haase M. et al., 2010]. К тому же противопоказанием к проведению форсированного диуреза является снижение фильтрационной способности почек и почечная недостаточность у пациента до хирургического вмешательства [Меньшугин И.Н., 1998; Солтоски П.Р. и соавт., 2005].

Инновационная методика использования рекомбинантного гаптоглобина, связывающего свободный гемоглобин, представляет собой достаточно дорогостоящее лечение и, кроме того, не повышает биодоступность NO (комплекс «гемоглобин-гаптоглобин» связывает NO так же, как и свободный гемоглобин) [Azarov I. et al., 2008; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Другой способ лечения гемолиза nitroxyl-донорами или подобными соединениями переводит свободный оксигемоглобин в свободный метгемоглобин, который хотя и не взаимодействует с NO, но обладает высоким сродством к кислороду. К тому же этот процесс окисления гемоглобина сопровождается генерацией активных форм кислорода, что способствует свободнорадикальному повреждению органов пациента [Cheung A. et al., 2007; Shiva S., Gladwin M.T., 2009]. По данным К. Кауа и коллег (2007) применение нитропруссид натрия в качестве донора NO для лечения гемоглобинемии вызывает появление свободного цианида, токсические эффекты которого сочетают энцефалопатию, гипотензию и метаболический ацидоз.

Следует заметить, что негативное влияние внутрисосудистого гемолиза на организм человека не ограничивается только эффектами свободного гемоглобина. Циркулируя в крови, осколки клеточных мембран и внутриэритроцитарный аденозиндифосфат активируют систему гемостаза [Воробьев А.И. и соавт., 2005; Кузник Б.И., 2010]; избыток калия и лактата, освобожденных при гемолизе, существенным образом нарушает электролитный и кислотно-основной баланс крови [Oostendorp M. et al., 2012]. Приходится констатировать, что большинство способов коррекции внутрисосудистого гемолиза направлены лишь на устранение свободного гемоглобина или его эффектов и не способны элиминировать

фрагменты эритроцитарной плазмолеммы и внутриклеточные компоненты эритроцитов из крови (за исключением плазмафереза или отмывания клеток крови).

Таким образом, современная система коррекции гемолиза после операций с ИК включает в себя единые принципы его профилактики и индивидуализированную терапию, но лишена персонифицированного подхода к дооперационному прогнозированию и модуляции гемолитических реакций. Методы терапии уже сформировавшейся гемоглобинемии не позволяют полностью нивелировать последствия внутрисосудистого гемолиза. Возникает необходимость комбинации нескольких терапевтических подходов, направленных на различные звенья патогенетической цепи развития гемолитических осложнений и защиту отдельных органов. В целом это повышает фармакологическую нагрузку на организм пациента, благодаря чему терапия и вторичная профилактика интраоперационного гемолиза становятся комплексными и достаточно сложными. Организм каждого пациента уникален и определенное сочетание каких-либо внутренних факторов может обуславливать различную гемолитическую стойкость эритроцитов при равном травмирующем воздействии аппарата ИК. Не исключено, что важное значение имеют особенности течения основной или сопутствующей патологии у кардиохирургических пациентов, среди которых половину всех больных, оперированных в условиях ИК, составляют лица с коронарной дисфункцией [Крабач Т., Хетцер Р., 2005; Шипулин В.М., Карпов Р.С., 2009; Бокерия Л.А., 2012].

1.6. Общие сведения об ишемической болезни сердца и методах ее лечения

В настоящее время сердечно-сосудистые заболевания занимают в общей структуре смертности населения России 56,8%, и половину этого показателя составляет ишемическая болезнь сердца (ИБС). При этом число умерших от кардиоваскулярной патологии в России в 2 раза превышает уровень аналогичного показателя большинства экономически развитых стран мира, где ИБС страдают от 16% до 20% граждан [Бокерия Л.А., 2003; Манак Н.А., 2003; Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я., 2012; Bryan N.S., 2012]. На территории Томской области заболеваемость острым инфарктом миокарда и количество его летальных исходов

возросли за последние 15 лет с 2,18 и 0,77 до 2,74 и 0,96 соответственно на 1000 жителей [Карпов Р.С. и соавт., 2003], общая заболеваемость болезнями системы кровообращения среди взрослого населения России увеличилась за период 2006-2010 г.г. в среднем на 8,4% [Бокерия Л.А., 2012]. В целом, частота встречаемости коронарной болезни увеличивается с возрастом и зависит от пола: до 50 лет мужчины болеют в 4-5 раз чаще женщин, а после достижения возрастного рубежа 65-70 лет половые отличия нивелируются [Манак Н.А., 2003; Maas A.H., Appelman Y.E., 2010; Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я., 2012].

Сегодня ИБС определяется как заболевание, обусловленное расстройством коронарного кровообращения, приводящим к дисбалансу между потребностью миокарда в кислороде и возможностями его фактического поступления через коронарное русло. Многоликие проявления данной патологии от ярко выраженной клиники до безболевой ишемии миокарда определяют наличие различных клинических форм заболевания. При этом нарушение перфузии миокарда может быть результатом атеросклероза венечных артерий, их спазма или тромбоза. В 80% случаев нарушение кровоснабжения сердца обуславливается атеросклеротическим поражением коронарных сосудов [Манак Н.А., 2003; Шевченко Н.М., 2004; Воробьева Е.Н. и соавт., 2006].

1.6.1. Современный взгляд на этиологию и патогенез атеросклероза

Атеросклероз (от греческого «athere» – каша, «skleros» - твердый), как самостоятельная нозологическая форма, был выделен F. Marchand в 1904 году из группы заболеваний под общим названием артериосклероз, характеризующихся уплотнением и утолщением стенки артерий [Волков В.И., 2002; Grundtman C., Wick G., 2011]. Исторически были сформулированы несколько концепций атерогенеза, выделяющих ведущее патогенетическое звено и допускающее комплексное воздействие нескольких неблагоприятных факторов.

Среди теорий атеросклероза наиболее известны: комбинационно-инфильтрационная теория Н.Н. Аничкова [Maahs D.M. et al., 2008; Климов А.Н. и соавт., 2012; Fogelstrand P., Borén J., 2012], концепция гипергомоцистеинемии [Ross R., 1999; Sandoo A., et al., 2010; Steed M.M., Tyagi S.C., 2011], перекисная теория [Климов А.Н. и соавт., 2003; Алекперов Э.З., Наджафов Р.Н., 2010; Peluso I. et al.,

2012], гипотеза иммунокомплексного повреждения эндотелия вследствие продукции аутоантител против модифицированных липопротеинов низкой плотности (мЛПНП) [Климов А.Н. и соавт., 2003; Ohashi R. et al., 2004; Пигаревский П.В. и соавт., 2005; Климов А.Н., Денисенко А.Д., 2007; Наджафов Р.Н., 2010; Grundtman C., Wick G., 2011]. Также рассматриваются тромбогенная концепция атеросклероза [Прокопчук В.С., 2002; Кузник Б.Н., 2010], гипотеза внутриклеточного дефицита полиеновых жирных кислот (ω -3, ω -6 и ω -9) [Титов В.Н., 2009; Титов В.Н., Дугин С.Ф., 2010] и структурно-функционального блока апопротеина-B-100 [Fogelstrand P., Borén J., 2012], а также моноклональная (опухолевая) [Murry C.E. et al., 1997; Jiang J. et al., 2011] и инфекционная гипотезы атерогенеза [Карпов Ю.А., Сорокин Е.В., 2001; Ohashi R. et al., 2004; Пигаревский П.В. и соавт., 2005; Dumrese C. et al., 2005; Chatzidimitriou D. et al., 2012].

В числе многочисленных факторов риска атеросклеротического поражения значится артериальная гипертензия, сопровождающаяся нарастанием напряжения сдвига в сосудах и появлением турбулентного тока крови в участках бифуркации артериального русла. Гемодинамическая нагрузка разупорядочивает эндотелиоциты в пласте, инициируя их альтерацию и активацию. Формирование эндотелиальной дисфункции потенцируется ангиотензином II, который опосредует пролиферацию гладкомышечных клеток и миграцию моноцитов [Воробьева Е.Н. и соавт., 2006; Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., 2009; Pan S., 2009; Партигулова А.С., Наумов В.Г., 2010; Giannoglou G.D. et al., 2010].

К другим традиционным факторам риска атеросклероза относят пол, возраст, курение, регулярное психоэмоциональное перенапряжение, избыточный вес, гиподинамию, сахарный диабет и отягощенную наследственность [Grundtman C., Wick G., 2011; Pansuria M. et al., 2012]. В качестве наследуемых предрасполагающих факторов рассматриваются как полиморфизм генов NO-синтетазы и НАДФН-оксидазы (контролирует генерацию O_2^- и далее вторичных АФК) [Воробьева Е.Н. и соавт., 2006; Кузнецова Т.Ю. и соавт., 2008], так и генетически детерминированный повышенный уровень гомоцистеина [Ross R., 1999; Шляхто Е.В. и соавт., 2004; Steed M.M., Tyagi S.C., 2011], уровень ингибитора активатора плазминогена [Шляхто Е.В. и соавт., 2004], экспрессии и

функциональной активности рецепторов к апопротеину-B-100, конформации самого апопротеина-B-100 [Зайкина А.А. и соавт., 2008; Титов В.Н., 2009].

Таким образом, большинство теорий атеросклероза можно объединить в концепцию реакции сосудистой стенки на повреждение эндотелия. Атерогенез начинается с нарушения целостности мембраны эндотелиоцита, что является триггером повышения секреции вазоконстриктора эндотелина-1 и недостаточного образования вазодилататора NO [Воробьева Е.Н. и соавт., 2006; Sandoo A. et al., 2010; Steed M.M., Tyagi S.C., 2011]. Монооксид азота в норме угнетает продукцию гладкомышечными клетками белка хемотаксиса моноцитов и ингибирует нуклеарный фактор κB (NF- κB), через активацию которого запускается транскрипция провоспалительных цитокинов IL-1, -6, -8, TNF- α и адгезивных молекул E-селектина, VCAM-1, ICAM-1 [Шляхто Е.В. и соавт., 2004; Алекперов Э.З., Наджафов Р.Н., 2010; Tousoulis D. et al., 2011]. В то же время вазопрессор эндотелин-1 обладает выраженной митогенной активностью в отношении гладкомышечных и эндотелиальных клеток, усиливая экспрессию адгезивных молекул на них [Воробьева Е.Н. и соавт., 2006]. Доминирование вазоконстрикторного потенциала обуславливает гипертензию, высокое напряжение сдвига и турбулентность тока крови, что вызывает депрессию синтеза NO, который образуется эндотелиальными клетками в условиях ламинарного тока крови [Лутай М.И., 2004; Марков Х.М., 2009; Sandoo A., et al., 2010]. При этом адекватная продукция NO может подавляться его эндогенным ингибитором – асимметричным диметиларгинином (при гиперлипидемии, сахарном диабете, у курящих), или свободными радикалами, которые являются своеобразными ловушками для молекул NO (при курении, гиперхолестеролемии, гипертензии) [Cerwinka W.H. et al., 2003; Лутай М.И., 2004; Surdacki A., 2008; Steed M.M., Tyagi S.C., 2011].

Локальное нарушение гомеостаза с провоспалительным сдвигом потенцируется фиксацией в интиме мЛПНП крови и/или нативных ЛПНП, которые под действием активных форм кислорода (АФК), липидных пероксидов и некоторых ферментов нейтрофилов, эндотелиальных клеток и макрофагов утрачивают нативную структуру [Ludewig B., Laman J.D., 2004; Титов В.Н., 2009; Титов В.Н., Дугин С.Ф., 2010; Steed M.M., Tyagi S.C., 2011; Martinet W. et al., 2012]. Модифицированные ЛПНП активируют систему комплемента и связывание

поверхностного белка моноклеаров с его лигандом на эндотелиоцитах (система CD40-CD40L) [Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., 2009], после чего усиливается экспрессия эндотелием молекул адгезии: Е-селектина, ICAM-1 и особенно VCAM-1 [Алекперов Э.З., Наджафов Р.Н., 2010]. Последняя взаимодействует только с агранулоцитами крови, благодаря чему формируется преимущественно моноклеарный инфильтрат бляшки [Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., 2009; Grundtman С., Wick G., 2011]. При этом в зоне начальных изменений Т-лимфоциты составляют большую часть инфильтрата и в основном представлены CD8⁺ клетками, а в зрелых бляшках – меньшую с преимущественным участием CD4⁺ клеток [Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., 2009; Кузник Б.Н., 2010].

Следует сказать, что мЛПНП обладают прямым (индукция синтеза хемоаттрактантов для моноцитов и нейтрофилов, IL-1 β и других цитокинов) и опосредованным (поглощение макрофагами и гладкомышечными клетками мЛПНП и их комплексов с аутоантителами) провоспалительным действием [Лутай М.И., 2004; Ludewig В., Laman J.D., 2004; Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., 2009; Libby Р., 2012; Martinet W. et al., 2012]. Активированные макрофаги после фагоцитоза мЛПНП секретируют провоспалительные цитокины IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α и свободные радикалы, повреждающие тканевые структуры интимы сосудов и модифицирующие ЛПНП, но этерифицированные холестерином полиеновые жирные кислоты в фагоцитах не гидролизуются и, накапливаясь, формируют пенистые клетки [Лутай М.И., 2004; Воробьева Е.Н. и соавт., 2006; Нагорнев В.А., Пигаревский П.В., 2009; Титов В.Н., 2009; Ait-Oufella Н. et al., 2009]. Воспалительную реакцию в сосудистой стенке сдерживают противовоспалительные стимулы: трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), IL-4, IL-10, рецепторный антагонист IL-1 (IL-1ra), липопротеины высокой плотности, монооксид азота NO [Grainger D.J., 2004; Ait-Oufella Н. et al., 2009; Murphy A.J., et al., 2009; Wong В.W. et al., 2012]. Между тем, содержание ЛПВП, транспортирующих холестерин от тканей в печень, при атеросклерозе снижается по отношению к ЛПНП [Murphy A.J. et al., 2009], а эндотелиоциты продуцируют NO в недостаточных количествах, что обеспечивает доминирование провоспалительного начала [Марков Х.М., 2009; Sandoo A., et al., 2010; Tousoulis D. et al., 2011].

Таким образом, провоспалительные стимулы различного происхождения опосредуют усиление цитотоксичности моноцитов/макрофагов, благодаря генерации АФК и высвобождению деструктивных металлопротеиназ [Алекперов Э.З., Наджафов Р.Н., 2010; Азизова О.А. и соавт., 2011; Steed M.M., Tyagi S.C., 2011; Libby P., 2012]. Повреждение и дисфункция эндотелия обеспечивают внутриинтимальную фиксацию ЛПНП в стенке артерий, где создается очаг иммунного воспаления, поддерживаемый, вероятно, саморегуляцией. При этом гиперадгезивность эндотелия в комплексе с продукцией хемоаттрактантов обеспечивает поступление в очаг новых клеток, которые под влиянием гуморальных факторов активируются и включаются в патологический процесс, замыкая порочный круг [Ross R., 1999; Карпов Ю.А., Сорокин Е.В., 2001; Лутай М.И., 2004; Воробьева Е.Н. и соавт., 2006; Grundtman C., Wick G., 2011]. Хронический неспецифический воспалительный процесс в интима сосуда играет существенную роль, как в образовании самой атеросклеротической бляшки, так и в дестабилизации атеромы с последующей тромботической окклюзией и развитием сердечно-сосудистых осложнений [Карпов Ю.А., Сорокин Е.В., 2001; Ait-Oufella H. et al., 2009; Libby P., 2012]. Учитывая сложность патогенеза заболевания, его длительное бессимптомное течение и социальную значимость, перед современной кардиологией остро стоит проблема своевременного и адекватного лечения ИБС.

1.6.2. Основные принципы хирургического лечения ишемической болезни сердца

Ввиду отсутствия единой теории атеросклероза, приходится констатировать, что на сегодняшний день не существует универсальной этиотропной терапии заболевания и лечение ИБС остается симптоматическим (дислипотеинемия – это симптом, а не причина болезни) [Богопольская О.М., 2007; Liu Y., Chen K.J., 2012]. Морфофункциональные изменения коронарного русла клинически манифестируют приступами ишемии сердечной мышцы, возникающими вследствие дисбаланса между потребностью миокарда в кислороде и его доставкой. Поэтому комплекс терапевтических мероприятий по коррекции подобных нарушений может быть ориентирован на улучшение венозного кровотока в ишемизированных зонах либо на уменьшение работы сердца, а,

следовательно, кислородно-метаболической потребности миокарда [Оганов Р.Г., Погосова Г.В., 2007; Рустамова Я.К. и соавт., 2008; Arrebola-Moreno A. et al., 2011]. Медикаментозное лечение ИБС реализуется, главным образом, по последнему принципу, снижая сердечную пред- и постнагрузку, инотропную функцию сердца, и лишь незначительно улучшает перфузию миокарда [Манак Н.А., 2003; Arrebola-Moreno A. et al., 2011; Bryan N.S., 2012].

Появление высокоэффективных препаратов и схем лечения (Национальные рекомендации, 2011) способствовало стабилизации состояния и клиническому улучшению у многих пациентов с ИБС [Шевченко Ю.Л. и соавт., 2003; Tousoulis D. et al., 2011; Connolly M., Menown I.B., 2013]. При комплексной медикаментозной терапии можно сократить временной интервал между ангинозными приступами и отсрочить декомпенсацию. Однако это способствует некоторому «утяжелению» состояния больных в виду неизбежного появления осложненных форм заболевания — инфаркта, аневризм левого желудочка, дефектов межжелудочковой перегородки, сердечной недостаточности. Фармакотерапия представляет собой своеобразный «обман» сердца за счет перевода его на более выгодный энергетический режим [Шевченко Ю.Л. и соавт., 2003; Ольбинская Л.И., Морозова Т.Е., 2003; Aziz E.F., et al., 2010]. Кроме того, 10-25% больных ИБС остаются резистентными к терапии, даже при ее подборе путем функциональных тестов [Лякишев А.А., 2007; Соляник Е.В., 2011; Connolly M., Menown I.B., 2013]. Поэтому многие авторы считают, что изолированное поражение даже одной коронарной артерии должно подвергаться хирургической коррекции, так как в случае инфаркта часть сердечной мышцы превращается в рубец, реваскуляризация которого практически не улучшает здоровья пациента [Белов Ю.В., Богопольская О.М., 2000; Шевченко Ю.Л. и соавт., 2003]. Клинические данные констатируют 50% регрессию смертности в течение 5 лет у больных после коронарного шунтирования, в отличие от пациентов с медикаментозной терапией, а в течение 2 лет после реваскуляризации миокарда при трехсосудистым поражении — в 5,5 раза, при двухсосудистом — в 1,8 и однососудистом — в 1,3 раза [Метелица В.И., Оганов Р.Г., 2000; Тепляков А.Т. и соавт., 2003; Сейидов В.Г. и соавт., 2007; Kurlansky P., 2012].

Хирургическая реваскуляризация миокарда решает задачу нормализации коронарной перфузии [Шевченко Ю.Л. и соавт., 2003; Сейидов В.Г. и соавт., 2007; Portoghese M. et al., 2012; de la Torre Hernández J.M. et al., 2013]. Современная кардиохирургия располагает несколькими методами оперативного лечения ИБС: чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика (ЧТКА) со стентированием и без такового [Маслов Л.Н., 2007; Ардашев А.В. и соавт., 2008; Бокерия Л.А. и соавт., 2009; Connolly M., Menown I.B., 2013], ротационная атерэктомия и лазерная реваскуляризация миокарда [Бокерия Л.А., Темирова Э.Ю., 2011; Sulimov D.S. et al., 2013], шунтирование коронарных артерий [Метелица В.И., Оганов Р.Г., 2000; Манак Н.А., 2003; Сейидов В.Г. и соавт., 2007; Бокерия Л.А., 2012; Portoghese M. et al., 2012].

Коронарное шунтирование (КШ), наряду с ЧТКА, принадлежит к наиболее популярным методам реваскуляризации миокарда. Отличаясь от ЧТКА несколько большим периодом госпитализации пациентов, процентом периоперационных осложнений и внутригоспитальной смертности (1-5%), КШ становится операцией выбора при многососудистом поражении и дает более стойкие результаты: реже беспокоит стенокардия, уменьшается потребность в антиангинальных препаратах и повторных операциях (в 4-5 раз), хотя риск последних выше [Тепляков А.Т. и соавт., 2003; Сейидов В.Г. и соавт., 2007; Олофинская И.Е., 2008; Бокерия Л.А. и соавт., 2009; Dzierwa K. et al., 2011; Osnabrugge R.L., 2012; de la Torre Hernández J.M. et al., 2013].

Суть коронарного шунтирования заключается в наложении анастомозов между аортой и венечной артерией дистальнее атеросклеротического дефекта. В качестве шунтов применяют аутовены с нижней конечности (обычно большая подкожная вена) или собственные артерии пациента (внутренние грудные артерии, реже правая желудочно-сальниковая, лучевая или нижняя надчревная артерия) [Шевченко Ю.Л. и соавт., 2003; Коваленко О.А., Ирасханов А.К., 2012; Portoghese M. et al., 2012]. Предпочтительнее использование артериального трансплантата, так как интима венозной стенки, не приспособленной к повышенному давлению, со временем подвергается гиперплазии, что становится причиной закрытия 50-60% венозных шунтов в течение 10 лет после операции, в то время как 90% артериальных анастомозов при постоянном профилактическом приеме аспирина

остаются проходимыми [Арзикулов Т.С. и соавт., 2003; Тепляков А.Т. и соавт., 2003; Шевченко Ю.Л. и соавт., 2003; Чвоков А.В. и соавт., 2011; Коваленко О.А., Ирасханов А.К., 2012].

Традиционно шунтирование коронарных артерий выполняется на «сухом» остановленном сердце путем срединной стернотомии, при этом функцию жизнеобеспечения берет на себя аппарат ИК. Главное преимущество прямой реваскуляризации миокарда в условиях ИК — это возможность выполнения сочетанных операций, таких как пластика и резекция аневризмы аорты и левого желудочка, коррекция дефекта межжелудочковой перегородки и клапанной дисфункции и др. [Метелица В.И., Оганов Р.Г., 2000; Portoghesi M. et al., 2012]. В случаях, когда отсутствует потребность в дополнительном хирургическом вмешательстве на камерах сердца, возможно проведение минимально инвазивного КШ в условиях ИК (без открытия грудной клетки с периферическим подключением аппарата ИК, с минимизацией доступа путем торакотомии, с применением голос-контролируемого робота) или без использования ИК на работающем сердце (техника «Off-pump») [Бранд Я.Б. и соавт., 2002; Тепляков А.Т. и соавт., 2003; Подкаменный В.А., 2006; Portoghesi M. et al., 2012; Marui A. et al., 2012].

Важно отметить, что в настоящее время наметилась тенденция к распространению метода КШ «Off-pump», для обеспечения которого применяются локальные стабилизаторы миокарда [Тепляков А.Т. и соавт., 2003; Marui A. et al., 2012; Tashiro T. et al., 2013]. Отказ от экстракорпоральных технологий позволяет существенно уменьшить травматичность и время операции, гепаринизацию крови, а значит кровопотерю и потребность в гемотрансфузиях, предотвратить эмболию органов при канюляции аорты и снизить миокардиальное повреждение. Отсутствие перфузионной травмы клеток крови и внутрисосудистого гемолиза минимизирует риск формирования острой почечной, легочной, печеночной недостаточности и нарушений мозгового кровообращения, потенцированных снижением биодоступности NO при его взаимодействии со свободным гемоглобином [Бранд Я.Б. и соавт., 2002; Арзикулов Т.С. и соавт., 2003; Карпов Р.С. и соавт., 2003; Rastan A.J. et al., 2005]. Кроме того, реваскуляризация миокарда на работающем сердце становится доступна для пациентов, которым ИК было противопоказано в

виду низкой фракции сердечного выброса, сопутствующей онкопатологии, инсулинзависимого сахарного диабета, хронической почечной недостаточности [Бранд Я.Б. и соавт., 2002; Казанчан П.О. и соавт., 2011; Marui A. et al., 2012].

При всех достоинствах хирургии коронарных сосудов метод «Off-pump» неприемлем в случае слабо развитого коллатерального кровообращения стенозированной артерии, ее интрамиокардиальной локализации и диффузном атеросклеротическом поражении в месте предполагаемого анастомоза, необходимости проведения сочетанных операций [Шабалкин Б.В. и соавт., 2001; Portoghesi M. et al., 2012]. Теоретически возможная визуализация любого сосуда практически не всегда реализуется, так как попытки экспозиции артерий задней и боковой поверхности сердца путем его ротации и/или дислокации в сагиттальной плоскости существенно нарушают геометрию желудочков и общую гемодинамику [Бранд Я.Б. и соавт., 2002; Tashiro T. et al., 2013]. Кроме того, техника «Off-pump» требует высокой квалификации и динамичного взаимодействия кардиохирурга с анестезиологом, осуществляющим активный контроль сердечного выброса и локальной ишемии миокарда [Шабалкин Б.В. и соавт., 2001; Казанчан П.О. и соавт., 2011; Tashiro T. et al., 2013]. Это налагает жесткие ограничения на, в общем, менее травматичный и перспективный способ прямой реваскуляризации миокарда.

Таким образом, оперативное лечение ИБС обладает большей эффективностью по сравнению с медикаментозной терапией, а КШ на остановленном сердце является самым распространенным и эффективным методом хирургической коррекции коронарного русла. Между тем, периоперационный риск манипуляций на остановленном сердце повышен и связан, главным образом, с использованием экстракорпоральных технологий, а также зависит от физического статуса пациента накануне операции [Веснина Ж.В. и соавт., 2004; Подкаменный В.А., 2006; Бокерия Л.А. и соавт., 2007; de la Torre Hernández J.M. et al., 2013]. Принимая во внимание данный факт, тяжесть гемолитических осложнений после ИК и выраженность постперфузионного гемолиза, несомненно, должны определяться гемолитической стойкостью эритроцитов на момент хирургического вмешательства. Наряду с этим, структурно-метаболические свойства эритроцитов при различных патологических процессах и состояниях подвержены существенной модуляции [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Кравец Е.Б. и соавт., 2010], что имеет

важное значение у больных ИБС, страдающих в силу своего возраста широким спектром сопутствующих заболеваний [Сигаев И.Ю. и соавт., 2008].

1.6.3. Состояние периферического звена эритрона, предшествующее хирургической реваскуляризации миокарда

В настоящее время уже доказано, что такая высокоспециализированная клетка, как эритроцит, вовлекается в патологический процесс не только при гематологических заболеваниях, но и претерпевает серьезные изменения структуры и функции при болезнях разного генеза [Новицкий В.В. и соавт., 2004; 2006]. Поэтому важно понимать, что выполнение операций КШ в условиях ИК осуществляется на фоне предсуществующих структурно-метаболических перестроек в клетках красной крови, уже сформированных в процессе эволюции коронарного атеросклероза.

Доподлинно известно, что для больных ИБС свойственно высокое содержание холестерина (ХС) в мембране эритроцитов (вследствие дислипидотеинемии) и изменение фосфолипидного (ФЛ) и жирнокислотного спектра последней: уменьшение содержания полиненасыщенных жирных кислот и фосфатидилхолина (ФХ) при увеличении доли фосфатидилсерина (ФС) и соотношения ХС/ФЛ. Это обуславливает нарушение стабильности и структурной организации эритроцитарных мембран, характеризующееся повышением микровязкости липидного бислоя, текучести зон белок-липидных контактов (анулярных липидов), увеличением уровня структурных перестроек мембранных белков и повышением полярности внутренних гидрофобных областей мембраны [Новицкий В.В. и соавт., 2003, 2004; Васильева Е.М., 2005; Коновалова Т.Т., Смирнова И.П., 2005; Lausada N.R. et al., 2007; Свирко Ю.С., 2008; Кравец Е.Б. и соавт., 2010; Чанг Н.Т., 2012]. Дезорганизация эритроцитарной мембраны потенцируется значительным усилением процессов липопероксидации в сочетании с депрессией антиоксидантного потенциала эритроцитов, которые связаны с угнетением активности СОД, каталазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, Г-6-ФДГ и снижением уровня восстановленного глутатиона, числа белковых SH-групп и α -токоферола в эритроцитах [Давыдкин И.Л., Фаттенков В.Н., 2001; Медведева И.В. и соавт., 2002; Мартинович Г.Г. и соавт.,

2008; Dandana A. et al., 2011]. Возрастает скорость химического окисления гемоглобина, а, следовательно, содержание метгемоглобина и мембраносвязанного гемоглобина в эритроцитах [Кленова Н.А., Фатенков О.В., 2004]. Логическим итогом нарушения липидной фазы мембраны эритроцитов и модификации ее белковых структур является дисфункция Ca^{2+} -АТФазы и Na^+/K^+ -АТФазы. Степень выраженности последней зависит от типа гиперлипидемии и нарастает с увеличением тяжести заболевания, как и соотношение ХС/ФЛ, являясь причиной прогрессивного углубления ионного дисбаланса клетки [Новицкий В.В. и соавт., 2003; Васильева Е.М., 2005; Коновалова Т.Т., Смирнова И.П., 2005; Новицкий В.В. и соавт., 2006; Чанг Н.Т., 2012].

Кроме того, установлена взаимосвязь содержания ХС в мембране эритроцитов со степенью их анизоцитоза, величина которого является надежным независимым предиктором смертности у больных с ИБС [Larré J.M. et al., 2011; Tziakas D. et al., 2012]. Известно, что размер и форма эритроцитов являются важными факторами поддержания структуры потока крови в коронарных сосудах. Нарушения архитектоники мембраны эритроцитов при ИБС проявляются увеличением количества трансформированных клеток за счет увеличения численности субпопуляций переходных форм клеток (эллипсы, плоские диски, дискоциты с одним выростом, с гребнем, с множественными выростами, эритроциты в виде тутовой ягоды), а также необратимо измененных предгемолитических (сферические, куполообразные эритроциты и эритроциты в виде спущенного мяча) и дегенеративных форм красных клеток крови [Новицкий В.В. и соавт., 2003; Юсипович Ф.И. и соавт., 2008]. По сравнению со стабильным течением ИБС у больных с острым инфарктом миокарда увеличивается содержание ХС в мембране эритроцитов и число необратимо деформированных клеток (стоматоцитов, сфероцитов и дегенеративных форм), повышается их агрегируемость [Березин М.В. и соавт., 2006; Шилов А.М. и соавт., 2008; Юсипович А.И. и соавт., 2008; Ганелина И.Е. и соавт., 2011; Tziakas D.N. et al., 2011]. Выраженность этих изменений возрастает с глубиной поражения миокарда [Березин М.В. и соавт., 2006; Mullasari A.S. et al., 2011].

Интересным является тот факт, что в настоящее время предполагается участие эритроцитов в патогенезе атеросклероза и эволюции атеромы. Известно,

что в процессе атерогенеза происходит ремоделирование сосудистой стенки, включающее ее неоваскуляризацию в области формирования бляшки, ядро которой содержит высокореактивную среду, что способствует микрокровоизлияниям в нее из vasa vasorum [Mause S.F., Weber C., 2009]. Поступившие в атерому эритроциты, с одной стороны, фагоцитируются макрофагами, усиливая накопление ХС (в эритроцитах его в 1,5-2 раза больше, чем в других клетках организма), а с другой – привлекают нейтрофилы в очаг атероматоза, так как несут на своей поверхности IL-8 [Pasterkamp G., Daemen M., 2008]. При этом уровень IL-8, связанного с мембраной эритроцитов, у больных с нестабильной стенокардией выше, чем при стабильной форме [Tziakas D.N. et al., 2008]. В-третьих, распад эритроцитов в условиях высокореактивной среды атеромы ведет к освобождению гемоглобина, который под влиянием гидропероксидов липидов и пероксида водорода, образуемого фагоцитами, окисляется до метгемоглобина (Fe^{3+}) и феррилгемоглобина (Fe^{4+}). Первый легко теряет глобин, после чего гидрофобный гем внедряется в липидное ядро атеромы, где освобождает железо, которое в качестве иона с переменной валентностью обусловливает дальнейшее окисление липидов атеросклеротической бляшки. Второй – стимулирует эндотелиоциты к экспрессии адгезивных белков для лейкоцитов и, являясь нестабильным веществом, быстро восстанавливается до метгемоглобина, акцептируя электрон с тирозина α -цепи глобина. Это приводит к образованию тирозильного радикала в молекулах гемоглобина, их взаимодействию, формированию поперечных сшивок и мультимеров гемоглобина, наличие которых свидетельствует о том, что гидропероксид-опосредованное окисление липидов гемоглобином происходит в пределах повреждения [Vollard N.B. et al., 2005; Reeder B.J. et al., 2008; Nagy E. et al., 2010]. Последнее, наряду с обнаружением в бляшках гликофорина А, экспрессируемого исключительно эритроидными клетками, и положительной корреляцией содержания ХС в мембране эритроцитов с объемом атеромы, подтверждает участие клеток красной крови в процессе атерогенеза [Pasterkamp G., Daemen M., 2008; Giannoglou G.D. et al., 2009].

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

неспецифической клеточной реакции на повреждение. Недавние исследования показали, что независимо от патологии этиологические факторы дисфункции эритроидных клеток инициируют универсальные механизмы их повреждения – это дефицит энергопродукции, интенсификацию процессов свободнорадикального окисления и нарушение ионного гомеостаза клетки [Рязанцева Н.В., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; 2006; Geetha A. et al., 2007; Krzystek-Korpacka M. et al., 2010].

Окислительная модификация мембранных структур и внутриклеточных белков эритроцитов сопровождается изменением механических свойств мембраны и эритроцитов в целом. Низкая деформируемость последних способствует их разрушению в сосудах микроциркуляции и кроверазрушающих органах. При этом активация ПОЛ играет роль триггерного механизма, обеспечивающего доступность липидно-белковых компонентов мембраны эритроцита соответственно для фосфолипаз и протеаз. Далее повреждение мембраны и ионный дисбаланс усугубляют дефицит энергии, обусловленный свободнорадикальной модификацией ферментов гликолиза [Новицкий В.В. и соавт., 2006; Елкина Н.М. и соавт., 2011]. Кроме того, уменьшение содержания макроэргов в эритроцитах сопровождается накоплением в клетках ионов Ca^{2+} , так как снижение уровня АТФ приводит к выключению ионных насосов и диффузии ионов Ca^{2+} из межклеточной среды. Накопление в эритроцитах ионов Ca^{2+} запускает активацию Ca^{2+} -зависимых фосфолипаз и протеаз, приводящих к дальнейшему нарушению структуры мембраны и повышению ее проницаемости, изменению метаболизма, ионного гомеостаза клетки, ее формы и функции [Новицкий В.В. и соавт., 2000; Ветчинникова О.Н. и соавт., 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2003; Новицкий В.В. и соавт., 2006; Шилов А.М. и соавт., 2008; Belosludtsev K.N. et al., 2010].

Неспецифические признаки вовлечения эритроцитарной мембраны в патологический процесс характеризуются снижением продолжительности жизни эритроцитов, которое сопряжено с нарушениями фосфолипидного спектра мембраны, снижением ее эластичности и метаболическими расстройствами, уменьшением содержания высокомолекулярных полипептидов, увеличением доли низкомолекулярных белков, а также дезорганизацией поверхностной архитектоники эритроцитов [Новицкий В.В. и соавт., 2004, 2006; Шилов А.М. и

соавт., 2008; Крылов В.Н. и соавт., 2010]. В крови увеличивается доля трансформированных форм красных клеток на фоне снижения содержания нормальных двояковогнутых дискоцитов, появление эндовизикул на мембране и (или) в примембранном пространстве клетки, а также отмечается агрегация белков [Новицкий В.В. и соавт., 2003].

Между тем, наряду с неспецифическими изменениями структурно-метаболического статуса эритроцитов при патологиях различного генеза наблюдаются и некоторые особенности механизмов их реализации, ассоциированные с клиническим течением различных заболеваний, что актуально для пациентов с ИБС, имеющих сопутствующую патологию. Так, у больных **сахарным диабетом** неспецифическая дисфункция эритроцитов потенцируется хронической гипергликемией, которая индуцирует процессы свободнорадикального окисления и гликозилирование различных белков клетки, что лежит в основе угнетения деятельности ион-транспортирующих систем, гликолитических и антиоксидантных ферментов [Новицкий В.В., и соавт. 2003; Лагутина А.А. и соавт., 2004; Новицкий В.В., и соавт. 2006; Науменко В.Г., 2007; Шилов А.М. и соавт., 2008]. При **гипотиреозе** отмечается нарастание полиморфизма циркулирующей эритроцитарной популяции клеток, что является признаком ускоренного старения зрелых циркулирующих эритроцитов при недостатке гормонов щитовидной железы [Новицкий В.В., 2003]. **Гипертиреоз** ассоциирован с усилением ПОЛ и дефицитом восстановленного глутатиона в эритроцитах на фоне активации ферментов антиоксидантной защиты клетки [Messarah M. et al., 2011].

Эндогенная интоксикация вследствие **механической желтухи** сочетается с уменьшением радиуса центрального углубления эритроцитов, увеличением размеров и количества пор на их мембране и неравномерностью бифосфолипидного слоя, что коррелирует с длительностью желтушного периода [Завада Н.В. и соавт., 2008]. Прогрессирование **хронической почечной недостаточности** во времени усугубляет степень морфологической трансформации эритроцитов (преимущественно сфероцитарную), микроцитоз и анемию, обеднение эритроцитарной мембраны ФЛ и ХС, нарастание фракции лизофосфолипидов и ригидности клеток [Ветчинникова О.Н. и соавт., 2005; Толстоухова Н.В., 2009].

При **пороках клапанов сердца** гипоксия, прогрессирующая в условиях нарастающей недостаточности кровообращения, обуславливает активацию эритропоэза и поступление в кровоток качественно неполноценных клеток, которые сравнительно быстро погибают в условиях аномального кровотока в области патологически измененных клапанов, а также под действием токсинов и ферментов стрептококка [Новицкий В.В. и соавт., 2003]. Длительная **персистенция вирусных инфекций** также сопровождается неспецифическими изменениями структурно-метаболического статуса эритроцитов, которые, однако, наблюдаются не только на фоне клинической манифестации инфекции, но и в отсутствие таковой [Новицкий В.В. и соавт., 2003; Токарева Н.В., 2004]. При **психопатологии** признаки неспецифической дисфункции эритроцитов наиболее выражены при шизофрении, в меньшей степени – при экзогенно обусловленной умственной отсталости и еще менее – при невротических расстройствах [Рязанцева Н.В., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Кутько И.И. и соавт., 2008]. Даже **физиологическое старение** человека сопровождается дезорганизацией липидного (и белкового) компонента эритроцитарной мембраны, аналогичной таковой при психических расстройствах старческого возраста – болезни Альцгеймера и сосудистой деменции, что связано с активацией фосфолипаз A₂ и D [Кублинская М.М., 2002].

Таким образом, значительная модификация структурно-метаболических и функциональных свойств эритроцитов на фоне ИБС и патологий иного генеза не вызывает сомнения. Подобные расстройства периферического звена эритрона накануне операций с ИК могут обуславливать высокую подверженность эритроцитов к деструкции во время экстракорпорального кровообращения. Между тем, многочисленные ограничения альтернативных способов реваскуляризации миокарда не позволяют полностью отказаться от использования аппаратов ИК. Более того, в России число операций с ИК в 3 раза ниже их необходимого количества (300 операций на 1 млн населения), в связи с чем численность подобных вмешательств и клиник, осуществляющих таковые, в настоящее время прогрессивно увеличивается (за последние 5 лет на 29,3%) [Тепляков А.Т. и соавт., 2003; Бокерия Л.А., 2012]. При этом в мире ежегодно выполняется более 800 тыс. операций КШ, из которых более 80% – с применением ИК [Шипулин В.М., Карпов Р.С., 2009]. Данное обстоятельство определяет необходимость поиска подходов,

снижающих тяжесть постперфузионных расстройств, среди которых важную роль играют гемолитические осложнения как явного, так и скрытого характера, потенцирующие дисфункции различных органов. Однако современные способы коррекции интраоперационного гемолиза несовершенны. Концепция управления выраженностью гемоглобинемии после операций с ИК включает в себя единые принципы ее профилактики и индивидуализированную терапию, но лишена персонифицированного подхода к превентивному лечению таковой. Отдельные сведения о влиянии ряда медикаментов на гемолитическую стойкость эритроцитов имеются, но не установлены категории кардиохирургических больных, для которых подобные препараты оказались бы эффективны в отношении редукции гемоглобинемии.

В связи с этим, изучение механизмов, лежащих в основе формирования выраженной и умеренной гемоглобинемии у пациентов, оперированных с использованием идентичного перфузиологического оборудования, позволит установить роль нарушений структурно-метаболического статуса эритроцитов и исходного состояния пациента в патогенезе массивного гемолиза после операций с ИК, а также идентифицировать его факторы риска. Результаты исследования послужат основой для создания более совершенной программы первичной профилактики и прогнозирования гемолитических расстройств у кардиохирургических больных, что уменьшит вероятность и тяжесть гемолиз-опосредованных осложнений в раннем послеоперационном периоде, облегчит реабилитацию пациентов и сократит сроки их пребывания в стационаре.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

2.1.1. Общая характеристика больных ишемической болезнью сердца и операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения

Обследовано 150 больных (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 (КШ) в условиях искусственного кровообращения (ИК). Перед хирургическим вмешательством 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, проф. Р.С. Карпов; руководитель отделения – Заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, проф. 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, в некоторых случаях – сцинтиграфии и эмиссионной компьютерной томографии миокарда. При наличии гемодинамически значимого стеноза двух и более коронарных артерий (более 75% от площади сечения сосуда) и/или полной окклюзии ствола левой коронарной артерии принималось решение об операции КШ.

Премедикация осуществлялась двукратно (вечером в 23 ч накануне операции и утром в 8 ч непосредственно перед поступлением пациента в операционный блок) путем введения 1,0 мл 2% промедола, 1,0 мл 1% димедрола и 2 мл 0,5% сибазона внутримышечно. Вводная анестезия осуществлялась инфузией фентанила (4-5 мг/кг) и сибазона (0,1 мг/кг), в ходе операции анальгезия поддерживалась фентанилом (10 мкг/кг/мин) и кетамином (1-2 мг/кг·ч).

После утраты сознания и болевой чувствительности проводилась вспомогательная вентиляция легких мешком наркозного аппарата, после введения ардуана в дозе 0,08-0,10 мг/кг выполнялась интубация трахеи и перевод больного на искусственную вентиляцию легких с применением оксигенирующей смеси,

содержащей 50% кислорода, в режиме умеренной гипервентиляции ($p\text{CO}_2$ артерии - 30-35 мм рт. ст.) с помощью аппарата Respirator ABV-A («Heyer», Германия).

В это же время устанавливались 2 катетера в центральные вены и катетер в лучевую артерию для прямого измерения кровяного давления, катетеризировался мочевого пузырь. В ходе хирургического вмешательства осуществлялся непрерывный контроль центрального венозного и артериального давления, частоты сердечных сокращений, электрокардиограммы, насыщения крови кислородом, температуры тела. Мониторирование и регистрацию этих показателей осуществляли с использованием кардиомониторов Sirecust 7000, 9000 (SIEMENS, Германия).

Операция шунтирования коронарных артерий выполнялась в несколько этапов:

- 1- выделение и подготовка аутовенозного трансплантата, в качестве которого использовалась большая подкожная вена нижней конечности,
- 2- осуществление доступа к сердцу путем срединной стернотомии,
- 3- выделение аутоартериального трансплантата (внутренние грудные артерии, реже – правая желудочно-сальниковая, лучевая или нижняя надчревная артерии),
- 4- ревизия сердца и коронарных артерий,
- 5- перевод больного на ИК,
- 6- формирование дистальных (коронарных) анастомозов,
- 7- определение необходимой длины шунта, его положения, места анастомоза с коронарными артериями,
- 8- формирование проксимальных (аортальных) анастомозов аортокоронарных шунтов,
- 9- отключение аппарата ИК,
- 10- закрытие операционной раны путем металлоостеосинтеза грудины и послойного ушивания мягких тканей.

Экстракорпоральная перфузия осуществлялась на аппарате ИК «Stokert» («SORIN GROUP DEUTSCHLAND», Германия), оснащенном роликовыми насосами, с применением одноразовых мембранных оксигенаторов «Quadrox» («MAQUET AG», Германия). Для заполнения первичного объема аппарата ИК

использовали физиологический раствор в объеме 1200 мл и 400 мл полиглюкина. После осуществления доступа к сердцу и общей гепаринизации крови (в дозе 3 мг/кг) на восходящую часть аорты накладывали зажим и канюлировали сосуд выше места зажима с целью подключения артериальной магистрали аппарата ИК. Венозную магистраль соединяли с двухпросветной канюлей для катетеризации полых вен, введенной через правое предсердие. Дренаж левого желудочка устанавливался через устье правых легочных вен. Объемная скорость перфузии рассчитывалась исходя из перфузионного индекса, $2,5 \text{ л/мин/м}^2$ и площади поверхности тела пациента. Среднее артериальное давление поддерживалось на уровне не ниже 50 мм рт.ст.

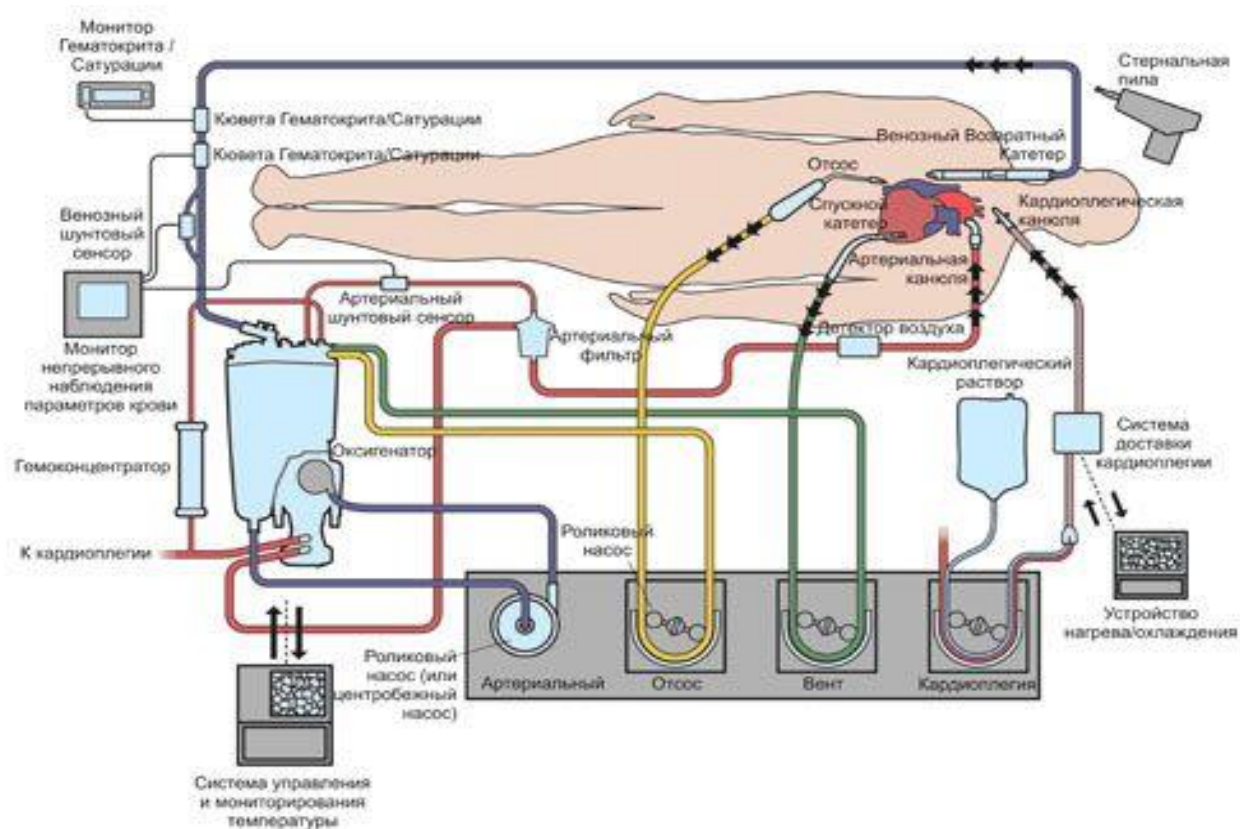


Рис. 1. Схема подключения аппарата искусственного кровообращения

Все манипуляции по наложению дистальных анастомозов (основной этап операции) выполнялись на остановленном сердце в условиях нормотермии и антеградной кровяной кардиopleгии. Последняя осуществлялась начальным введением 400 мл холодного (4°C) раствора (кристаллоидный гипокальциевый, гиперкалиевый раствор «Кустодиол» («Dr. F. Koehler Chemie GmbH», Германия) и венозная кровь в соотношении 1:4) в корень аорты с повторными инфузиями 400

мл после выполнения каждого дистального анастомоза (за исключением последнего). Возобновление сердечной деятельности по завершении основного этапа операции происходило благодаря инфузии в коронарное русло артериальной крови после снятия зажима с восходящей аорты. Через некоторое время (около 10 мин) параллельного искусственного и естественного кровообращения аппарат ИК отключали, а эффект гепарина нейтрализовали введением протамина сульфата в центральную вену (из расчета 1 мг протамина на 100 Ед гепарина).

Критериями исключения из исследования считали:

1. Обострение хронической сопутствующей патологии;
2. Наличие гематологических заболеваний (анемии, хронические лейкозы);
3. Наличие острого респираторного заболевания в течение 1 мес до хирургического вмешательства;
4. Назначение курсов оксигенотерапии, препаратов эритропоэтина или железа;
5. Выполнение сочетанных с коронарным шунтированием операций (резекция аневризмы аорты или левого желудочка, коррекция пороков сердца, удаление миксомы, операции по восстановлению кровотока через сонные артерии и артерии нижних конечностей);
6. Наличие инфузии эритроцитарной массы во время перфузии;
7. Продолжительность искусственного кровообращения более 240 мин;
8. Отказ от исследования.

2.1.2. Краткая характеристика исследуемых групп больных ишемической болезнью сердца

Ретроспективно больные с 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, исходя из того, что при гемоглобинемии свыше этого уровня наблюдаются клинические проявления внутрисосудистого гемолиза (прежде всего – желтуха) [Дуткевич И.Г., 2007].

Среди больных ИБС лица среднего возраста (от 45 до 59 лет) составили 54%, пациенты пожилого возраста (от 60 до 74 лет) – 46%. Соотношение мужчин и женщин равнялось 9,7:1. Длительность ИБС варьировала в пределах от 8 месяцев до 17 лет. У большинства пациентов наблюдалась недостаточность кровообращения II функционального класса (реже I или III) по классификации Нью-Йоркской ассоциации сердца (New York Heart Association – NYHA, 1964 г.), атеросклероз аорты, магистральных артерий конечностей и головного мозга. Среди сопутствующих заболеваний наиболее часто встречались гипертоническая болезнь III степени, патология желудочно-кишечного тракта (язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, гастриты), заболевания печени и желчевыводящих путей (хронический холецистит, описторхоз, желчекаменная болезнь, гепатит В), дисфункция почек (хронический пиелонефрит – 19 человек, мочекаменная болезнь – 23, кисты – 18, нарушение фильтрационной функции почек – 20). Часть пациентов страдала патологией легких (хроническая обструктивная болезнь легких – 16 человек, пневмофиброз – 5, хронический бронхит – 8), хронической венозной недостаточностью и недостаточностью мозгового кровообращения, сахарным диабетом 2 типа, дисфункцией щитовидной (аутоиммунный тиреоидит, узловые образования, эутиреоз) и предстательной железы (доброкачественная гиперплазия предстательной железы, аденома, простатит) (табл. 1).

На дооперационном этапе больным ИБС проводилась антиангинальная терапия с применением нитратов продленного действия (моночинкве, пектрол – изосорбид-5-мононитрат), бета1-адреноблокаторов (конкор, коронал, бипрол – бисопролол; беталок, эгилок, корвитол – метопролол), блокаторов Ca^{2+} -каналов (фелодип – фелодипин; амлодипин, стамло – амлодипин). Также осуществлялась антигипертензивная терапия с применением ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента (эналаприл, энап – эналаприл; квадроприл – спироприл; престариум, перинева – периндоприл; фозикард, моноприл – фозиноприл) и диуретиков (верошпирон – спиронолактон; индапамид; фуросемид); назначались антиагреганты (кардиомагнил, аспиринаткардио – ацетилсалициловая кислота; листаб, плавикс – клопидогрел) и антикоагулянты (гепарин, фраксипарин) (табл. 2). Коррекция липидного обмена осуществлялась с использованием статинов (аторвастатин, атомакс, липримар, торвакард – аторвастатин; симгал – симвастин).

Таблица 1

Клиническая характеристика исследуемых групп больных ишемической болезнью сердца до операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения

Показатель		Больные ИБС с умеренным послеоперацион- ным гемолизом	Больные ИБС с выраженным послеоперацион- ным гемолизом
Количество больных:		98	52
мужчины, %		85,71±3,55	90,38±4,13
женщины, %		14,29±3,55	9,62±4,13
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 крово- обращения (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
Холестерол в плазме крови, ммоль/л		4,66±0,25	5,25±0,26
Гипертоническая болезнь III степени, %		92,59±2,61	91,67±3,73
ХНМК, %		14,28±3,55	17,31±5,30
Хроническая венозная недостаточность, %		18,37±3,93	21,15±5,72
Сахарный диабет 2 типа, %		14,28±3,55	15,39±5,05
Дисфункция щитовидной железы, %		10,21±3,07	3,85±2,69
Дисфункция предстательной железы, %		18,37±3,93	9,62±4,13
Патология желудочно-кишечного тракта:			
- язвенная болезнь желудка и/или ДПК, %		18,37±3,93	17,31±5,30
- гастриты, %		66,33±4,80	75,00±6,06
Заболевания печени и желчевыводящих путей, %		25,51±4,43	42,31±6,92
Заболевания мочевыделительной системы, %		40,82±6,34	21,15±5,72
в том числе с нарушением фильтрационной способности почек, %		21,42±4,17	p<0,05 3,85±2,69 p<0,01
Заболевания легких, %		10,21±3,07	32,69±6,57 p<0,01
Периоперационный риск по Euroscor, %		2,00±0,23	2,96±0,54

Примечание. Здесь и далее в табл. 2, 3, 4, 5: ИБС – ишемическая болезнь сердца, NYHA (New York Heart Association) – Нью-Йоркская ассоциация сердца, ХНМК – хроническая недостаточность мозгового кровообращения, ДПК – двенадцатиперстная кишка; p – уровень статистической значимости различий между показателями у пациентов с умеренным и выраженным гемолизом.

Таблица 2

Спектр лекарственных препаратов, применяемых для лечения больных ишемической болезнью сердца до операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения

Лекарственный препарат	Больные ИБС с умеренным послеоперационным гемолизом (n=52)		Больные ИБС с выраженным послеоперационным гемолизом (n=44)	
	Доля больных, %	Доза, мг/сут	Доля больных, %	Доза, мг/сут
Нитраты (изосорбид-5-мононитрат)	38,46±6,81	47,60±9,76	50,00±7,63	49,55±7,58
Бета₁-адреноблокаторы: бисопролол метопролол	73,08±6,21 57,69±6,92 15,39±5,05	— 5,08±1,65 43,75±6,25	72,73±6,79 40,91±7,49 36,36±7,34 p<0,05	— 5,00±1,02 43,75±4,09
Блокаторы Ca²⁺-каналов: фелодипин амлодипин	61,54±8,62 46,15±6,98 15,39±5,05	— 5,83±0,59 4,38±0,63	45,45±7,59 40,91±7,49 6,82±3,84	— 6,04±0,89 5,00±0,00
Ингибиторы АПФ: спироприл периндоприл эналаприл фозиноприл	53,85±6,98 23,08±5,90 13,46±4,77 15,39±5,05 3,85±2,69	— 5,50±0,50 5,00±0,00 16,25±8,00 5,00±0,00	54,54±7,59 18,18±5,88 27,27±6,79 2,27±2,27 p<0,05 22,73±6,39 p<0,01	— 5,25±0,75 4,67±0,83 20,00±0,00 7,00±1,23
Диуретики: индапамид спиронолактон фуросемид	15,39±5,05 11,54±4,47 3,85±2,69 3,85±2,69	— 2,50±0,00 25,00±0,00 35,00±5,00	18,18±5,88 9,09±4,34 4,55±3,18 4,55±3,18	— 2,00±0,50 25,00±0,00 25,00±5,00
Антиагреганты: аспирин клопидогрел	65,39±6,66 65,39±6,66 11,54±4,47	— 77,94±3,64 75,00±0,00	47,73±7,62 47,73±7,62 9,09±4,34	— 85,00±5,53 62,50±12,50
Антикоагулянты: гепарин фраксипарин	57,69±6,92 50,00±7,00 7,69±3,73	— 18,85±1,62	72,73±6,79 59,09±7,50 13,64±5,23	— 18,08±1,07
Статины: аторвастатин симвастин	69,23±6,46 34,62±6,66 38,46±6,81	— 22,22±3,64 19,00±1,00	54,55±7,59 22,73±6,39 36,36±7,34	— 20,00±7,07 20,00±0,00
Гипогликемические	7,69±3,73	—	13,64±5,23	—
Противоязвенные: омепрозол ранитидин	15,39±5,05 11,54±4,47 3,85±2,69	— 26,67±6,67 300,00±0,00	13,64±5,23 9,09±4,34 4,55±3,18	— 30,00±0,00 300,00±0,00
Антибиотики	7,69±3,73	—	6,82±3,84	—
НПВС	9,62±4,13	—	9,09±4,34	—

Примечание: См. табл. 1, АПФ – ангиотензин-превращающий фермент, НПВС – нестероидные противовоспалительные средства.

При сахарном диабете 2 типа назначались гипогликемические препараты (глюковакс – глибенкламид; диабетон – гликлазид; сиофор – метформин); при язвенной болезни желудка и/или двенадцатиперстной кишки – противоязвенная терапия с применением ингибиторов H^+/K^+ -АТФазы (омепрозол) и блокаторов H_2 -гистаминовых рецепторов (ранитидин).

В некоторых случаях для индукции стойкой ремиссии хронических воспалительных заболеваний перед операцией были использованы антибиотики (цефтриабол, амоксицилин, клабакс) и нестероидные противовоспалительные средства (кеторол – кеторолак; ортофен, диклоген – диклофенак). Нарушение мозгового кровообращения обуславливало назначение в некоторых случаях ноотропов (пирацетам, ноотропил) и сосудорасширяющих средств (винпоцетин). При этом лечение не имело принципиальных отличий в группах обследованных лиц (табл. 2), за исключением более частого назначения метопролола и фозиноприла больным с выраженным гемолизом при редком использовании эналаприла. Несмотря на это, доля пациентов, принимавших бета₁-адреноблокаторы и ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, была равнозначной в сравниваемых группах больных (табл. 2).

В интраоперационном периоде больным ИБС осуществлялись внутривенные инфузии наркотических препаратов (кетамин 5%), опиоидных наркотических анальгетиков (фентанил 0,005%, промедол 2%, морфин 1%), седативных средств (седуксен, сибазон – диазепам 0,5%; димедрол 1%), нейролептиков (дроперидол 0,25%), местных анестетиков (лидокаин 10%), холинолитических препаратов (атропин 0,1%, пентамин 5%), миорелаксантов (ардуан, аперомид – пипекуроний 0,2%; листенон, дитилин – суксаметоний 2%), нитратов (нитроглицерин 1%), антикоагулянтов (гепарин 5000 Ед/мл), гемостатических средств (этамзилат, дицинон – этамзилат 12,5%, аминокaproновая кислота 5%), кортикостероидов (преднизолон 2,5%), антибиотиков (цефтриабол 1г, сультамин 1,5 г), диуретиков (лазикс – фуросемид 1%). В некоторых случаях по показаниям вводились адреномиметики (адреналин, допамин, мезатон) или адреноблокаторы (метопролол, альбетор, эбронил), инсулин, верапамил. Медикаментозное влияние на организм пациента во время операции было сопоставимым в группах обследованных лиц по спектру и дозе применяемых препаратов за исключением того, что больным с

выраженным гемолизом (по сравнению с альтернативной группой пациентов) чаще вводился суксаметоний, реже – этамзилат и в меньшей дозе – пентамин (табл. 3).

Таблица 3

Спектр лекарственных препаратов, применяемых у больных ИБС во время операции коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения

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

Примечание: См. табл.1.

Продолжительность основного этапа операции, который выполняется в условиях ИК и на фоне ишемии миокарда, зависела от количества шунтированных артерий и скорости восстановления нормальной сердечной деятельности у

пациентов после завершения кардиоплегии. Фактическая объемная скорость перфузии определялась путем коррекции ее расчетной величины в зависимости от показателей кислотно-основного состояния крови и ее газотранспортной функции (парциальное давление кислорода в крови, степень насыщения гемоглобина кислородом, гематокрит) у каждого пациента в отдельности (табл. 4).

Таблица 4

Характеристика перфузиологического этапа операции коронарного шунтирования у больных ишемической болезнью сердца

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

Примечание: См. табл. 1, ОСП – объемная скорость перфузии, pO₂ – парциальное давление кислорода в крови, HbO₂ – степень насыщения гемоглобина кислородом, Hct – гематокрит.

С целью выявления ранних послеоперационных осложнений у больных ИБС на протяжении первых 7 суток после операции регистрировали (по данным клинических карт) (табл 5):

- длительность искусственной вентиляции легких с момента поступления пациента в палату интенсивной терапии;
- наличие кровотечений, общий объем перелитых препаратов красной крови (аутокровь и донорская эритроцитарная масса);
- длительность пребывания пациентов в палате интенсивной терапии;
- продолжительность общей послеоперационной госпитализации больных;
- экстремальные величины показателей газотранспортной функции крови (pO_2 , насыщение гемоглобина кислородом и pCO_2) – в первые 2 суток после восстановления самостоятельного дыхания;
- экстремальные величины биохимических показателей крови (концентрацию мочевины, креатинина, общего, прямого и непрямого билирубина), содержание белка и лейкоцитов в моче – не ранее чем через сутки после операции;
- суточный объем диуреза на вторые сутки после операции;
- объем плеврального экссудата (как максимальное значение по данным ультразвукового исследования или же суммарный его объем, полученный при плевральных пункциях) после операции.

Кроме того, для интерпретации результатов исследования учитывали по данным клинических карт содержание гемоглобина и эритроцитов в крови до и через 1 сутки после операции (табл. 6), а также концентрацию фибриногена в плазме крови до и непосредственно после операции (табл. 8).

Послеоперационная профилактика осложнений включала в себя обязательное применение в течение первых 3 суток антиагрегантов (аспирин, кардиомагнил), антикоагулянтов (гепарин, фраксипарин), нестероидных противовоспалительных средств (ортофен, диклоген – диклофенак; кетанов, кеторол – кеторолак), антибиотиков (офрамакс, азаран – цефтриаксон; ампицилин, сультаксин, цефабол, цефоперабол), кровезаменителей (реополиглюкин) и солевых растворов, выполнение дыхательной гимнастики.

По показаниям проводилось симптоматическое лечение: инотропная поддержка сердца (допмин), дегидратация (фуросимид, лазикс), вазодилатация (нитроглицерин, пентамин), антиангинальная (коронал, беталок; фелодипин, амлодипин), антигипертензивная (каптоприл, эналаприл), антигипотензивная (мезатон), антиаритмическая (верапамил, анаприлин, кордарон), анальгезирующая (анальгин, промедол), противоязвенная (омез, омепразол) терапия. В некоторых случаях назначались глюкокортикоиды (преднизолон), гепатопротекторы (эссенциале), блокаторы H_2 -рецепторов гистамина (ранитидин), антидиабетические средства (диабетон, сиофор, глюковакс), трансфузия плазмы и эритромаcсы.

Сочетание и длительность использования медикаментов были индивидуальными, так как лечение назначалось с целью компенсации дисбаланса той или иной системы органов, что зависело от особенностей реакции организма больного на оперативное вмешательство. Между тем, в целом лечение не имело принципиальных отличий в группах обследованных лиц, но обращало на себя внимание более частое использование у больных с выраженным гемолизом пипекурония и наркотических анальгетиков при меньшей дозе пентамина (табл. 5).

Таблица 5

Характеристика послеоперационного периода у больных ишемической болезнью сердца, перенесших операцию коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения

Параметры послеоперационного периода		Больные ИБС с умеренным послеоперационным гемолизом (n=52)	Больные ИБС с выраженным послеоперационным гемолизом (n=44)
1		2	3
Длительность ИВЛ, ч		10,37±0,74	9,64±0,95
Минимальное pO_2 , мм.рт.ст.		38,95±2,24	35,05±1,27
Минимальное насыщение гемоглобина кислородом ($Hb O_2$), %		67,47±2,19	61,70±1,90
Максимальное pCO_2 , мм.рт.ст.		42,79±1,04	42,91±0,67
Наличие кровотечений, % случаев		5,77±3,27	11,36±4,84
Аутокровь	Доля пациентов, %	22,22±5,82	11,36±4,84
	Объем, мл	450,00±0,00	450,00±0,00
Донорская эритромаcса	Доля пациентов, %	19,23±5,52	54,55±7,59 $p<0,01$
	Объем, мл	339,60±69,34	299,33±28,24

Продолжение табл. 5

1		2	3
Мочевина, ммоль/л		9,09±0,49	9,13±0,47
Креатинин, мкмоль/л		92,73±2,84	92,95±4,36
Билирубин прямой, мкмоль/л		6,70±0,71	5,84±0,57
Билирубин непрямой, мкмоль/л		12,14±1,13	11,09±0,66
Протеинурия	Доля пациентов с протеинурией, %	44,44±6,95	68,18±7,10 p<0,05
	Концентрация белка в моче, г/л	0,17±0,02	0,23±0,04
Содержание лейкоцитов в моче, количество клеток в поле зрения		3,70±0,43	3,89±0,54
Диурез на 2 сутки после операции, мл		2053,91±129,19	1714,71±138,05
Объем плеврального экссудата, мл		256,32±39,59	461,25±64,90 p<0,05
Нитроглицерин	Доля пациентов, %	55,77±6,96	52,27±7,62
	Доза, мг/сутки	35,36±5,80	46,25±9,48
Пентамин	Доля пациентов, %	17,31±5,30	25,00±6,60
	Доза, мг/сутки	212,50±42,70	70,00±12,25 p<0,05
Пипекуроний	Доля пациентов, %	7,69±3,73	15,91±5,58
	Доза, мг/сутки	6,00±1,15	18,67±4,46 p<0,05
Потребность в наркотических анальгетиках (промедол, морфин), %		1,92±1,92	20,45±6,15 p<0,05
Пребывание больных в палате интенсивной терапии, сутки		2,56±0,16	2,96±0,33
Общая послеоперационная госпитализация больных, сутки		19,75±1,07	23,29±1,61

Примечание: ИВЛ – искусственная вентиляция легких.

В контрольную группу вошло 30 человек, находившихся в состоянии относительного здоровья и сопоставимых по полу и возрасту с группами пациентов с ИБС (56,38±2,14 лет). Обязательным условием включения доноров в группу контроля было отсутствие клинически верифицированной патологии кардиоваскулярной системы и системы крови, жалоб соответствующего характера, а также острого воспалительного процесса во время исследования или за 4 недели до его проведения. С учетом полученных данных, из дальнейших исследований исключали лиц, у которых концентрация холестерина в плазме крови была выше

5,5 ммоль/л. Учитывая возраст, допускали наличие хронических заболеваний в стадии ремиссии в соотношении, аналогичном таковому в группах больных ИБС.

2.3. 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 через 1 ч после завершения ИК (время, необходимое для нейтрализации гепарина адекватной дозой протамина сульфата) до инфузии препаратов красной крови.

2.4. Методы исследования

2.4.1. Первичная пробоподготовка биоптатов периферической крови

Гепаринизированную венозную кровь (50 Ед/мл) в количестве 10 мл разделяли на 2 аликвоты: 0,5 мл цельной крови использовали для определения содержания эритроцитов в крови и их объема, а также приготовления мазков крови с целью подсчета ретикулоцитов; 9,5 мл крови центрифугировали при 1500 g в течение 10 мин при +4⁰С. Плазму отбирали в пробирку, лейкоцитарную пленку удаляли, забирали 0,3 мл эритроцитарной взвеси для определения содержания компонентов адениловой системы, а оставшийся объем эритроцитарной массы распределяли на 2 части и подвергали трехкратной отмывке при +4⁰С. Для этого 1,5 мл эритроцитов трижды отмывали 0,9% NaCl, центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 1500 g и удаляя надосадок. Эти клетки затем использовали для оценки механической резистентности, мочевинового гемолиза, агрегационной способности и Резус-фенотипа эритроцитов. Вторую часть эритроцитарной взвеси (около 3 мл) трижды отмывали изотоническим трисHCl-буфером (pH=7,4), центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 1500 g и +4⁰С и удаляя надосадок. Полученные таким образом эритроциты использовали для изучения окислительно-антиокислительного баланса клеток, изучения структурно-функциональных свойств мембраны эритроцитов.

Полученную после осаждения клеток плазму крови использовали для определения в ней концентрации свободного гемоглобина, гаптоглобина, эритропоэтина, содержания продуктов перекисного окисления липидов, изучения общей антиокислительной активности плазмы.

Апирогенную сыворотку крови использовали для оценки активности системы комплемента и содержания фактора некроза опухолей – α в крови, получая ее путем взятия 2,0 мл крови в стерильные сухие пробирки, после чего пробирки закрывали стерильными пробками. Через 15 мин сыворотку отделяли путем центрифугирования в течение 10 мин при 1500 g и $+4^{\circ}\text{C}$, помещали в стерильные емкости по 700 мкл и хранили до начала исследования при -70°C .

2.4.2. Определение концентрации свободного гемоглобина в плазме крови бензидиновым методом

Принцип метода. Колориметрическая реакция основана на пероксидазной активности гемоглобина, который способен переносить кислород пероксида водорода на молекулы бензидина с образованием конечного продукта голубого цвета. Степень выраженности окраски прямо пропорциональна концентрации свободного гемоглобина в исследуемом образце [Козловский В.И., 2009].

Ход определения. Для определения концентрации свободного гемоглобина в плазме крови/супернатанте (при изучении механической резистентности эритроцитов) в пробирку вносили 8 мл реакционной смеси: 4 мл ацетатного буфера ($\text{pH}=4,6$) + 2 мл 0,1% раствора бензидина на ацетатном буфере + 2 мл 0,3% раствора пероксида водорода. Добавляли 0,04 мл исследуемой плазмы/надосадочной жидкости (при изучении механической резистентности эритроцитов). Содержимое пробирок перемешивали и оставляли при комнатной температуре точно на 5 мин, после чего измеряли величину оптической плотности в кювете 10 мм при длине волны 670 нм против холостой пробы, которую готовили аналогичным образом, внося вместо биологического материала 0,04 мл физиологического раствора. Расчет концентрации свободного гемоглобина в плазме крови осуществляли по калибровочной кривой, которую строили исходя из данных фотометрии проб в серии опытов с разведениями стандартного раствора

гемоглобина известной концентрации (0,04 мл стандартного раствора гемоглобина 50 мг/дл вместо исследуемой жидкости).

Результат представляли в мг/дл.

2.4.3. Вычисление нормализованного индекса гемолиза

С целью установления возможности сопоставления больных с умеренным и выраженным гемолизом, имевших разную продолжительность искусственного кровообращения (ИК), вычисляли нормализованный индекс гемолиза (НИГ), учитывающий время искусственного кровообращения, уровень гемодилюции и объемную скорость перфузии [Дементьева И.И. и соавт., 2010]. НИГ вычисляли по формуле:

$$\text{НИГ (мг/дл)} = \Delta\text{Hb}_{\text{св}} \cdot V \cdot (1 - \text{Hct}/100) \cdot 100 / (Q \cdot t) \quad (1),$$

где: $\Delta\text{Hb}_{\text{св}}$ – прирост свободного гемоглобина в плазме крови за время ИК (мг/дл), V – объем заполнения аппарата ИК (л), Hct – средний гематокрит во время ИК (%), t – время ИК (мин), Q – объемная скорость перфузии (л/мин).

Результат выражали в мг/дл.

2.4.4. Оценка содержания гаптоглобина в плазме крови

Содержание гаптоглобина определяли иммунотурбидиметрическим методом с помощью коммерческого набора «Haptoglobin» («Sentinel Diagnostics», Италия).

Принцип метода. Определение гаптоглобина в плазме крови основано на специфической реакции взаимодействия между поликлональными антителами к гаптоглобину и определяемым антигеном при оптимальном pH в присутствии полиэтиленгликоля. Мутность реакционной смеси прямо пропорциональна концентрации гаптоглобина в исследуемом образце.

Ход определения. Предварительно готовили разведения калибратора гаптоглобина с известной концентрацией белка «Plasmaproteins Cal» («Sentinel Diagnostics», Италия) с целью построения калибровочной кривой; все растворы доводили до температуры $+37^{\circ}\text{C}$. Образцы плазмы и контрольные пробы перед исследованием разводили 0,9% NaCl в соотношении 1:21. В пробирки вносили 1,8 мл 20 mM фосфатного буфера (pH = 7,5; содержит 5% полиэтиленгликоля и 150 mM NaCl) и 0,2 мл раствора поликлональных антител. В опытные пробы добавляли 0,1

мл разведенной плазмы, в контрольные – 0,1 мл растворов калибратора, в холостую – 0,1 мл 0,9% NaCl. Содержимое пробирок перемешивали и оставляли на 10 мин при +37°C, после чего измеряли абсорбцию при 340 нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм против холостой пробы. Концентрацию гаптоглобина в исследуемых образцах находили с помощью калибровочной кривой.

Результат выражали в мг/дл.

2.4.5. Определение Резус-фенотипа эритроцитов

Резус-фенотип эритроцитов оценивали стандартным гематологическим методом в реакции прямой гемагглютинации на плоскости с применением коммерческих цоликлонов анти-D, анти-C, анти-c, анти-E, анти-e Супер (ООО «Гематолог», Москва), согласно инструкции производителя.

Ход определения. На мелкодонный планшет наносили 2 капли раствора цоликлона и 1 каплю отмытой эритромассы, смешивали и оставляли на 20-30 с, по истечении которых планшет покачивали 2-3 раза. Через 3 мин визуально оценивали наличие или отсутствие агглютинации.

2.4.6. Определение гематокрита, содержания эритроцитов в крови и их объема

Исследование гематокрита, содержания эритроцитов в крови и их объема проводили унифицированным гематологическим методом, используя гематологический анализатор MEK-6410 («Nihon Kohden», Япония).

Результат выражали соответственно в %, $10^{12}/л$, $л \cdot 10^{-15}$ (фл).

2.4.7. Подсчет ретикулоцитов в суправитально окрашенных мазках периферической крови

Принцип метода. Фрагменты органелл ретикулоцитов, содержащих рибонуклеиновую кислоту, способны воспринимать витальный краситель бриллиантовый крезиловый синий и окрашиваться в виде зернисто-сетчатой субстанции синего цвета, в отличие от зрелых эритроцитов, лишенных этих структур и окрашиваемых в желто-зеленый цвет (рис. 2) [Льюис С.М. и соавт., 2009].

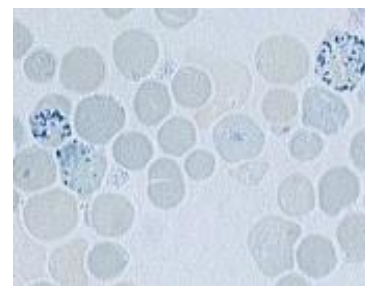


Рис. 2. Суправитальная окраска ретикулоцитов ($\times 900$)

Ход определения. На подогретое предметное стекло с заранее приготовленным мазком раствора бриллиантового крезилового синего (1,2 г краски растворяли в 100 мл абсолютного этилового спирта) наносили каплю крови, готовили из нее тонкий мазок и тотчас помещали во влажную камеру на 3-4 мин. По истечении времени окраски мазки высушивали на воздухе. С помощью иммерсионной системы микроскопа (окуляр $\times 10$, объектив $\times 100$) подсчитывали количество ретикулоцитов, встретившихся при подсчете 1000 эритроцитов.

Результат выражали в ‰.

2.4.8. Определение механической резистентности эритроцитов

Принцип метода. Количественное определение степени гемолиза в изотонической суспензии эритроцитов с гематокритом 2%, подвергнутой механическому воздействию путем длительного перемешивания [Ганиткевич Я.В., Черненко Л.И., 1978].

За основу был взят метод, разработанный Я.В. Ганиткевич, Л.И. Черненко (1976 г.), модифицированный в настоящем исследовании: вместо цельной крови использовали отмытые эритроциты, а вместо физиологического раствора для приготовления суспензии эритроцитов – раствор Рингера, забуференный HEPES (pH=7,4) и содержащий 0,1% глюкозы.

Ход определения. Для индукции механического лизиса эритроцитов в цилиндрическую стеклянную емкость объемом 35 мл и диаметром дна 27 мм вносили 0,2 мл отмытых эритроцитов и 9,8 мл буфера HEPES (pH=7,4). Внутрь емкости помещали магнитный стержень диаметром 8 мм и длиной 20 мм и 5 стеклянных шариков диаметром 3 мм. стакан устанавливали на магнитную мешалку для создания механической нагрузки с помощью ротации в течение 30 мин при 1500 об/мин. По окончании установленного времени суспензию эритроцитов центрифугировали 10 мин при 1500 g. Одновременно готовили контрольный 2% раствор красных клеток крови с полным гемолизом (0,02 мл эритроцитов и 0,98 мл дистиллированной воды). В супернатанте опытной пробы и в контрольном растворе определяли содержание свободного гемоглобина бензидиновым методом (см. 2.4.2.), вычисляя затем механическую резистентность эритроцитов как % гемолизированных клеток по формуле:

$$\% \text{ гемолизированных эритроцитов} = C_{\text{оп}} \cdot 100 / C_{\text{к}} \quad (2),$$

где: $C_{\text{оп}}$ – концентрация свободного гемоглобина в опытной пробе после механического воздействия, $C_{\text{кон}}$ – концентрация свободного гемоглобина в контрольной пробе (100% гемолиз), 100 – 100% гемолиза в контрольной пробе.

Результат выражали в %.

2.4.9. Оценка деформируемости эритроцитов методом измерения начальной скорости фильтрации

Принцип метода. Метод основан на регистрации времени фильтрации фиксированного объема взвеси эритроцитов в ресуспендирующей среде через мембранный фильтр с порами малого размера (порядка 2,8-5,0 мкм, рис. 3) [Лисовская И.Л., 1993].

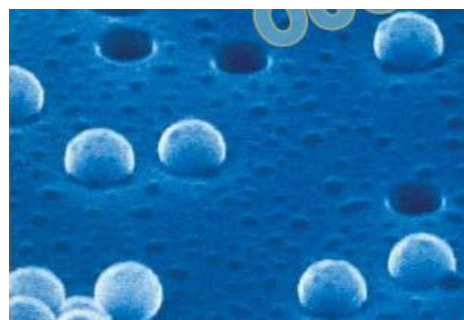


Рис. 3. Изображение эритроцитов на поверхности мембранного фильтра ($\times 1500$)

Ход определения. Исследование деформируемости эритроцитов проводили с использованием гемореометра Ханса – фильтрационной установки, представляющей собой вертикально расположенную трубку, вмещающую в себя объем жидкости с высотой столба строго 60 мм (для создания фильтрационного гидростатического давления), нижний конец которой закрыт полупроницаемой мембраной. В исследовании использовали ацетатцеллюлозную мембрану типа МФА-СП (ЗАО НТЦ «Владипор», г. Владимир) с диаметром пор 3,0-4,0 мкм. После смачивания мембраны ресуспендирующей средой (высота жидкости над мембраной не менее 0,5 см – «точка пузырька») и последующего ее удаления в установку через верхнюю часть вносили 12 мл суспензии эритроцитов, которая создавала над мембраной слой жидкости высотой 60 мм.

В качестве ресуспендирующей среды использовали раствор Рингера, забуференный HEPES (pH=7,4) и содержащий 0,1% глюкозы и 0,5% альбумина. Раствор помещали в 2 пробирки: в одну вносили 12 мл ресуспендирующей среды, а в другую – 12 мл 2% суспензии эритроцитов (11,730 мл ресуспендирующей среды

+ 0,270 мл осажденной эритроцитарной массы). Все растворы, посуда и фильтрационная установка перед исследованием были термостатированы.

В процессе исследования в фильтрационную установку сначала помещали 12 мл ресуспендирующей среды и фиксировали время протекания через мембрану 250 мкл фильтрата; содержимое установки удаляли. Потом аналогичным образом регистрировали время фильтрации для 2% суспензии эритроцитов.

Полученные результаты использовали для расчета индекса ригидности эритроцитов (IR):

$$IR \text{ (усл.ед.)} = (T_s - T_b) \cdot 50 / T_b \quad (3),$$

где: T_b – время прохождения буфера (с); T_s – время прохождения суспензии эритроцитов (с); 50 – 100/2 (2 – гематокрит суспензии эритроцитов, %).

Результат представляли в усл.ед.

2.4.10. Определение агрегационной способности эритроцитов

Принцип метода. Метод основан на количественном определении числа свободных эритроцитов, взвешенных в физиологическом растворе (агрегация отсутствует) и в плазме (агрегация отмечается, рис. 4), с последующим вычислением коэффициента агрегации и среднего количества эритроцитов, включенных в агрегат [Левтов В.А., 1982].

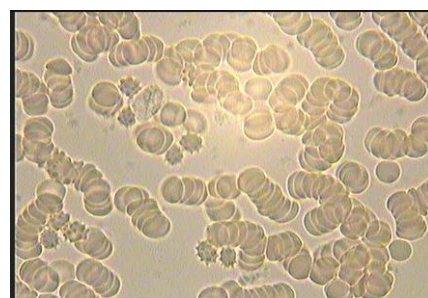


Рис. 4. Агрегация эритроцитов с образованием «монетных столбиков» ($\times 600$)

Ход определения. В пробирку с 800 мкл плазмы (физиологического раствора) вносили 3 мкл эритроцитарной массы и многократно промывали пипетку в верхних слоях жидкости. Затем содержимое пробирок (гематокрит 3,75%) осторожно встряхивали в течение 3 мин и помещали в гематологическую камеру Горяева. Пользуясь общепринятыми правилами подсчета эритроцитов в камере Горяева, учитывали суммарное число неагрегированных (свободно лежащих) эритроцитов и общее количество агрегатов в 5 больших квадратах камеры.

Далее вычисляли коэффициент агрегации эритроцитов (R) и среднее количество эритроцитов, включенных в агрегат (k) по формулам:

$$R \text{ (усл.ед.)} = (N_{\text{фр}} - N_{\text{пл}}) / N_{\text{фр}} \quad (4),$$

$$k (\text{клетки}) = (N_{\text{фр}} - N_{\text{пл}}) / n \quad (5),$$

где: $N_{\text{фр}}$ - число свободных эритроцитов в физиологическом растворе, $N_{\text{пл}}$ - число свободных эритроцитов в плазме крови, n - количество подсчитанных агрегатов.

Результат выражали в усл.ед. (для коэффициента агрегации эритроцитов) и в количестве клеток (для среднего количества эритроцитов, включенных в агрегат).

2.4.11. Оценка проницаемости мембраны эритроцитов для низкомолекулярных гидрофильных веществ методом мочевиного гемолиза

Принцип метода. В физиологических условиях клеточные мембраны практически непроницаемы для мочевины. Механизм гемолитического действия мочевины заключается в быстром ее проникновении в клетку через поврежденную мембрану с последующим формированием внутриклеточной гипертонической среды, что ведет к перемещению воды из экстрацеллюлярного пространства в эритроциты, их набуханию и разрушению [Михайлович В.А., Марусанов В.Е., 1993].

Ход определения. Для определения проницаемости мембраны эритроцитов методом мочевиного гемолиза готовили 20% взвесь эритроцитов (0,2 мл эритроцитарной массы и 0,8 мл физиологического раствора), по 100 мкл которой добавляли в 7 пробирок, содержащих по 5 мл рабочих смесей 1,8% изотонического раствора мочевины и физиологического раствора в следующих соотношениях: 1-я пробирка – 40:60, 2-я – 45:55, 3-я – 50:50, 4-я – 55:45, 5-я – 60:40, 6-я – 65:35, 7-я пробирка содержала чистый раствор мочевины - эталон 100% гемолиза. После инкубации содержимого пробирок при комнатной температуре в течение 3 мин и их центрифугирования при 300 g в течение 5 мин. Полученный надосадок из каждой пробирки фотометрировали (длина волны 540 нм, кювета 1 см, против физиологического раствора) и рассчитывали степень гемолиза эритроцитов в каждой из них (в %), принимая за 100% гемолиз экстинкцию раствора в пробирке, содержащей чистый раствор мочевины. На основе этих результатов строили график зависимости % гемолиза эритроцитов от концентрации мочевины в растворе, с помощью которого определяли ее величину, достаточную для гемолиза 50% клеток (уровень 50% гемолиза).

Результат выражали в % содержания мочевины в растворе.

2.4.12. Определение содержания ТБК-активных продуктов в эритроцитах и плазме крови

Принцип метода. Метод основан на образовании в условиях высокой температуры и кислого pH окрашенного комплекса при взаимодействии 1 молекулы малонового диальдегида (и других ТБК-активных продуктов) с тиобарбитуровой кислотой (ТБК), обладающего максимальным поглощением при длине волны 532 нм [Камышников В.С., 2000].

Ход определения. Для исследования к 0,1 мл эритроцитов, трижды отмытых 145 mM NaCl трис-HCl буфером (pH = 7,4), добавляли 1,0 мл 50 mM трис-HCl буфера (pH = 7,4), содержащего 40 mM этилендиаминтетрацетата (ЭДТА), с целью индукции лизиса эритроцитов. Аналогичным образом разводили плазму крови. В обе пробы (и в плазму, и в гемолизат) вносили по 1,0 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты и 1,0 мл 0,8% раствора ТБК. Пробу прогревали в кипящей водяной бане в течение 20 мин, затем центрифугировали 10 мин при 1500 g. Интенсивность окраски полученного надосадка измеряли при длине волны 532 нм в кювете с толщиной слоя 1 см против контроля на реагенты. Для расчетов использовали формулу:

$$C \text{ (нмоль/л)} = (A_{\text{оп}} \cdot 10^6 \cdot 3) / (1,56 \cdot 10^5 \cdot 0,1) \quad (6),$$

где: 3 – объем водной фазы (мл), 0,1 – объем эритроцитарной массы или плазмы крови (мл), 10^6 – коэффициент перевода «моль/л» в «нмоль/мл», $1,56 \times 10^5$ – коэффициент молярной экстинкции окрашенного комплекса.

Результат выражали в нмоль/мл эритроцитов или плазмы.

2.4.13. Определение содержания диеновых конъюгатов в эритроцитах и плазме крови

Принцип метода. Метод основан на установлении содержания первичных продуктов перекисного окисления липидов (диеновых конъюгатов) в плазме и эритроцитах по поглощению липидным экстрактом монохроматического светового потока в ультрафиолетовой области спектра при длине волны 233 нм [Камышников В.С., 2000].

Ход определения. Исследования проводили в пробирках с притертой крышкой. К 0,2 мл гемолизата (0,1 мл трижды отмытых 145 мМ NaCl трисHCl-буфером эритроцитов + 1,0 мл 50 мМ трисHCl-буфера) или 0,2 мл плазмы крови добавляли 6 мл смеси «гептан-изопропанол» (1:1) и встряхивали 15 мин на лабораторном встряхивателе. Далее в пробирку добавляли 1,0 мл раствора HCl (pH = 2,0), затем центрифугировали 10 мин при 1500 g. Аккуратно отбирали верхний гептановый слой, который использовали для определения в нем содержания диеновых конъюгатов по степени светопоглощения при длине волны 233 нм. В качестве контрольной пробы использовали гептан. Расчет содержания диеновых конъюгатов проводили по формулам:

$$A_{233}/1 \text{ мл плазмы} = A_{233} \cdot 3 / 0,2 = A_{233} \cdot 15 \quad (7),$$

$$A_{233}/1 \text{ мл эритроцитов} = A_{233} \cdot 3 \cdot 11 / 0,2 = A_{233} \cdot 165 \quad (8),$$

где A_{233} – значение оптической плотности опытной пробы при 233 нм, 3 – конечный объем гептанового экстракта (в мл), 0,2 – объем взятой плазмы или гемолизата (в мл), 11 – коэффициент разведения гемолизированных эритроцитов. Результат выражали в усл.ед./мл эритроцитов или плазмы.

2.4.14. Определение общей антиокислительной активности в плазме крови

Принцип метода. Метод основан на исследовании кинетики окисления восстановленной формы 2,6-дихлорфенолиндофенола кислородом воздуха и расчете величины константы ингибирования этого процесса биологическим материалом как разности скоростей окисления индикатора в присутствии и в отсутствие биологического материала [Семенов В.Л., Ярош А.М., 1985].

Ход определения. В термостатированную при 37°C кювету с толщиной слоя 10 мм помещали 1,5 мл 0,25 М фосфатного буфера (pH=7,4), 0,5 мл 0,8 мМ водного раствора 2,6-дихлорфенолиндофенола в окисленной форме, 0,5 мл 3,3 мМ водного раствора сульфата двухвалентного железа и 2,0 мл водного раствора, содержащего 6,5 мкл плазмы крови, (опыт) или воды (контроль). Предварительно все растворы термостатировали при 37°C. После добавления плазмы крови или воды включали секундомер и измеряли оптическую плотность содержимого кюветы через каждые 30 с на протяжении 5 мин в условиях постоянного перемешивания смеси при длине волны 510 нм против 0,25 М фосфатного буфера. Кроме того, определяли значение

оптической плотности реакционной смеси, в которой 2,6-дихлорфенолиндифенол полностью окислен. Такую среду готовили, добавляя вместо сульфата двухвалентного железа 0,5 мл воды. Расчет константы ингибирования проводили по формуле:

$$K_{\text{и}} = [\ln (D_{\infty} - D_{5\text{оп}}) - \ln (D_{\infty} - D_{5\text{к}})] / 5 \cdot 1,434 \quad (9),$$

где: $K_{\text{и}}$ – константа ингибирования, D_{∞} – значение оптической плотности реакционной смеси, в которой 2,6-дихлорфенолиндифенол полностью окислен; $D_{5\text{оп}}$ – значение оптической плотности реакционной смеси, содержащий плазму крови, через 5 мин; $D_{5\text{к}}$ – значение оптической плотности реакционной смеси, не содержащей биологического материала, через 5 мин; 1,434 – объемная концентрация биологического материала в реакционной смеси.

Результат выражали в усл.ед./мин.

2.4.15. Определение активности супероксиддисмутазы в эритроцитах

Принцип метода. Метод основан на способности супероксиддисмутазы (СОД) тормозить реакцию автоокисления адреналина до адренохрома при pH=10,2 [Сирота Т. В., 1999].

Ход определения. Предварительно готовили 10-кратный гемолизат путем разведения 0,01 мл эритроцитов в 0,09 мл 50 мМ трисHCl-буфера (pH=7,4), содержащего 40 мМ ЭДТА, из которого 0,5 мл использовали для определения концентрации гемоглобина в пробе гемиглобинцианидным методом (п. 2.4.15), а оставшиеся 0,5 мл – для приготовления 20-кратного гемолизата путем двукратного разведения первоначального в 50 мМ трисHCl-буфере (pH=7,4), содержащем 40 мМ ЭДТА. Перед исследованием активности СОД гемолизат очищали от примесей гемоглобина и белков: к 0,2 мл гемолизата добавляли 0,1 мл смеси «этанол:хлороформ», затем 0,5 мл буфера, после чего перемешивали и центрифугировали 15 мин при 4000 g. Для измерения активности СОД в стандартную кювету спектрофотометра с длиной оптического пути 10 мм вносили термостатированные компоненты в следующей последовательности: 3,0 мл 50 мМ Na-карбонатного буфера (pH=10,2), содержащего 50 мМ ЭДТА; 0,2 мл очищенного 20-кратного гемолизата (или 0,2 мл дистиллированной воды при измерении холостой пробы), 0,5 мл $1,8 \cdot 10^{-3}$ М водного раствора адреналина (pH=2,5),

приготовленного *ex tempore*. Содержимое кюветы фотометрировали при длине волны 489 нм, определяя сначала скорость свободного неингибированного автоокисления адреналина в адренохром в холостой пробе (E_1), затем скорость автоокисления адреналина в присутствии СОД исследуемого материала (E_2). Активность СОД в эритроцитах рассчитывали по формуле:

$$A \text{ (усл.ед./мгHb)} = (E_1/E_2 - 1) \times 2n/a \quad (10),$$

где: a – концентрация гемоглобина в 10-кратном гемолизате (мг/л), n – коэффициент разведения гемолизата для определения активности СОД (равен 20), 2 – соотношение между 20- и 10-кратным гемолизатом.

Результат выражали в усл.ед./мгHb.

2.4.16. Определение активности каталазы в эритроцитах

Принцип метода. Метод основан на способности каталазы разлагать пероксид водорода, которая образует окрашенный комплекс с солями молибдата аммония [Королук М.А. и соавт., 1988].

Ход определения. Предварительно готовили 10-кратный гемолизат путем разведения 0,01 мл эритроцитов в 0,09 мл 50 мМ трисHCl-буфере (pH=7,4), содержащем 40 мМ ЭДТА, из которого 0,5 мл использовали для определения концентрации гемоглобина в пробе гемиглобинцианидным методом (п. 2.4.18), а оставшиеся 0,5 мл – для приготовления 200-кратного гемолизата путем 20-кратного разведения первого в 50 мМ трисHCl-буфере (pH=7,4), содержащем 40 мМ ЭДТА. Далее к 2,0 мл 0,03% раствора пероксида водорода добавляли 0,1 мл гемолизата, в холостую пробу - 0,1 мл дистиллированной воды. После 10 мин инкубации при +37°C приливали по 1,0 мл 4% раствора молибдата аммония. Центрифугировали 10 мин при 2200 g. Оптическую плотность измеряли при длине волны 410 нм. Активность каталазы в сыворотке крови рассчитывали по формуле:

$$A \text{ (мкат/мг Hb)} = (E_x - E_{оп}) / (t_{сек} \cdot V \cdot C \cdot 22,2 \cdot 10^3) \quad (11),$$

где: $E_{оп}$ – экстинкция опытной пробы, E_x – экстинкция холостой пробы, $22,2 \cdot 10^3$ – коэффициент миллимолярной экстинкции продукта взаимодействия пероксида водорода и молибдата аммония (ммоль⁻¹см⁻¹), t – время инкубации (с), V – объем вносимой пробы (л), C – концентрация белка в пробе (мг/л).

Результат выражали в мкат/мгHb.

2.4.17. Определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в эритроцитах

Оценку активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) в эритроцитах осуществляли спектрофотометрически кинетическим способом с использованием коммерческого набора «G6P-DH» («Sentinel Diagnostics», Италия).

Принцип метода. Измерение активности Г-6-ФДГ основано на определении скорости изменения оптической плотности раствора восстановленного никотинамидаденилдинуклеотида фосфата (НАДФН), образующегося в реакции взаимодействия его окисленной формы с глюкозо-6-фосфатом и имеющего максимум поглощения при 340 нм.

Ход определения. Предварительно все растворы доводили до температуры +25⁰С и готовили 6-кратный гемолизат: 0,1 мл эритроцитов, трижды отмытых 0,9% раствором NaCl, гемолизировали 0,5 мл 0,02% раствора дигитонина, содержащего 0,1% азида натрия. В 6-кратном гемолизате определяли концентрацию гемоглобина гемиглобинцианидным методом (п. 2.4.18). В кювету с длиной оптического пути 10 мм вносили 2,5 мл 31,7 мМ триэтанолового буфера (рН=7,6), содержащего 3,2 мМ ЭДТА, а также 0,075 мл 0,34 мМ НАДФ⁺ и 0,038 мл гемолизата, перемешивали и выдерживали при +25⁰С в течение 5 мин. Затем добавляли 0,038 мл 0,58 мМ раствора глюкозо-6-фосфата, тщательно перемешивали, измеряли начальную оптическую плотность проб при длине волны 340 нм и одновременно запускали секундомер. Экстинкцию опытной пробы измеряли ровно через 1, 2 и 3 минуты, вычисляя среднее изменение оптической плотности за 1 мин. Для расчета активности Г-6-ФДГ в эритроцитах использовали формулу:

$$A \text{ (Ед/гНб)} = (\Delta A_{\text{мин}} \cdot 69857) / \text{Нб} \quad (12),$$

где: $\Delta A_{\text{мин}}$ - среднее изменение оптической плотности за 1 мин, 69857 – фактор пересчета, учитывающий температуру реакции и длину волны измерения оптической плотности реакционной смеси, Нб – концентрация гемоглобина в 6-кратном гемолизате (г/л).

Результат выражали в Ед/гНб.

2.4.18. Определение концентрации гемоглобина в растворе гемиглобинцианидным методом

Принцип метода. В основе метода лежит окисление Fe^{2+} -гемоглобина с помощью железосинеродистого калия (красной кровяной соли) в Fe^{3+} -метгемоглобин (HbMet, гемиглобин) и последующее его преобразование ацетонциангидрином в стабильное окрашенное соединение – цианметгемиглобин (CNmetHb, гемиглобинцианид), оптическая плотность которого регистрируется фотометрически и прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в растворе. Исследование выполняли с помощью коммерческого набора «ЭКОлаб-Гемоглобин» (ЗАО «ЭКОлаб», Москва).

Ход определения. В пробирку с 5 мл трансформирующего раствора добавляли 0,02 мл крови, перемешивали и оставляли на 10 мин. Измерение оптической плотности раствора проводили при длине волны 520-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы – трансформирующего раствора.

Содержание гемоглобина рассчитывали по формуле:

$$C \text{ (г/л)} = E_{\text{оп}} \cdot C_{\text{ст}} / E_{\text{ст}} \quad (13),$$

где $E_{\text{оп}}$ – экстинция опытной пробы, $E_{\text{ст}}$ – экстинция стандартного раствора CNmetHb, $C_{\text{ст}}$ – концентрация CNmetHb в стандартном растворе (г/л),

Результат выражали в мг/л.

2.4.19. Метод выделения мембран эритроцитов

Принцип метода. Методика выделения мембран эритроцитов по J.T. Dodge [1963] основана на феномене гипоосмотического лизиса клеток.

Ход определения. Эритроциты в количестве 2 мл, трижды отмытых изотоническим 10 mM трисHCl-буфером (pH=7,4), гемолизировали в течение 30 мин при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, добавляя 20-кратный объем гемолизирующей среды (10 mM трисHCl-буфера (pH=7,4), содержащего 40mM ЭДТА). Гемолизат центрифугировали при 30000 g и $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин, используя центрифугу «Eppendorf Centrifuge 5804R» («Eppendorf», Германия), надосадок удаляли. Затем мембранную взвесь трижды отмывали 10 mM трисHCl-буфером (pH=7,4), центрифугуя каждый раз при 30000 g и $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин и удаляя супернатант. Осадок ресуспендировали в 1 мл 10 mM трисHCl-буфера (pH=7,4).

Полученную мембранную суспензию использовали в дальнейшем для изучения липидного состава мембраны эритроцитов и активности Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы (Na^+/K^+ -АТФазы) после предварительного определения содержания белка микробиуретовым методом (п. 2.4.20).

2.4.20. Определение белка микробиуретовым методом

Принцип метода. Метод основан на появлении фиолетового окрашивания при внесении щелочного раствора меди в раствор белка, при этом развитие окраски обусловлено присутствием пептидных связей в белке [Северин С.Е., Соловьева Г.А., 1989].

Ход определения. К 0,1 мл исследуемого образца добавляли 3,5 мл 3% NaOH и 0,2 мл реактива Бенедикта (смесь цитрата и карбоната натрия с CuSO_4). Пробы инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Интенсивность развившейся окраски определяли фотометрически при длине волны 330 нм. Содержание белка в пробах рассчитывали по калибровочной кривой, используя разведения стандартного раствора белка с концентрацией 50 мг/мл.

Результат выражали в мг/мл.

2.4.21. Изучение липидного состава мембран эритроцитов

2.4.21.1. Получение липидного экстракта мембран эритроцитов

Принцип метода. Экстракция липидов мембран эритроцитов хлороформ-метаноловой смесью по методу J. Folch et al. [1957] основана на принципе первичного разрушения липид-белковых связей полярным растворителем (метанол) с последующим экстрагированием липидов неполярным растворителем (хлороформ) [Финдлей Дж.Б., Эванз У.Г., 1990].

Ход определения. Полученную мембранную суспензию в количестве 0,4 мл тщательно перемешивали с 5,0 мл хлороформ-метаноловой смеси (в соотношении 2:1) и прогревали на водяной бане (40°C) в течение 15 мин. Экстракт фильтровали и доводили до первоначального объема хлороформ-метаноловой смесью. Для очистки от нелипидных примесей к экстракту добавляли 1,0 мл 0,74% раствора KCl, встряхивали и центрифугировали 10 мин при 1500 g. Затем верхний слой

удаляли пастеровской пипеткой. Очищенный экстракт (нижнюю фазу) доводили до 3,2 мл и использовали для определения общего содержания холестерина, фосфолипидов и их фракций.

2.4.21.2. Определение содержания общего холестерина в липидном экстракте мембран эритроцитов

Исследования проводили с помощью коммерческого набора для определения содержания холестерина в биологических жидкостях «Новохол А» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск) ферментативным методом.

Принцип метода. Эфиры холестерина под действием холестеролэстеразы превращаются в холестерол и жирные кислоты. Холестерол в присутствии кислорода и воды под действием холестеролоксидазы трансформируется в холестенон и пероксид водорода, которая образует с фенолом и 4-амино-антипирином окрашенное соединение с максимумом поглощения при 500 нм.

Ход определения. В пробирку вносили 0,16 мл липидного экстракта суспензии мембран эритроцитов (эквивалентно 20 мкл мембранной суспензии), выпаривали хлороформ при температуре +40⁰С и к полученному осадку добавляли 2,0 мл предварительно термостатированного рабочего реагента (смесь лиофильно высушенных ферментов, растворенных в фосфатном буфере) и 20 мкл дистиллированной воды. В калибровочную пробу вносили 2,0 мл рабочего реагента и 20 мкл калибратора, пробы перемешивали, выдерживали 10 мин при температуре +37⁰С и измеряли оптическую плотность опытных и калибровочных проб против рабочего реагента при длине волны 500 нм в кювете с шириной слоя 5 мм. Концентрацию холестерина выражали в ммоль/л рассчитывали по следующей формуле:

$$C \text{ (ммоль/л)} = 4,65 \cdot A_{\text{оп}} / A_{\text{к}} \quad (14),$$

где: $A_{\text{оп}}$ и $A_{\text{к}}$ – оптическая плотность опытной пробы и калибратора соответственно, 4,65 – концентрация холестерина в калибраторе в ммоль/л.

Результат относили к содержанию белка в мембранной суспензии и выражали в ммоль/мг белка.

2.4.21.3. Определение общего содержания фосфолипидов в экстракте мембран

эритроцитов

Принцип метода. С целью разрушения органических веществ липидного экстракта проводят его термический гидролиз в присутствии хлорной кислоты, устанавливают содержание липидного фосфора в реакции с молибденовым реактивом и по его концентрации судят о содержании общих фосфолипидов в экстракте [Камышников В.С., 2000].

Ход определения. В широкогорлый флакон, обработанный хромовой смесью, вносили 1,6 мл липидного экстракта мембран эритроцитов (эквивалентно 0,2 мл мембранной суспензии) и выпаривали хлороформ, после чего к осадку липидного экстракта добавляли 1 мл концентрированного раствора HClO_4 . Пробирки прогревали в песчаной бане (180°C) до обесцвечивания смеси. Сразу же после этого в пробирки вносили по 5 мл дистиллированной воды. Параллельно готовили контрольную пробу на реактивы, содержащую 0,8 мл концентрированного раствора HClO_4 , и три стандартные пробы, содержащие 0,8 мл концентрированного раствора HClO_4 и по 2,0 мл рабочего стандартного раствора фосфора (1 мл раствора KH_2PO_4 содержит 0,01 мг фосфора). Объем контрольной и стандартных проб доводили дистиллированной водой до 6 мл. Пробы располагали в следующем порядке: контрольная, две стандартные, затем опытные и еще одна стандартная проба.

В каждую пробирку добавляли по 1,0 мл 4% раствора молибдата аммония, содержимое перемешивали и приливали по 1,0 мл свежеприготовленного 1% раствора аскорбиновой кислоты, доводя объем дистиллированной водой до 10 мл. Содержимое пробирок вновь перемешивали. Через 20 мин после этого пробы фотометрировали при длине волны 640 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм против контрольной пробы. Расчет содержания липидного фосфора проводили по формуле:

$$C \text{ (ммоль/л)} = 3,23 \cdot A_{\text{оп}} / A_{\text{ст}} \quad (15),$$

где: $A_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытной пробы, $A_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта, 3,23 – коэффициент пересчета.

Результат относили к содержанию белка в мембранной суспензии и выражали в ммоль/мг белка.

2.4.21.4. Изучение фосфолипидного спектра мембран эритроцитов

Принцип метода. Разделение фосфолипидов на фракции методом тонкослойной хроматографии основано на различной подвижности определенных фосфолипидов в смеси растворителей «хлороформ : метанол : вода» [Прохорова М.И., 1982].

Ход определения. Для разделения фракций фосфолипидов мембран эритроцитов методом тонкослойной хроматографии сухой липидный остаток (экстракт выпаривали при $+40^{\circ}\text{C}$) разводили гептаном и наносили на пластинки "Silufol UV 254" (Чехия). Разделение осуществляли в системе «хлороформ : метанол : вода» (в соотношении 32:12,5:2). Пластинки высушивали, опрыскивали раствором 5% фосфорномолибденовой кислоты, проявляли в сушильном шкафу.

Идентификацию фракций липидов осуществляли с использованием соответствующих стандартов ("Sigma", США). Количественную оценку хроматограмм проводили с помощью компьютерной программы «Universal Desktop Ruler», использование которой предполагает введение изображения фракций веществ в компьютер путем сканирования. В полученной сканограмме оценивали границы, размеры и процентное соотношение площадей фракций, ограниченных контурными линиями.

Исходя из общего содержания фосфолипидов в мембране эритроцитов и удельного содержания их фракций, рассчитывали абсолютное содержание последних.

Результаты выражали в % и ммоль/мг белка.

2.4.22. Определение активности Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов

Принцип метода. Определение активности Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов основано на оценке уровня накопленного неорганического фосфора (P_i) в среде, содержащей АТФ, в результате его гидролиза под действием АТФазы. Содержание неорганического фосфора определяется в реакции образования фосфомолибдата аммония, восстанавливающегося аскорбиновой кислотой до молибденовой сини, количество которой пропорционально накопленному фосфору в растворе [Казеннов А.М. и соавт., 1984].

Ход определения. К 0,1 мл мембранной суспензии добавляли 0,2 мл инкубационной среды следующего состава (мМ): NaCl - 125, KCl - 25, MgCl₂ - 3, ЭДТА - 0,5, АТФ - 2, трисНСl (рН 7,4) - 50. Инкубацию проводили при +37⁰С в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Осажденный белок отделяли центрифугированием при 1500 g в течение 15 мин. Для определения количества образовавшегося неорганического фосфора к 0,2 мл надосадочной жидкости добавляли 1,0 мл молибденового реактива (смесь равных объемов 5% (NH₄)₂MoO₄ и 10N H₂SO₄) и 0,25 мл 2% раствора свежеприготовленной аскорбиновой кислоты. По истечении 20 мин пробы фотометрировали при 625 нм. По калибровочной кривой через величину экстинкции находили содержание неорганического фосфора в пробе, рассчитывали ферментативную активность. За активность Na⁺/K⁺-АТФазы принимали разницу между активностью АТФазы, измеренной в условиях, описанных выше, и активностью АТФазы, определенной в безнатриевой среде в присутствии 125 мМ KCl.

Результат выражали в мкмоль P_i /час•мг белка.

2.4.23. Определение содержания аденозинтрифосфата в эритроцитах

Принцип метода. Метод основан на низкой хроматографической подвижности аденозинтрифосфата (АТФ), в отличие от аденозиндифосфата (АДФ) и аденозинмонофосфата (АМФ), в специально подобранной системе растворителей «диоксан : изопропанол : аммиак : вода» [Захарова Н.Б., Рубин В.И., 1980; Серебров В.Ю., Суханова Г.А, 2008].

Ход определения. В хроматографическую камеру помещали систему растворителей «диоксан : изопропанол : аммиак : вода» в соотношении 4:2:1:4, герметично закрывали и оставляли на 1,5-2 ч для насыщения парами растворителя. Непосредственно после взятия крови эритроциты незамедлительно осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 g и +4⁰С, из середины осадка отбирали 0,3 мл эритроцитарной массы и в охлажденной пробирке смешивали с 0,3 мл холодной дистиллированной воды, добавляя через 1 мин 0,3 мл 20% трихлоруксусной кислоты. Экстракт эритроцитов отделяли центрифугированием при 1500 g и +4⁰С в течение 10 мин. Трихлоруксусную кислоту нейтрализовали

добавлением 5N KOH до pH=5,0. Полученный супернатант в количестве 0,04 мл наносили на хроматографическую пластинку "Silufol" (Чехия) на расстоянии 1,5 см от нижнего края и помещали в камеру. После достижения фронтом растворителя верхнего края пластинки ее вынимали, сушили на воздухе и регистрировали места положения нуклеотидов под источником ультрафиолетового излучения: первым от старта был локализован АТФ, затем АДФ, потом АМФ. Участок хроматограммы, соответствующий местоположению АТФ (верифицированный с помощью реагента АТФ («Sigma», США)), соскабливали и элюировали в 3,0 мл 0,01N HCl в течение 1 ч. Оптическую плотность надосадка определяли на спектрофотометре при длине волны 260 нм против элюата из нефлуоресцирующего участка хроматограммы. Расчет концентрации АТФ осуществляли по формуле:

$$C \text{ (мкмоль/гHb)} = (D \cdot V_1 \cdot 3,0) / (14,2 \cdot 10^{-3} \cdot 0,04 \cdot \text{Hb} \cdot 0,3) \quad (16),$$

где: C – содержание адениннуклеотидов в мкмоль/гHb, V_1 – объем хлорной кислоты и KOH, необходимых для экстрагирования (мл), 3,0 – объем элюата (мл), 0,04 – объем, наносимый на хроматографическую пластинку (мл), Hb – концентрация гемоглобина в эритроmasсе (г/л, определяли гемиглобинцианидным методом в 2-кратном гемолизате с последующим умножением результата на 2, п. 2.4.18.), 0,3 – объем эритроmasсы, из которого осуществлено экстрагирование (мл).

Результат выражали в мкмоль/гHb.

2.4.24. Изучение параметров Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов

Принцип метода. Для регистрации изменений мембранного потенциала эритроцитов в ответ на увеличение внутриклеточной концентрации ионов кальция используют метод, основанный на том, что в присутствии протонофора распределение протонов зависит от мембранного потенциала (E_m) как $E_m = RT/F (pH_i - pH_0)$, где pH_i и pH_0 – значения pH цитоплазмы и среды инкубации, соответственно. При низкой буферной емкости среды инкубации (в условиях эксперимента она примерно в 100 раз меньше таковой для цитоплазмы) изменениями pH_i можно пренебречь, а его квазистационарный уровень определить при гемолизе клеток в присутствии детергента (0,2% тритона X100) [Macey R.I. et al., 1978; Vestergaard-Bogind B., Bennekou P., 1982].

Ход определения. К 1,9 мл термостатированной инкубационной среды (150 мМ NaCl, 1 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ глюкозы) добавляли 100 мкл осажденных эритроцитов, предварительно трижды отмытых 5 мМ Na-фосфатным буфером (рН=7,4), содержащих 150 мМ NaCl; добавляли 50 мкМ CaCl₂. Через 5 мин инкубации суспензии клеток при +37⁰С и постоянном перемешивании вносили протонофор ClCCP (кардонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон) до конечной концентрации 20 мкМ и еще через 2 мин – 2 мкМ кальциевого ионофора A23187, что индуцировало гиперполяризацию мембраны эритроцитов. После реверсии мембранного потенциала до значений, близких к исходным, в суспензию вносили тритон X-100 до конечной концентрации 0,2% с целью определения внутриклеточного рН.

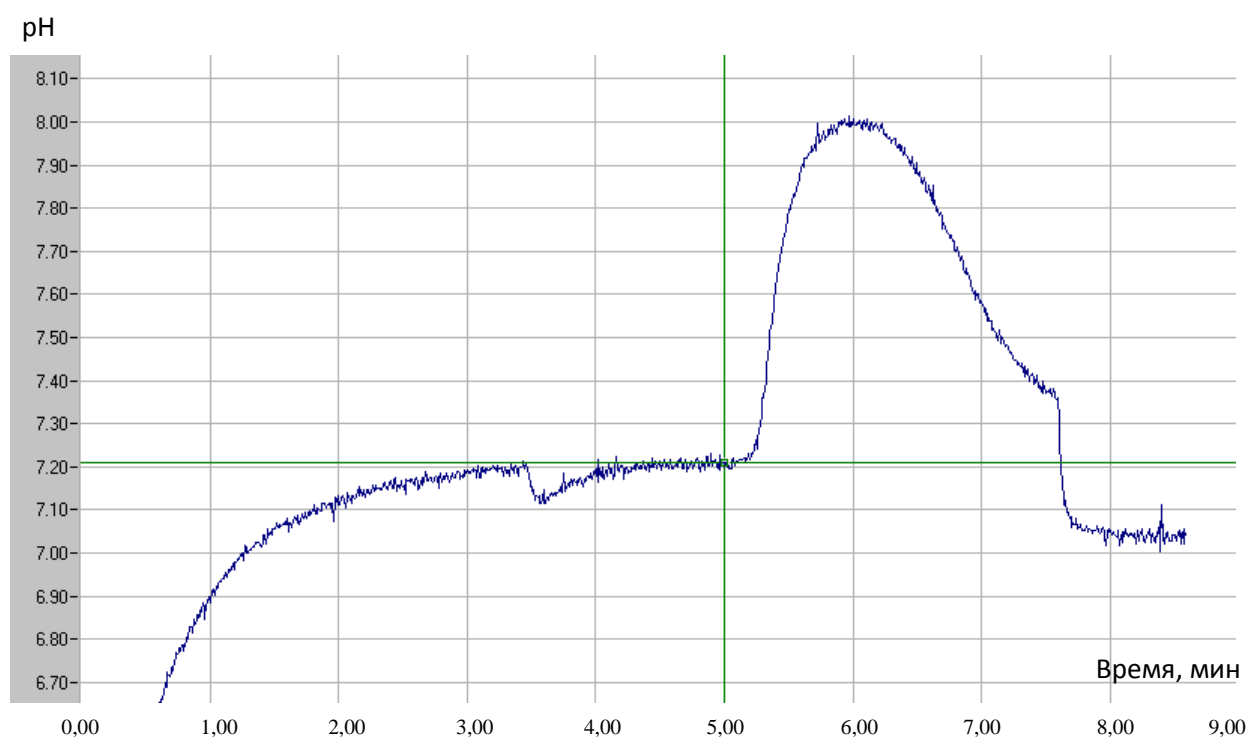


Рис. 5. Динамика мембранного потенциала мембраны эритроцитов во времени при формировании Ca²⁺-индуцированного гиперполяризационного ответа (внесение кальциевого ионофора обозначено пересечением линий зеленого цвета)

Величину рН регистрировали с помощью электрода S 904 А ("Beckman", США) и рН-метра "ЭВ-74" (Россия), записывая изменения его величины во времени (рис. 5). С целью анализа полученных данных графически определяли: ΔЕ – максимальное изменение мембранного потенциала при гиперполяризационном ответе эритроцитов (мВ); Т_{ΔЕ} – время, через которое отмечали максимальную гиперполяризацию мембраны эритроцитов после внесения кальциевого ионофора;

V_1 – скорость защелачивания среды инкубации, отражающая скорость гиперполяризации мембраны (мэкв $\text{OH}^-/\text{мин}\cdot\text{л}$); V_2 – скорость закисления среды, отражающая скорость восстановления мембранного потенциала (мэкв $\text{H}^+/\text{мин}\cdot\text{л}$). Скорость динамических характеристик рассчитывали с учетом буферной емкости инкубационной среды – количества OH^- или H^+ , необходимого для изменения pH среды на единицу.

2.4.25. Определение поверхностных структур мембраны эритроцитов (CD35, CD55, гликофоринов А и В)

Определение экспрессии CD35, CD55, гликофоринов А и В на мембране эритроцитов проводили путем оценки доли гликофорин A^+ , гликофорин B^+ , CD35^+ , CD55^+ эритроцитов (рис. 6) методом прямой поверхностной иммунофлуоресценции с использованием комплементарных моноклональных антител производства («Santa Cruz Biotechnology, INC», США), меченых флуоресцеина изотиоцианатом (FITC).

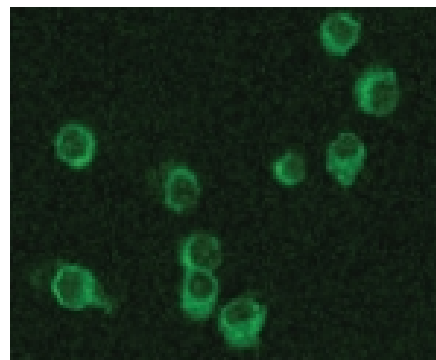


Рис. 6. Люминесцентная микроскопия эритроцитов, несущих FITC-метку ($\times 900$)

Принцип метода. Принцип метода состоит в специфическом связывании поверхностных структур эритроцитов с соответствующим моноклональными антителами, несущими флуоресцирующую метку, интенсивность свечения которой регистрируется визуально методом флуоресцентной микроскопии.

Ход определения. Исследование выполняли согласно рекомендациям, указанным в инструкции фирмы-производителя и в соответствии со стандартным протоколом по иммунофлуоресценции, изложенном на официальном сайте «Santa Cruz Biotechnology, INC» (США). Для этого эритроциты трижды отмывали 1/15 М фосфатным буфером (pH=7,4), ресуспендировали в равном его объеме и готовили мазки на тонких стеклах, которые затем фиксировали 2 мин в холодном ацетоне и высушивали на воздухе. В тонкой части мазка на ограниченную его область наносили 10 мкл раствора моноклональных антител и инкубировали в темноте при $+4^{\circ}\text{C}$ в течении 60 мин. По истечении этого времени раствор антител удаляли и

соответствующую область мазка трижды отмывали 1000 мкл 1/15 М фосфатного буфера (pH=7,4). После третьей отмывки препарат высушивали и микроскопировали с помощью люминесцентного микроскопа «МИКИМЕД-2» («Ломо», Россия) при увеличении 10×90, используя возбуждающий фильтр с длиной волны пропускания 450-480 нм и отрезающий фильтр с длиной волны 515 нм. Положительным результатом считали светящиеся по периферии (в форме кольца или купола, рис. 6) эритроциты, количество которых подсчитывали на 100 клеток (несущих и не несущих метку).

Результаты выражали в %.

2.4.26. Определение концентрации терминального комплекса комплемента, эритропоэтина и фактора некроза опухолей α в крови методом иммуноферментного анализа

Исследование концентрации терминального комплекса комплемента (ТКК), эритропоэтина (ЕРО) в плазме крови и фактора некроза опухолей (TNF) α в сыворотке крови проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с применением коммерческих наборов «Human terminal complement complex (ТСС)» («НВТ», Нидерланды), «Эритропоэтин-ИФА-БЕСТ» и «альфа-ФНО-ИФА-БЕСТ» («Вектор-Бест», Россия). Плазму и сыворотку крови аликвотировали в микропробирки по 300 мкл и хранили до начала исследования при температуре не выше -70°C не более 4 месяцев. Апирогенную сыворотку крови отбирали в стерильные пластиковые микропробирки по 700 мкл и хранили до начала иммуноферментного анализа при температуре не выше -70°C не более 4 месяцев.

Принцип метода. Метод ИФА основан на связывании молекулы человеческого белка с мышинными моноклональными антителами, сорбированными на твердой фазе микропланшета. Внесение растворимых моноклональных антител другого типа, специфичных против независимого эпитопа той же молекулы и конъюгированных с биотином, приводит к фиксации этого вещества в лунках микропланшета. После отмывания избытка этих антител образовавшийся комплекс «антитело-белок-антитело» выявляется путем добавления пероксидазы хрена, конъюгированной со стрептавидином, который имеет высокое сродство к биотину. Дальнейшее внесение субстрата (пероксид водорода) с хромогеном

(тетраметилбензидин) окрашивает раствор, оптическая плотность которого пропорциональна концентрации определяемого вещества и регистрируется колориметрически. Калибровочная кривая строится с использованием среды, не содержащей исследуемый белок («0 доза»), и стандартных растворов вещества с известной концентрацией.

Ход определения. Процедуру выполнения иммуноферментного анализа проводили согласно инструкциям, прилагаемым к соответствующим тест-системам. Предварительно лиофилизированные и концентрированные реагенты наборов разводили согласно инструкции и доводили до комнатной температуры (+18-25⁰С), как и образцы плазмы крови. Сыворотку крови, используемую для определения ТКК, разводили в 10 раз с помощью специального буфера и вместе со стандартами хранили при температуре не выше +4⁰С (на льду) вплоть до внесения в лунки (ячейки) микропланшета. Плазму крови не подвергали предварительному разведению и содержали при комнатной температуре. В качестве стандартов использовали растворы с известной концентрацией изучаемых веществ, включенных в состав наборов (для ЕРО и TNF- α), и их разведения (для ТКК). В роли контрольного реагента («0 дозы») выступал стандарт, не содержащий исследуемый белок (для ЕРО и TNF- α), или буфер для разведения проб (для ТКК).

Во все лунки пустых микропланшетов последовательно вносили по 100 мкл соответствующего контрольного реагента («0 дозы»), стандартных растворов и опытных проб (в дублях). При исследовании цитокинов планшеты инкубировали 45 (ЕРО) или 120 (TNF- α) мин при температуре +37⁰С и непрерывном встряхивании. При оценке ТКК инкубацию осуществляли при температуре +4⁰С в течение 60 мин.

По истечении времени содержимое лунок удаляли и после пятикратной (по 350 мкл на одну ячейку для ЕРО и TNF- α) или четырехкратной (по 200 мкл на одну ячейку для ТКК) отмывки буфером в лунки вносили по 100 мкл растворимых биотинилированных моноклональных антител к человеческому ТКК и TNF- α , а для изучения ЕРО – по 100 мкл моноклональных антител к ЕРО, конъюгированных с пероксидазой хрена. Планшеты инкубировали 30-60 мин при непрерывном встряхивании и температуре +37⁰С (для ЕРО и TNF- α) или +18-25⁰С (для ТКК).

По истечении времени содержимое лунок удаляли и промывали ячейки аналогичным образом. Затем для исследования TNF- α и ТКК в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена, инкубировали еще 30-60 мин при непрерывном встряхивании и температуре +37⁰С (для ЕРО и TNF- α) или +18-25⁰С (для ТКК), после чего повторяли цикл отмывки. В протоколе определения ЕРО данный этап отсутствовал.

Далее методика исследования всех трех белков была аналогична: в лунки вносили 100 мкл раствора субстрата (пероксида водорода) с хромогеном ТМБ и инкубировали 15-30 мин в темноте при комнатной температуре (+18-25⁰С) в защищенном от прямых солнечных лучей месте. Затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл стоп-реагента (раствор серной кислоты для ЕРО и TNF- α или лимонной кислоты для ТКК) в каждую лунку и регистрировали результат.

Учет результатов производили по оптической плотности содержимого лунки с использованием автоматического фотометра для микропланшетов «Анализатор иммуноферментный фотоэлектрический» («Multiskan EX», Финляндия) при длине волны 450 нм, устанавливая нулевое поглощение по лунке с «0 дозой», т.е. контрольным реагентом.

Результаты выражали в виде Ед/мл (ТКК), мМЕ/мл (ЕРО) и пг/мл (TNF- α).

2.4.27. Исследование функциональной активности системы комплемента в крови

Изучение функциональной активности трех путей активации системы комплемента проводили в сыворотке крови методом твердофазного ИФА с помощью коммерческого набора «Wieslab Complement system Screen» («BCM Diagnostics», США). Кровь забирали в стерильные сухие пробирки. Через 15 мин сыворотку отделяли путем центрифугирования в течение 10 мин при 1500 g, помещали в стерильные емкости по 700 мкл и хранили до начала анализа при температуре не выше -70⁰С не более 4 месяцев.

Принцип метода. Метод основан на фиксации в лунках микропланшета специфических активаторов классического, лектинового или альтернативного путей активации системы комплемента, которые после внесения разбавленной сыворотки человека инициируют только соответствующий путь комплемента, а

другие два остаются заблокированы специфическими компонентами дилуэнта (для каждого пути применяется собственный дилуэнт). Индукция каждого из путей активации системы комплемента завершается образованием неоантигена (комплекса C5-9), количество которого определяется по цветовой реакции при внесении в лунки лабильзованных антител к неоантигену, конъюгированных с алкалинфосфатазой, в присутствии субстрата для данного фермента. Концентрация неоантигена (комплекса C5-9) коррелирует с интенсивностью окраски раствора и отражает содержание всех компонентов комплемента, участвующих в соответствующем пути его активации.

Ход определения. Исследование проводили согласно инструкции, прилагаемой к набору «Wieslab Complement system Screen». Перед началом анализа готовили отмывающий раствор путем разведения его концентрата, все растворы доводили до температуры +20-25⁰С. Восстановление позитивного контроля осуществляли разведением лиофилизированной сыворотки здоровых доноров 200 мкл дистиллированной воды. Исследуемые образцы сывороток размораживали на ледяной бане и помещали на лед, как и позитивный контроль. Далее готовили три разведения каждого образца: 5 мкл сыворотки + 500 мкл дилуэнта для классического пути, 5 мкл сыворотки + 500 мкл дилуэнта для лектинового пути, 20 мкл сыворотки + 340 мкл дилуэнта для альтернативного пути. Позитивный и негативный контроль разводили также, как и сыворотку, дилуэнтном для классического пути. В лунки стрипов для определения классического, лектинового и альтернативного путей вносили по 100 мкл соответствующих разведений исследуемой сыворотки, позитивного, негативного контролей и используемого дилуэнта. Смесь инкубировали 60 мин при +37⁰С. Затем лунки опорожняли и трижды отмывали 300 мкл отмывающего раствора, добавляли 100 мкл конъюгата лабильзованных антител с ферментом и инкубировали еще 30 мин при температуре +20-25⁰С. Затем следовало три цикла отмывки аналогичным образом, после чего в лунки вносили по 100 мкл субстратного раствора и снова инкубировали 30 мин при температуре +20-25⁰С. Оптическую плотность содержимого лунок определяли при 405 нм с помощью ИФА-ридера. Уровень функциональной активности каждого пути комплемента вычисляли по формуле:

$$A = (E_{\text{оп}} - E_{\text{нк}}) / (E_{\text{пк}} - E_{\text{нк}}) \cdot 100 \quad (17),$$

где: $E_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы, $E_{нк}$ – оптическая плотность негативного контроля, $E_{пк}$ – оптическая плотность позитивного контроля, 100 – процент активности классического пути активации системы комплемента в позитивном контроле.

По рекомендации фирмы-производителя за 100% функциональной активности системы комплемента принимали функциональную активность классического пути в группе здоровых доноров, обследованных в лаборатории, осуществляющей анализ, и перерасчитывали данные пациентов в соответствии с этой величиной.

Результат выражали в %.

2.5. Статистическая обработка результатов

Обработку полученных результатов проводили общепринятыми статистическими методами исследования 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 ненормальным распределением вариантов использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. При исследовании динамики показателей в попарно связанных выборках, имеющих ненормальное распределение, применяли тест Вилкоксона.

Для качественных признаков рассчитывали частоту их встречаемости в популяции: w – выборочную долю и S_w – среднюю ошибку выборочной доли, выраженные в %. Проверку гипотезы о равенстве долей в двух исследуемых выборках проводили методом угловой трансформации, основанным на преобразовании Фишера, с введением поправки Йейтса на непрерывность. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

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 (как отношение числа лиц с выраженным гемолизом к таковому с умеренной гемоглобинемией в группе больных, имеющих определенный признак, отнесенное к аналогичному соотношению в группе больных, не имеющих его). 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 $p < 0,05$.

Результаты исследований представляли как $\bar{X} \pm m$, где m - ошибка среднего арифметического.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Количественные показатели красной крови у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Анализ клинических карт пациентов показал, что у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза содержание эритроцитов и гемоглобина в крови до операции соответствовало значениям нормы (табл. 6). Наряду с этим, численность эритроцитов в крови на данном этапе у пациентов с умеренной гемоглобинемией определялась на более высоком уровне, чем у больных с выраженным гемолизом ($p_2 < 0,05$).

Таблица 6

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

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

Примечание. Здесь и далее в таблицах №7 - 16: ИБС – ишемическая болезнь сердца, p_k – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров (в контроле); p_1 – по сравнению с показателями у кардиохирургических больных до операции; p_2 – между показателями у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом на соответствующем этапе исследования.

Через 1 сутки после операции количество эритроцитов и гемоглобина в крови у пациентов обеих групп исследования закономерно снижалось по сравнению с нормой и исходными его значениями ($p_k < 0,001$, $p_1 < 0,001$), но в большей степени у больных с выраженным гемолизом, показатели которых достоверно отличались от таковых в группе сравнения (табл. 6).

3.2. Показатели эритропоэза и эритродиереза у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Установлено, что вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования содержание свободного гемоглобина в плазме крови и ретикулоцитов в крови у больных ИБС достоверно превышало норму (табл. 7). Кроме того, в предперфузионном периоде данные показатели у больных с выраженным гемолизом определялись на более высоком уровне, чем у пациентов с умеренной гемоглобинемией ($p_2 < 0,05$).

После хирургического вмешательства концентрация свободного гемоглобина в плазме крови и содержание ретикулоцитов в крови возрастали по отношению к дооперационным значениям у пациентов обеих групп исследования, но в различной степени: при умеренном постперфузионном гемолизе – в 2,4 раза ($p_1 < 0,001$) и 1,9 раза ($p_1 < 0,05$) соответственно, а при выраженной гемоглобинемии – в 5,3 раза ($p_1 < 0,001$) и 1,3 раза соответственно ($p_1 < 0,01$) (табл. 7). При этом уровень свободного гемоглобина в плазме крови, как и величина нормализованного индекса гемолиза (НИГ), у пациентов с выраженной гемоглобинемией в значительной степени превышал таковой у больных группы сравнения ($p_2 < 0,001$), в отличие от численности ретикулоцитов, которая была сопоставимой у обследованных пациентов на данном этапе исследования (табл. 7). Следует отметить, что величина гематокрита после операции (т.е. в момент взятия крови), отражающая степень интраоперационной гемодилюции, не отличалась в группах оперированных лиц (табл. 7).

При соотнесении количества пациентов с умеренной или выраженной гемоглобинемией после искусственного кровообращения (ИК) выяснилось, что частота встречаемости выраженного гемолиза после ИК составляла 34,7% в общей группе больных ИБС.

Таблица 7

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 $p_k < 0,01$ $p_1 < 0,01$
НИГ, мг/дл	————	0,0235±0,0023	0,0657±0,0029 $p_2 < 0,001$
Нст после операции, %	————	30,62±0,84	31,88±1,02
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 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,01$
Концентрация ЕРО в плазме крови, мМЕ/мл	11,24±1,00	14,93±0,90 $p_k < 0,05$	11,10±0,94 $p_2 < 0,05$
		22,65±1,64 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,001$	16,17±1,46 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Концентрация TNF-α в крови, пг/мл	1,77±0,30	3,78±0,29 $p_k < 0,001$	1,95±0,22 $p_2 < 0,05$
		7,52±1,27 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	6,18±1,55 $p_k < 0,01$ $p_1 < 0,05$

Примечание: См. табл. 6, НИГ – нормализованный индекс гемолиза, Нст – гематокрит, TNF-α – фактор некроза опухолей α, ЕРО – эритропоэтин.

Дооперационное исследование концентрации гаптоглобина в плазме крови у кардиохирургических больных зафиксировало высокое его содержание у пациентов с выраженной гемоглобинемией ($p_k < 0,05$) и тенденцию к его повышению у больных с умеренным гемолизом (табл. 7). Выполнение ИК вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза сопровождалось статистически значимым снижением концентрации данного белка в плазме крови менее нормы и значений дооперационного этапа. Тем не менее, учитывая различное исходное содержание гаптоглобина в сравниваемых группах больных, кратность послеоперационного понижения концентрации гаптоглобина была различной: при умеренной гемоглобинемии в 2,1 раза ($p_1 < 0,05$), при выраженной – в 2,6 раза ($p_1 < 0,01$) (табл. 7).

Измерение концентрации эритропоэтина (ЕРО) и $\text{TNF-}\alpha$ в крови у кардиохирургических пациентов обнаружило, что до операции у больных с умеренным гемолизом она была избыточной ($p_k < 0,05$) и превышала величину показателя у пациентов с выраженной гемоглобинемией ($p_2 < 0,05$; табл. 7), который соответствовал таковому у здоровых доноров.

После выполнения хирургического вмешательства концентрации ЕРО и $\text{TNF-}\alpha$ в крови нарастали ($p_k < 0,05$; $p_1 < 0,05$) вне зависимости от выраженности гемолиза, при этом у больных с выраженной гемоглобинемией увеличение уровня $\text{TNF-}\alpha$ в крови было более значимым, чем в группе сравнения (в 3,2 раза ($p_1 < 0,05$) против 2,0 раз ($p_1 < 0,05$) соответственно). Несмотря на сходную динамику изменений содержания ЕРО в крови у больных обеих групп исследования, уровень его в крови у пациентов с умеренной гемоглобинемией после ИК достоверно превышал таковой у больных с выраженным гемолизом ($p_2 < 0,05$, табл. 7).

3.3. Агрегационная способность эритроцитов, содержание эритроцитов, экспрессирующих гликофорины А и В, и фибриногена в крови у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Анализ агрегационной способности красных клеток крови показал, что и до, и после операции коэффициент агрегации эритроцитов у пациентов с умеренным гемолизом соответствовал контрольным значениям, в то время как у больных с

выраженной гемоглобинемией превышал таковые (табл. 8). В послеоперационном периоде изучаемый показатель не претерпевал статистически значимых изменений в обеих группах оперированных лиц, проявляя при этом отчетливую тенденцию к увеличению. Вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза количество эритроцитов в составе агрегата у больных ИБС до и после операции варьировало в пределах нормы (табл. 8).

Таблица 8

Агрегационная способность эритроцитов, содержание гликофорин А⁺ и В⁺ красных клеток в крови и фибриногена в плазме крови 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=51)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=28)
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 $p_k < 0,05$
Количество эритроцитов в агрегате, шт.	9,92±1,32	8,62±0,54	9,90±0,80
		9,98±0,74	9,07±0,82
Содержание в крови гликофорин А ⁺ эритроцитов, %	93,70±1,21	87,40±1,47 $p_k < 0,05$	91,82± 2,55
		95,22±1,20 $p_1 < 0,01$	92,33±1,13
Содержание в крови гликофорин В ⁺ эритроцитов, %	79,60±1,90	68,86±1,54 $p_k < 0,01$	73,37± 2,73
		77,29±1,43 $p_1 < 0,01$	75,61±1,21
Концентрация фибриногена в плазме крови, г/л	3,31±0,15	3,44±0,16	4,29±0,13 $p_k < 0,05$ $p_2 < 0,001$
		3,01±0,14	3,54±0,21 $p_1 < 0,05$

Примечание: См. табл. 6.

Накануне реваскуляризации миокарда у больных с умеренной гемоглобинемией обнаруживался дефицит гликофорин А⁺ и гликофорин В⁺ эритроцитов в крови ($p_k < 0,05$), который нивелировался после хирургического

вмешательства вследствие позитивной динамики показателей ($p_1 < 0,01$). В сравнении с этим, у больных с выраженной гемоглобинемией доля гликофорин A^+ и гликофорин B^+ эритроцитов в крови не подвергалась статистически значимым изменениям после ИК и не отличалась от нормы ни до, ни после операции (табл. 8).

Анализ клинических карт пациентов позволил установить, что содержание фибриногена в плазме крови у больных с выраженным гемолизом было исходно (до операции) повышенным по отношению к аналогичным показателям не только в группе здоровых доноров ($p_k < 0,05$), но и у больных с умеренной гемоглобинемией ($p_2 < 0,001$); после операции регистрировалось снижение ($p_1 < 0,05$) данного показателя до значений у здоровых доноров и пациентов группы сравнения (табл. 8). У больных с умеренным гемолизом концентрация фибриногена в плазме крови в периоперационном периоде находилась в пределах нормы и после операции статистически значимо не изменялась (табл. 8).

3.4. Механическая резистентность и деформируемость эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Определение механической резистентности эритроцитов в дооперационном периоде у больных с умеренным гемолизом констатировало высокий процент лизиса клеток красной крови при механическом воздействии *in vitro* ($p_k < 0,05$), который после проведения ИК оставался на прежнем уровне (табл. 9). У пациентов с выраженной гемоглобинемией изучаемый параметр до операции варьировал в пределах контрольных величин, а после ее завершения возрастал более нормы ($p_k < 0,05$) и показателей дооперационного периода ($p_1 < 0,05$), достигая при этом значений у больных с умеренным гемолизом на соответствующем этапе исследования (табл. 9).

Изучение деформируемости эритроцитов путем оценки индекса ригидности клеток у больных с умеренным гемолизом не выявило статистически значимых отклонений данного показателя от физиологической нормы вне зависимости от этапа исследования (табл. 9), в то время как при выраженной гемоглобинемии индекс ригидности эритроцитов превышал таковой у здоровых доноров ($p_k < 0,05$) и у больных в группе сравнения ($p_2 < 0,05$) как до, так и после операции. Несмотря на

негативную тенденцию, данный параметр не подвергался статистически значимым изменениям в динамике исследования у обеих категорий больных (табл. 9).

Таблица 9

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

Показатели	Здоровые доноры (n=17)	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=43)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=21)
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 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$
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 $p_k < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание: См. табл. 6.

3.5. Характеристика структурной организации липидной фазы мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

3.5.1. Общее содержание холестерина и фосфолипидов в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Изучение структурной организации мембраны эритроцитов выявило достоверное снижение общего содержания фосфолипидов (ФЛ), повышение уровня холестерина (ХС) и ХС/ФЛ-соотношения в ее составе у больных ИБС обеих обследованных групп по сравнению с контрольными значениями как до, так и после операции (табл. 10). При этом у больных с умеренной гемоглобинемией количество ХС и ХС/ФЛ-соотношение в мембране эритроцитов до операции превышали таковые у больных с выраженным гемолизом ($p_2 < 0,05$).

По завершении экстракорпоральной перфузии общее содержание ФЛ и ХС в мембране эритроцитов у пациентов с различной степенью выраженности постперфузионного гемолиза варьировало на уровне дооперационных значений, проявляя лишь разнонаправленные тенденции: при умеренном гемолизе – к повышению ФЛ и снижению ХС, при выраженном – наоборот (табл.10).

Таблица 10

Содержание холестерина, фосфолипидов и холестерол/фосфолипидное соотношение 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=15)	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=18)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=16)
Холестерол, ммоль/мг белка	0,49±0,02	0,66±0,02 $p_k < 0,001$	0,58±0,03 $p_k < 0,05$ $p_2 < 0,05$
		0,61±0,03 $p_k < 0,01$	0,60±0,03 $p_k < 0,05$
Фосфолипиды, ммоль/мг белка	0,52±0,01	0,47±0,02 $p_k < 0,05$	0,46±0,02 $p_k < 0,05$
		0,49±0,01 $p_k < 0,055$	0,43±0,03 $p_k < 0,05$
Соотношение холестерол/фосфолипиды в мембране эритроцитов	0,95±0,04	1,39±0,03 $p_k < 0,001$	1,25±0,04 $p_k < 0,01$ $p_2 < 0,05$
		1,24±0,03 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	1,40±0,06 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание: См. табл. 6, ХС/ФЛ – соотношение холестерол/фосфолипиды в мембране эритроцитов.

Тем не менее, недостоверная реципрокная динамика изучаемых параметров реализовалась в статистически значимое изменение ХС/ФЛ-соотношения после операции, которое уменьшалось у больных с умеренной гемоглобинемией ($p_1 < 0,05$) и возрастало у пациентов с выраженным гемолизом ($p_1 < 0,05$). Благодаря этому в

послеоперационном периоде произошла инверсия величины соотношения ХС/ФЛ между группами больных: до операции его максимальное значение было свойственно пациентам с умеренной гемоглобинемией ($p_2 < 0,05$), а после ИК – с выраженным гемолизом ($p_2 < 0,05$).

3.5.2. Характеристика фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

До операции фосфолипидный спектр мембраны эритроцитов (%) у больных с умеренным постперфузионным гемолизом характеризовался избыточным содержанием лизофосфатидилхолина (лФХ) ($p_k < 0,05$; $p_2 < 0,05$) в сочетании с дефицитом фосфатидилинозитола (ФИ) ($p_k < 0,05$) (табл. 11). После ИК количество ФИ нормализовалось на фоне аналогичной тенденции в отношении лФХ, содержание которого однако не достигало нормы ($p_k < 0,05$). В группе больных с выраженной гемоглобинемией, напротив, до операции содержание лФХ и ФИ в мембране эритроцитов было нормальным. После завершения ИК обнаруживался дефицит ФИ ($p_k < 0,05$) и достоверный рост доли лФХ ($p_1 < 0,05$) (табл. 11).

Относительное количество фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидной кислоты (ФК) в мембране эритроцитов у кардиохирургических больных обеих групп исследования до проведения реваскуляризации миокарда соответствовало величинам в группе контроля (табл. 11). При развитии умеренной гемоглобинемии после операции содержание ФХ в мембране сохранялось на уровне контрольных цифр, в то время как при выраженном гемолизе отмечалось статистически значимое снижение показателя менее таковых, а также ниже исходного его значения и величины у больных группы сравнения на соответствующем этапе исследования. При этом доля ФК в мембране эритроцитов после ИК нарастала по сравнению с дооперационным периодом и нормой вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза ($p_k < 0,05$; $p_1 < 0,05$) (табл. 11).

Относительное содержание сфингомиелина (СФМ) и фосфатидилсерина (ФС) в мембране эритроцитов у больных с выраженным гемолизом на обоих этапах исследования не отличалось от аналогичных величин у здоровых доноров (табл. 11). Между тем, у больных с умеренной гемоглобинемией количество ФС в

Таблица 11

Содержание различных фракций фосфолипидов в мембране эритроцитов у больных с ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операции с искусственным кровообращением ($\bar{X} \pm m$)

Показатели		Здоровые доноры (n=15)	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=15)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=12)
1		2	3	4
Лизофосфатидилхолин (лФХ)	%	2,92±0,15	6,10±0,68 $p_k < 0,05$	2,72±0,41 $p_2 < 0,05$
			4,64±0,41 $p_k < 0,05$	4,55±0,69 $p_1 < 0,05$
	$\times 10^{-3}$ ммоль/ мг белка	15,28±1,06	26,33±1,95 $p_k < 0,01$	13,21±1,89 $p_2 < 0,01$
			23,14±1,40 $p_k < 0,05$	19,57±2,17 $p_1 < 0,05$
Фосфатидил-инозитол (ФИ)	%	10,55±0,64	7,92±0,30 $p_k < 0,05$	9,47±0,96
			8,46±0,58	7,83±0,56 $p_k < 0,05$
	$\times 10^{-3}$ ммоль/ мг белка	52,90±2,60	37,22±3,83 $p_k < 0,05$	42,80±2,96
			44,12±2,89	33,67±3,27 $p_k < 0,01$
Фосфатидил-холин (ФХ)	%	26,76±1,07	24,55±1,25	26,33±1,46
			25,36±1,02	20,66±0,59 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	$\times 10^{-3}$ ммоль/ мг белка	140,92±4,10	115,39±4,50 $p_k < 0,01$	121,12±2,90 $p_k < 0,05$
			124,26±3,04 $p_k < 0,05$	88,95±5,67 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$

1		2	3	4
Сфингомиелин (СФМ)	%	15,20±0,26	14,17±0,99	14,29±1,31
			13,61±0,58	14,62±0,70
	×10 ⁻³ ммоль/ мг белка	74,13±2,30	68,06±3,08	66,73±3,62
			67,58±2,71	65,87±3,10
Фосфатидил- серин (ФС)	%	6,37±0,68	9,24±0,86 p _к <0,05	5,69±1,30
			7,20±1,10	5,43±1,13
	×10 ⁻³ ммоль/ мг белка	31,43±1,90	36,43±2,72	27,14±2,60
			35,28±1,41	23,35±3,40
Фосфатидил- этаноламин (ФЭА)	%	23,61±0,53	21,40±1,61	24,23±0,91
			21,77±0,60	24,92±1,71
	×10 ⁻³ ммоль/ мг белка	124,07±3,30	100,58±3,22 p _к <0,001	110,03±2,82 p _к <0,05
			106,67±2,65 p _к <0,001	107,16±5,13 p _к <0,05
Фосфатидная кислота (ФК)	%	14,42±1,06	15,48±1,74	16,14±1,73
			19,56±1,60 p _к <0,05 p ₁ <0,05	20,43±1,00 p _к <0,05 p ₁ <0,05
	×10 ⁻³ ммоль/ мг белка	75,02±1,10	72,76±3,48	74,24±3,46
			93,18±1,75 p _к <0,05 p ₁ <0,05	89,35±3,01 p _к <0,05 p ₁ <0,05

Примечание: См. табл. 6.

мембране эритроцитов до операции оказалось повышенным ($p_k < 0,05$) при нормальном уровне СФМ, что в послеоперационном периоде сменялось нормализацией первого показателя и тенденцией к снижению второго показателя (табл. 11). Несмотря на существенные различия в фосфолипидном спектре мембраны эритроцитов у кардиохирургических больных с различной степенью выраженности гемолиза, относительное содержание фосфатидилэтаноламина (ФЭА) достоверно не отличалось между группами пациентов и показателями у здоровых доноров как до, так и после операции (табл. 11).

Динамика абсолютного содержания различных фракций ФЛ в эритроцитарной мембране была аналогична таковой для относительного их количества за исключением уровня ФС, ФХ и ФЭА: абсолютное содержание последних в плазмолемме у больных ИБС не достигало значений здоровых доноров, а количество ФС было нормальным независимо от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования (табл. 11).

В целом, следует отметить, что у больных ИБС с выраженным гемолизом соотношение различных фракций ФЛ в мембране эритроцитов до операции соответствовало таковому у здоровых доноров, в отличие от пациентов с умеренной гемоглобинемией, у которых выявлялся избыток лФХ и ФС на фоне дефицита ФИ. После операции ИК развитие умеренного гемолиза сочеталось с нормализацией всех относительных показателей (за исключением уровня лФХ и ФК). При выраженной гемоглобинемии, напротив, формировался дисбаланс в соотношении фракций мембранных ФЛ, проявляющийся увеличением количества лФХ и ФК при недостаточности ФИ и ФХ в мембране эритроцитов.

3.6. Содержание продуктов перекисного окисления липидов в плазме крови и ее общая антиокислительная активность у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Изучение окислительно/антиокислительного баланса плазмы крови у кардиохирургических пациентов обеих групп как до, так и после операции зафиксировало высокую концентрацию в ней диеновых конъюгатов ($p_k < 0,05$) и ТБК-активных продуктов (продуктов перекисного окисления липидов, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой – ТБК) ($p_k < 0,001$) у больных ИБС обеих

обследованных групп по сравнению с контрольными значениями (табл. 12). Общая антиокислительная активность (АОА) плазмы крови в до- и послеоперационном периоде у пациентов с различной степенью выраженности постперфузионного гемолиза имела одинаково низкие значения относительно таковых у здоровых доноров ($p_k < 0,05$) (табл. 12).

Таблица 12

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

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

Примечание: См. табл. 6, ТБК – тиобарбитуровая кислота, АОА – антиокислительная активность.

После операции вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза содержание ТБК-активных продуктов в плазме крови значительно увеличивалось ($p_1 < 0,05$) по сравнению с дооперационным этапом на фоне реципрокного снижения ее общей АОА ($p_1 < 0,05$); при этом количество диеновых конъюгатов в плазме крови не изменялось (табл. 12).

3.7. Содержание продуктов перекисного окисления липидов и активность ферментов в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Оценка процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) позволила установить высокую концентрацию ТБК-активных продуктов и пониженное содержание диеновых конъюгатов в эритроцитах у больных ИБС обеих групп исследования по сравнению с нормой ($p_k < 0,001$) как до, так и после реваскуляризации миокарда (табл. 13). При этом концентрация ТБК-активных продуктов в эритроцитах у больных с выраженной гемоглобинемией в послеоперационном периоде достоверно возрастала по сравнению с показателями до операции, в отличие от значений в группе сравнения, которые после ИК оставались в пределах дооперационных цифр. Наряду с этим, содержание диеновых конъюгатов в эритроцитах после ИК сохранялось на исходно низком уровне независимо от выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 13).

В периоперационном периоде активность супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах определялась ниже нормальных величин как у больных с умеренным ($p_k < 0,05$), так и с выраженным гемолизом, у которых до операции отмечалось незначительно большее (по сравнению с больными другой группы) угнетение активности СОД в эритроцитах ($p_k < 0,001$). Однако лишь у последних показатель статистически значимо увеличивался после ИК по сравнению с дооперационным его значением; при умеренной гемоглобинемии активность СОД оставалась в пределах исходных цифр (табл. 13).

Активность каталазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) в эритроцитах у больных ИБС с умеренным гемолизом вне зависимости от этапа исследования определялась на нижней границе нормы, а у больных с выраженной гемоглобинемией – менее таковой ($p_k < 0,05$) (табл. 13). При выраженном гемолизе оба показателя демонстрировали негативную тенденцию после ИК, что приводило к статистически значимому их уменьшению по сравнению со значениями в группе сравнения, в которой активность каталазы не изменялась, но увеличивалась активность Г-6-ФДГ ($p_1 < 0,05$) (табл. 13).

В целом окислительно/антиокислительный дисбаланс в эритроцитах до операции у больных ИБС с выраженным гемолизом характеризовался более

значимым уменьшением активности ферментов в клетках красной крови (каталазы,

Таблица 13

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

Примечание: См. табл.6, ТБК – тиобарбитуровая кислота, СОД – супероксиддисмутаза, Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа.

Г-6-ФДГ и в некоторой степени СОД), чем у пациентов с умеренной гемоглобинемией при равном содержании продуктов ПОЛ в эритроцитах. После операции развитие выраженного гемолиза сочеталось с интенсификацией ПОЛ и позитивной динамикой СОД в клетках на фоне угнетения активности каталазы и Г-

6-ФДГ. У больных с умеренной гемоглобинемией окислительно-антиокислительный потенциал эритроцитов после операции не претерпевал значительных изменений, более того, активность Г-6-ФДГ даже возрастала.

3.8. Параметры Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа клеток красной крови и средний объем эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Изучение Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа (ГПО) эритроцитов обнаружило нормальные значения скорости гиперполяризации мембраны (V_1) и максимального изменения мембранного потенциала (ΔE) эритроцитов при ГПО у кардиохирургических больных независимо от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования (табл. 14).

Время формирования максимального изменения мембранного потенциала при ГПО эритроцитов (ΔT), т.е. время открытого состояния каналов, как и средний объем эритроцитов, у больных обеих групп исследования до операции также варьировал в пределах физиологической нормы, проявляя негативную динамику после проведения ИК (табл. 14). Послеоперационное уменьшение среднего объема эритроцитов было статистически значимым (по отношению к исходным значениям, $p_1 < 0,05$) в обеих группах больных ИБС и наиболее характерным для пациентов с умеренной гемоглобинемией, у которых данный показатель снижался менее аналогичного параметра в группе сравнения и у здоровых доноров ($p_k < 0,05$; $p_2 < 0,05$). Между тем, изменение параметра ΔT после операции в группах кардиохирургических больных определялось лишь на уровне отрицательной тенденции, которая, напротив, в большей мере была свойственна пациентам с выраженной гемоглобинемией и сопровождалась сокращением (по сравнению с нормой) ΔT у данной категории больных в послеоперационном периоде ($p_k < 0,05$) (табл. 14).

Скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов при ГПО (V_2) у пациентов с умеренной гемоглобинемией регистрировалась на низком уровне относительно нормы как до, так и после операции ($p_k < 0,05$). В другой группе пациентов показатель не отличался от контрольных значений на обоих

этапах исследования, превышая в послеоперационном периоде величину у больных с умеренным гемолизом ($p_2 < 0,05$, табл. 14).

Таблица 14

Параметры гиперполяризационного ответа клеток красной крови и средний объем эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операций с искусственным кровообращением ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n=12)	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=27)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=15)
V_1 , мэквОН ⁻ /(мин×л клеток)	4,79±0,44	4,98±0,34	5,38±0,27
		5,31±0,44	5,04±0,39
ΔE , мВ	1,56±0,06	1,56±0,09	1,65±0,06
		1,55±0,10	1,54±0,08
ΔT , с	45,31±2,71	43,54±2,83	41,15±2,53
		40,30±2,01	36,99±1,92 $p_k < 0,05$
V_2 , мэквН ⁺ /(мин×л клеток)	1,76±0,12	1,35±0,11 $p_k < 0,05$	1,48±0,13
		1,26±0,10 $p_k < 0,05$	1,71±0,14 $p_2 < 0,05$
Средний объем эритроцитов, $\times 10^{-15}$ л	87,45±1,31	92,68±1,12	91,67±1,56
		83,13±0,85 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,01$	86,50±0,91 $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание: См. табл. 6, V_1 – скорость гиперполяризации мембраны эритроцитов при гиперполяризационном ответе эритроцитов (ГПО); V_2 – скорость восстановления мембранного потенциала при ГПО; ΔE – максимальное изменение мембранного потенциала при ГПО; ΔT – время, через которое отмечалась максимальная гиперполяризация мембраны эритроцитов при ГПО.

3.9. Активность Na^+/K^+ -АТФазы, проницаемость мембраны для низкомолекулярных гидрофильных веществ и содержание АТФ в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

У больных с умеренной гемоглобемией активность Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы (Na^+/K^+ -АТФазы) мембраны эритроцитов до операции была пониженной по сравнению со здоровыми донорами ($p_k < 0,05$) и после хирургического вмешательства достоверно не изменялась на фоне нормального содержания внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) в до- и послеоперационном периоде (табл. 15). У пациентов с выраженной гемоглобемией активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов до операции регистрировалась в пределах нормы, но после завершения ИК статистически значимо уменьшалась относительно исходных значений и нормального ее уровня, что происходило в условиях дефицита АТФ ($p_k < 0,05$) в клетках на обоих этапах исследования (табл. 15).

Таблица 15

Активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов, содержание АТФ в клетках и интенсивность мочевиного гемолиза у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операций 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=23)
Активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов, мкмоль P_i /час×мг белка	0,085±0,012	0,052±0,007 $p_k < 0,05$	0,082±0,008 $p_2 < 0,05$
		0,057±0,012 $p_k < 0,05$	0,061±0,012 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$
Содержание АТФ в эритроцитах, мкмоль/гНб	2,95±0,22	2,71±0,21	2,24±0,18 $p_k < 0,05$
		2,46±0,18	2,08±0,27 $p_k < 0,05$
Интенсивность мочевиного гемолиза, % мочевины	1,026±0,012	1,003±0,008	0,971±0,014 $p_k < 0,05$
		0,984±0,008 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$	0,981±0,013 $p_k < 0,05$

Примечание: См. табл. 6, АТФ – аденозинтрифосфат, АТФаза – аденозинтрифосфатаза.

Оценка проницаемости мембраны эритроцитов для низкомолекулярных гидрофильных веществ у пациентов с умеренной гемолобинемией зарегистрировала нормальную величину показателя мочевинового гемолиза (отражает проницаемости мембраны в обратной зависимости), который после операции уменьшался не только по отношению к дооперационному этапу, но и контрольным значениям (табл. 15). Развитие выраженной гемоглобинемии сочеталось с исходно пониженным относительно нормы уровнем мочевинового гемолиза до операции ($p_k < 0,05$), не претерпевающим статистически значимых изменений в постперфузионном периоде (табл. 15).

3.10. Содержание эритроцитов, экспрессирующих молекулы-ингибиторы системы комплемента (CD35, CD55), и функциональная активность системы комплемента у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

В ходе изучения экспрессии на эритроцитах поверхностных структур, регулирующих комплемент-зависимый гемолиз, обнаружилось, что дефицит в крови эритроцитов, несущих CD55-молекулу ($p_k < 0,05$), характерен исключительно для пациентов с выраженным гемолизом как до, так и после операции (табл. 16). Содержание этих клеток у больных с умеренной гемоглобинемией соответствовало норме в до- и послеоперационном периоде, как и количество CD35⁺ эритроцитов у больных обеих групп. При этом статистически значимых изменений в численности CD35⁺ и CD55⁺ эритроцитов в крови у кардиохирургических больных в динамике исследования или между группами пациентов с различной выраженностью гемолиза установлено не было (табл. 16).

При оценке функционального состояния путей активации системы комплемента у больных ИБС нормальная активность (отражает суммарный резерв факторов, участвующих в активации одного из путей) была свойственна только лектиновому пути вне зависимости от степени выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования (табл. 16).

Функциональная активность классического пути системы комплемента до операции у больных с выраженным гемолизом также варьировала в пределах нормы, в то время как у пациентов с умеренной гемоглобинемией превышала ее. В

постперфузионном периоде у больных обеих групп сравнения величина данного показателя статистически значимо снижалась относительно дооперационного этапа, не отличаясь при этом от значений у здоровых доноров (табл. 16).

Таблица 16

Содержание CD35⁺ и CD55⁺ эритроцитов в крови и состояние путей активации системы комплемента у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операций 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 CD35 ⁺ - эритроцитов в крови, %	72,18±10,23	58,09±9,34	52,83±11,21
		65,15±8,90	57,24±10,36
Содержание CD55 ⁺ - эритроцитов в крови, %	84,65±7,13	73,24±8,40	60,12±7,19 p _к <0,05
		82,53±9,07	63,91±7,85 p _к <0,05
Функциональная активность классического пути комплемента, %	100,03±7,12	133,08±8,85 p _к <0,05	117,44±9,88
		103,43±6,06 p ₁ <0,001	96,72±14,14 p ₁ <0,05
Функциональная активность лектинового пути комплемента, %	42,08±11,35	36,81±8,55	28,61±13,07
		37,82±9,22	35,85±14,25
Функциональная активность альтернативного пути комплемента, %	70,01±6,58	72,94±4,88	43,74±7,07 p _к <0,05 p ₂ <0,05
		5,78±1,76 p _к <0,001 p ₁ <0,001	1,37±0,65 p _к <0,001 p ₁ <0,01
Содержание ТКК, ×10 ⁻³ Ед/мл	235,12±26,31	359,05±44,72 p _к <0,05	433,20±36,18 p _к <0,05
		2210,63±104,90 p _к <0,001 p ₁ <0,001	2022,37±68,07 p _к <0,001 p ₁ <0,001

Примечание: См. табл. 6, ТКК – терминальный комплекс комплемента.

Функциональная активность альтернативного пути системы комплемента до операции у больных с умеренным постперфузионным гемолизом соответствовала значениям у здоровых доноров, в то время как у пациентов с выраженной гемоглобинемией отмечалось снижение показателя ниже нормы ($p_k < 0,05$) и величины показателя в группе сравнения ($p_2 < 0,05$) (табл. 16). При этом концентрация терминального комплекса комплемента (ТКК) в сыворотке крови у них, наоборот, была несколько больше, чем у лиц с умеренной гемоглобинемией. Между тем, увеличение количества ТКК в сыворотке крови до операции отмечалось в обеих группах больных ($p_k < 0,05$) (табл. 16).

Послеоперационная динамика данных параметров характеризовалась реципрокными изменениями: в обеих группах больных многократное увеличение содержания ТКК в сыворотке крови ($p_k < 0,001$, $p_1 < 0,001$) происходило на фоне формирования выраженного дефицита факторов альтернативного пути активации системы комплемента ($p_k < 0,001$). Несмотря на отсутствие достоверных отличий после операции между группами больных по данным показателям, обращало на себя внимание, что при выраженной гемоглобинемии менее значимое увеличение содержания ТКК в сыворотке крови (в 4,7 раза ($p_1 < 0,001$) против 6,2 раза ($p_1 < 0,001$) при умеренном гемолизе) сочеталось с более существенным понижением активности альтернативного пути комплемента (в 32 раза ($p_1 < 0,01$) против 13 раз ($p_1 < 0,001$) соответственно) (табл. 16).

3.11. Частота встречаемости антигенов и фенотипов системы АВ0 эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Предполагая возможность модулирующего влияния антигенного состава эритроцитов на структурно-функциональные их свойства и гемолитическую стойкость, в ходе исследования проводили верификацию фенотипов клеток красной крови у больных ИБС по системам групп крови АВ0 и Резус.

Изучение АВ0-фенотипов эритроцитов у больных ИБС установило, что достоверных различий по частоте их встречаемости, а также по частоте встречаемости антигенов А и В на клетках красной крови между группами

кардиохирургических пациентов с умеренным и выраженным гемолизом не отмечалось. Фенотипы распределялись согласно шкале: $0 > A > B \approx AB$ (табл. 17).

Между тем, доля больных ИБС, эритроциты которых несли антиген В (что соответствует В- или АВ-фенотипу), была несколько большей среди пациентов с выраженной гемоглобинемией ($36,53 \pm 6,74\%$ против $23,47 \pm 4,30\%$). Кроме того, у пациентов с умеренным гемолизом достоверно реже регистрировалось наличие на эритроцитах В-антигена, чем А-антигена, или же отсутствие их обоих (0-фенотип: ни А, ни В) в отличие от группы сравнения, в которой частота встречаемости этих антигенных детерминант на эритроцитах была практически равновероятной (табл. 17). Также обращало на себя внимание некоторое преобладание частоты встречаемости 0-фенотипа эритроцитов в структуре АВ0-групп крови у больных с умеренным гемолизом, чего не отмечалось в другой группе пациентов (табл. 17).

Таблица 17

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

Показатели	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=98)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=52)
А-антиген, %	$44,86 \pm 5,02$	$48,07 \pm 7,00$
В-антиген, %	$23,47 \pm 4,30$ *	$36,53 \pm 6,74$
0-фенотип, %	$42,82 \pm 4,99$	$32,69 \pm 6,57$
А-фенотип, %	$33,69 \pm 4,72$	$30,77 \pm 6,46$
В-фенотип, %	$12,24 \pm 3,33$	$19,23 \pm 5,52$
АВ-фенотип, %	$11,22 \pm 3,19$	$17,30 \pm 5,30$

Примечание: *- 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 $p < 0,05$.

3.12. Частота встречаемости антигенов и фенотипов системы Резус эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Оценка частоты встречаемости D-антигена на мембране эритроцитов вне зависимости от наличия других антигенных детерминант системы Резус, что принято в клинической практике и соответствует статусу «резус-положительная кровь», не обнаружило статистически значимых различий между группами больных ИБС (табл. 18).

Таблица 18

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

Показатели	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=83)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=46)
С-антиген, %	79,52±4,45	58,69±7,34 $p_2 < 0,05$
с-антиген, %	75,90±4,72	84,78±5,35
D-антиген, %	84,33±4,02	82,61±5,65
E-антиген, %	21,69±4,55	32,60±6,99
e-антиген, %	100,00±0,00	97,83±2,17

Примечание: См. табл. 6.

Частота встречаемости С-антигена у больных с выраженным гемолизом была ниже ($p_2 < 0,05$), а Е-антигена – несколько выше по сравнению с таковой у больных с умеренной гемоглобинемией после операции (табл. 18). Кроме того, значимой оказалась форма носительства с-антигена: сс-фенотип встречался у больных с выраженным гемолизом чаще, чем у пациентов с умеренной гемоглобинемией ($p_2 < 0,05$) (табл. 19).

Таблица 19

Частота встречаемости неполных фенотипов по системе Резус эритроцитов при умеренном и выраженном гемолизе у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения ($X \pm m$)

Показатели	Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом (n=83)	Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом (n=46)
СС-фенотип, %	24,10±4,72	15,21±5,35
Сс-фенотип, %	55,42±5,49	43,48±7,39
сс-фенотип, %	20,48±4,46	41,30±7,34 p ₂ <0,05
D-фенотип, %	84,33±4,02	82,61±5,65
d-фенотип, %	15,67±4,02	17,39±5,65
ЕЕ-фенотип, %	0,00±0,00	2,17±2,17
Ее-фенотип, %	21,69±4,55	30,43±6,86
ее-фенотип, %	78,32±4,55	67,40±6,99

Примечание: См. табл. 6.

3.13. Взаимосвязь количественных клинико-лабораторных показателей с выраженностью постперфузионной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

С целью установления патогенетических факторов развития постперфузионного гемолиза полученные данные подвергали корреляционному анализу, который выполняли в объединенной выборке больных ИБС, что было необходимым для выявления общих закономерностей реализации гемолитических реакций и поиска прогностических критериев формирования выраженной гемоглобинемии у кардиохирургических пациентов после ИК.

В ходе исследования обнаружено, что концентрация свободного гемоглобина в крови у больных ИБС до операции положительно коррелировала с относительным содержанием в мембране эритроцитов ФЭА, активностью Na^+/K^+ -АТФазы и временем развития максимума Ca^{2+} -индуцированного ГПО красных клеток крови и отрицательно – с величиной коэффициента ХС/ФЛ в мембране эритроцитов, активностью классического пути системы комплемента в сыворотке крови и уровнем мочевинового гемолиза эритроцитов до хирургического вмешательства (табл. 20). При этом относительное содержание в мембране

эритроцитов ФЭА, активность Na^+/K^+ -АТФазы и число гликофорин A^+ и B^+ эритроцитов положительно коррелировали с количеством ретикулоцитов в крови (соответственно: $r = 0,75$, $p < 0,01$; $r = 0,62$, $p < 0,05$; $r = 0,54$, $p < 0,05$; $r = 0,60$, $p < 0,05$),

Таблица 20

Корреляции между концентрацией свободного гемоглобина в крови до и после операции и лабораторными показателями дооперационного периода у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения, вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза

Показатели дооперационного периода	Коэффициент корреляции	
	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови до операции, мг/дл	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл
Активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов	0,56 $p < 0,05$	0,51 $p < 0,05$
ΔT при ГПО эритроцитов	0,49 $p < 0,05$	_____
Содержание ФЭА в мембране эритроцитов	0,72 $p < 0,01$	_____
Соотношение ХС/ФЛ в мембране эритроцитов	-0,56 $p < 0,05$	-0,55 $p < 0,05$
Функциональная активность классического пути комплемента	-0,54 $p < 0,05$	_____
Уровень мочевинового гемолиза эритроцитов	-0,39 $p < 0,05$	_____
Содержание лФХ в мембране эритроцитов	_____	-0,69 $p < 0,01$
Индекс ригидности эритроцитов	_____	0,66 $p < 0,05$
Концентрация $\text{TNF-}\alpha$ в крови	_____	-0,38 $p < 0,05$
Концентрация фибриногена в плазме крови	_____	0,53 $p < 0,01$
Содержание эритроцитов в крови	_____	-0,36 $p < 0,05$
Содержание ретикулоцитов в крови	_____	0,35 $p < 0,05$

Примечание: См. табл. 6–11, 14–16, p – уровень статистической значимости коэффициента корреляции Спирмена.

которое было отрицательно взаимосвязанным с величиной ХС/ФЛ-соотношения в мембране эритроцитов ($r = -0,58$, $p < 0,01$).

Наряду с этим, выраженность постперфузионной гемоглобинемии была положительно взаимосвязанной с активностью Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов, индексом их ригидности и содержанием фибриногена в плазме крови до операции, но негативно коррелировала с величиной ХС/ФЛ-соотношения, количеством лФХ в мембране эритроцитов, концентрацией $\text{TNF-}\alpha$ в крови, численностью эритроцитов и ретикулоцитов в крови на данном этапе исследования (табл. 20).

Среди анализируемых параметров интраоперационного периода у кардиохирургических больных лишь три из них (длительность ИК, максимальное содержание pO_2 в крови и диурез во время операции) проявляли слабую положительную взаимосвязь с уровнем постперфузионной гемоглобинемии (табл. 21).

Таблица 21

Корреляции между уровнем гемоглобинемии после операции в условиях искусственного кровообращения и параметрами интраоперационного периода у больных ишемической болезнью сердца, вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза

Показатели интраоперационного периода	Коэффициент корреляции показателей с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл
Длительность ИК, мин	0,39 $p < 0,05$
Максимальное содержание pO_2 в крови во время операции, мм.рт.ст.	0,41 $p < 0,05$
Диурез во время операции, мл	0,33 $p < 0,05$

Примечание: См. табл. 20.

После операции выраженность постперфузионной гемоглобинемии была позитивно взаимосвязанной с количеством экссудата в плевральной полости и величиной среднего объема эритроцитов, проявляя при этом достаточно тесную негативную связь с относительным содержанием ФХ в мембране эритроцитов, активностью классического пути системы комплемента крови и более слабую

отрицательную связь – с активностью Г-6-ФДГ в эритроцитах, количеством красных клеток в крови после операции и суточным диурезом на 2-е сутки после операции (табл. 22).

Таблица 22

Корреляции между концентрацией свободного гемоглобина в крови и клинико-лабораторными показателями послеоперационного периода у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения, вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза

Показатели послеоперационного периода	Коэффициент корреляции показателей с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл
Средний объем эритроцитов, $\times 10^{-15}$ л	0,40 $p < 0,01$
Доля фосфатидилхолина (ФХ) в мембране эритроцитов, %	-0,66 $p < 0,05$
Функциональная активность классического пути комплемента в сыворотке крови, %	-0,63 $p < 0,05$
Активность Г-6-ФДГ в эритроцитах, мккат/мгНб	-0,48 $p < 0,05$
Содержание эритроцитов в крови, $\times 10^{12}$ /л	-0,47 $p < 0,05$
Объем плеврального экссудата, мл	0,45 $p < 0,01$
Суточный диурез на 2 сутки после операции, мл	-0,34 $p < 0,05$

Примечание: См. табл. 20.

Следует отметить, что при анализе графических зависимостей изучаемых параметров было обнаружено, что в послеоперационном периоде характер распределения значений концентрации ТКК в сыворотке крови и ТБК-активных продуктов в эритроцитах в зависимости от уровня постперфузионной гемоглобинемии отличался при умеренном и выраженном гемолизе. После операции содержание свободного гемоглобина в плазме крови положительно коррелировало с концентрацией ТКК в сыворотке крови только у больных с умеренной гемоглобинемией ($r = 0,61$, $p < 0,05$), в то время как с уровнем ТБК-активных продуктов в эритроцитах – только у пациентов с выраженным гемолизом ($r = 0,58$, $p < 0,05$). Также устанавливалась слабая положительная взаимосвязь между

интенсивностью гемолиза эритроцитов при механическом воздействии *in vitro* (механической резистентностью) до операции и концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови ($r = 0,41$, $p < 0,05$) после ИК у больных с умеренной гемоглобинемией.

3.14. Разработка формулы множественной линейной регрессии, описывающей зависимость уровня постперфузионной гемоглобинемии от клинко-лабораторных показателей до операции у больных ишемической болезнью сердца

Принимая во внимание зависимость уровня постперфузионной гемоглобинемии (результативный признак) от параметров структурно-метаболического статуса эритроцитов и некоторых других клинко-лабораторных показателей (факторных переменных) (табл. 20) полученное множество данных целесообразно было подвергнуть регрессионному анализу с целью выявления математических закономерностей между анализируемыми параметрами до операции и концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после ИК.

Между тем, в построении уравнения множественной регрессии мы задействовали не все изученные величины, поскольку, согласно правилам биомедицинской статистики, ограничением метода регрессионного анализа является использование нормально распределенных и независимых величин. В связи с этим, некоторые факторные переменные, отличающиеся от нормального закона распределения или коррелирующие между собой с коэффициентом корреляции более 0,60, были исключены из базы данных регрессионного анализа. Кроме того, проведение настоящего исследования предполагало выполнение большого количества лабораторных тестов, которые по объективным причинам невозможно было осуществить одновременно у каждого пациента, в результате чего набор экспериментального материала выполняли блоками.

В совокупности указанные выше ограничения обусловили формирование нескольких баз данных, включающих в себя небольшое число факторных переменных, которые давали возможность получения нескольких уравнений регрессии результативного признака.

При анализе статистических параметров выявленных закономерностей (табл. 23) становится очевидным, что наиболее информативным является уравнение №6, описывающее зависимость выраженности постперфузионной гемоглобинемии от концентрации ЕРО, TNF- α в крови и параметров Ca^{2+} -индуцированного ГПО эритроцитов до операции, так как формула значима при уровне статистической значимости $p < 0,05$, достаточно хорошо отражает взаимосвязь между факторами (коэффициент множественной корреляции $R = 0,98$) и объясняет 96% вариации результативного признака вариацией факторных переменных (коэффициент детерминации $R^2 = 0,96$).

Формула №1 также статистически значима, однако описывает лишь 20% вариабельности постперфузионной гемоглобинемии изменениями длительности ИК и максимального парциального давления кислорода во время хирургического вмешательства и имеет низкий коэффициент множественной корреляции (табл. 23). При сопоставлении фактически регистрируемых концентраций свободного гемоглобина в плазме крови у больных ИБС после операции с величинами, рассчитанными на основе полученной формулы множественной регрессии №6 (путем подставления в нее наблюдаемых значений факторных переменных у обследованных пациентов), оказалось, что их значения практически совпадают (табл. 24).

Принимая во внимание обязательное требование о соответствии распределения используемых параметров нормальному закону для применимости уравнения множественной регрессии, следует указать, в каких пределах варьировали значения параметров в обучающей выборке. Так, при уровне статистической значимости $p < 0,05$ доверительный интервал составил: (2,94; 20,14) мМЕ/мл для концентрации ЕРО и (0,21; 6,8) пг/мл для содержания TNF- α в плазме крови; (0,11; 1,01) мВ для амплитуды Ca^{2+} -индуцированного ГПО эритроцитов (ΔE); (0,49; 0,91) мэкВН+/(мин \times л клеток) для скорости восстановления мембранного потенциала при Ca^{2+} -индуцированном ГПО эритроцитов (V_2); (26,16; 60,12) с для времени развития максимальной величины мембранного потенциала при Ca^{2+} -индуцированном ГПО эритроцитов (ΔT). При использовании (в последующем) значений, выходящих за пределы соответствующего

Таблица 23

Результаты регрессионного анализа между клинико-лабораторными показателями до операции и уровнем постперфузионной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца

№	Уравнение множественной линейной регрессии	R	R ²	n	p
1.	$Y = -7,57 + 0,20 \cdot X_{ИК} + 0,13 \cdot X_{pO_2}$	0,44	0,20	33	0,04
2.	$Y = 42,09 - 1,23 \cdot X_{Эр} - 0,36 \cdot X_{Ret} + 5,82 \cdot X_{Фб}$	0,36	0,13	12	0,77
3.	$Y = 222,73 - 145,31 \cdot X_{ХС/ФЛ} - 1,30 \cdot X_{Ret} + 0,27 \cdot X_{IR}$	0,87	0,76	8	0,18
4.	$Y = -344,61 + 456,81 \cdot X_{Na/K} - 5,34 \cdot X_{Kat} + 16,52 \cdot X_{ИФ} + 7,42 \cdot X_{ФС} + 5,06 \cdot X_{ФЭА} + 5,18 \cdot X_{ФК}$	0,96	0,93	9	0,19
5.	$Y = 36,96 + 1,09 \cdot X_{ЕРО} - 1,70 \cdot X_{TNF} + 0,08 \cdot X_{Гапт} - 0,37 \cdot X_{ГФВ}$	0,61	0,38	13	0,37
6.	$Y = 139,60 - 1,43 \cdot X_{ЕРО} - 0,44 \cdot X_{TNF} - 29,20 \cdot X_{ΔE} - 38,64 \cdot X_{V2} - 0,90 \cdot X_{ΔT}$	0,98	0,96	9	0,02

Примечание:

R – коэффициент множественной корреляции,

R² – коэффициент детерминации,

n – количество обследованных пациентов,

p – уровень статистической значимости полученной формулы,

X_{ИК} – длительность искусственного кровообращения,

X_{pO₂} – максимальное значения парциального давления кислорода в крови во время операции.

Параметры дооперационного периода:

X_{Эр} – содержание эритроцитов в крови,

X_{Ret} – содержание ретикулоцитов в крови,

X_{Фб} – содержание фибриногена в плазме крови,

X_{ХС/ФЛ} – соотношение холестерина и фосфолипидное в мембране эритроцитов,

X_{IR} – индекс ригидности эритроцитов,

X_{Na/K} – активность Na⁺/K⁺-аденозинтрифосфатазы мембраны эритроцитов,

X_{Kat} – активность каталазы в эритроцитах,

X_{ИФ} – доля инозитолфосфата в мембране эритроцитов,

X_{ФС} – доля фосфатидилсерина в мембране эритроцитов,

X_{ФЭА} – доля фосфатидилэтаноламина в мембране эритроцитов,

X_{ФК} – доля фосфатидной кислоты в мембране эритроцитов,

X_{ЕРО} – концентрация эритропоэтина в плазме крови до операции,

X_{TNF} – концентрация фактора некроза опухолей α в плазме крови,

X_{Гапт} – концентрация гаптоглобина в плазме крови,

X_{ГФВ} – процент гликофорин В⁺ эритроцитов в крови,

X_{ΔE} – амплитуда гиперполяризационного ответа эритроцитов,

X_{V2} – скорость восстановления мембранного потенциала при гиперполяризационном ответе эритроцитов,

X_{ΔT} – время развития максимальной величины мембранного потенциала при гиперполяризационном ответе эритроцитов.

вышеуказанного доверительного интервала, прогностическая значимость формулы может снижаться.

Таблица 24

Рассчитанные по уравнению множественной регрессии и фактические значения концентрации свободного гемоглобина в крови у больных ишемической болезнью сердца после операций с искусственным кровообращением

Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл	Код пациента								
	124	125	126	129	130	131	132	135	136
Фактическое значение	13,5	28,0	26,5	45,9	56,1	51,0	49,8	63,2	33,0
Расчетное значение	12,5	33,0	28,4	41,1	55,2	52,7	46,1	65,0	32,9

3.15. Результаты дисперсионного и кластерного анализа взаимосвязей постперфузионной гемоглобинемии и клинико-лабораторных показателей у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Неоспоримым доказательством влияния фактора на результативный признак является обнаружение зависимости «доза – эффект», что применительно к настоящему исследованию означает установление факта зависимости степени выраженности постперфузионного гемолиза от различных уровней («доз») действия этиологических и патогенетических факторов внутрисосудистого гемолиза. Среди статистических методов исследования подобную задачу в настоящее время решает дисперсионный анализ, осуществляя проверку гипотезы о сходстве средних значений двух или более выборок, принадлежащих одной и той же генеральной совокупности и сформированных на основе различного (по силе) влияния изучаемого фактора.

Принимая во внимание «биологическое правдоподобие», как одно из требования верификации причинного фактора, дисперсионному анализу были подвергнуты лишь те показатели структурно-метаболического статуса эритроцитов и клинического статуса пациентов, характер изменения которых, обнаруженный нами у больных с выраженным гемолизом, мог бы негативно повлиять на гемолитическую стойкость эритроцитов (согласно биологическим

закономерностям). Кроме того, выполнение подобного анализа было целесообразным в отношении только тех параметров, по которым группы больных с выраженным и умеренным гемолизом достоверно отличались между собой или с группой здоровых доноров.

Учитывая изложенное, лишь некоторые из анализируемых в исследовании параметров были подвергнуты дисперсионному анализу, который проводился в объединенной выборке больных ИБС. В результате было установлено, что наиболее значимым влиянием на выраженность постперфузионного гемолиза обладает деформируемость эритроцитов (индекс ригидности эритроцитов) и содержание фибриногена в плазме крови до операции (табл. 25). Проницаемость мембраны эритроцитов для низкомолекулярных гидрофильных веществ (уровень мочевинового гемолиза), концентрация TNF- α и содержание ретикулоцитов в крови на дооперационном этапе вносят несколько меньший, но достоверный и сопоставимый вклад в вариабельность послеоперационной гемоглобинемии (судя по доле межгрупповой дисперсии в общей дисперсии выборки, табл. 25).

В послеоперационном периоде максимальное воздействие на выраженность постперфузионного гемолиза оказывала величина деформируемости (индекс ригидности эритроцитов), так как этот параметр характеризовался наибольшей долей межгрупповой дисперсии в общей дисперсии выборки (табл. 25). Влияние остальных факторов убывало в следующем ряду: активность Г-6-ФДГ в эритроцитах, средний объем эритроцитов, время развития максимальной величины мембранного потенциала при ГПО эритроцитов (ΔT), активность каталазы в клетках красной крови, концентрация ЕРО в плазме крови и содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах (табл. 25).

Среди анализируемых параметров интраоперационного периода в качестве факторов, индуцирующих гемолиз во время ИК, можно рассматривать продолжительность экстракорпоральной перфузии и степень оксигенации артериальной крови. Поскольку у части пациентов одновременно регистрировались оба показателя, это определило возможность применения двухфакторного дисперсионного анализа, позволяющего установить влияние на уровень гемоглобинемии не только изучаемых факторов в отдельности, но и их сочетанного воздействия. Оказалось, что вклад максимальной величины оксигенации крови и

длительности ИК в вариабельность постперфузионной гемоглобинемии сопоставим и невелик (13,35% и 10,81% соответственно), однако статистически значим (табл. 26). Между тем, сочетанное воздействие обоих факторов не обладает дополнительным влиянием на выраженность гемолиза ($p>0,05$), но проявляет подобную тенденцию (табл. 26).

Таблица 25

Влияние некоторых клинико-лабораторных показателей у больных ИБС на выраженность внутрисосудистого гемолиза после операции с искусственным кровообращением (по результатам однофакторного дисперсионного анализа)

Этапы	Факторные признаки	Доля межгрупповой дисперсии в общей дисперсии выборки, %	p
До операции	Индекс ригидности эритроцитов	39,00	0,019
	Содержание фибриногена в плазме крови	28,80	0,002
	Уровень мочевинового гемолиза	23,62	0,030
	Концентрация TNF- α в крови	21,26	0,015
	Содержание ретикулоцитов в крови	19,61	0,047
После операции	Активность Г-6-ФДГ в эритроцитах	24,71	0,042
	Активность каталазы в эритроцитах	15,17	0,048
	Содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах	10,36	0,049
	Индекс ригидности эритроцитов	45,73	0,014
	Средний объем эритроцитов	23,90	0,028
	Время развития максимальной величины мембранного потенциала при ГПО эритроцитов (ΔT)	18,72	0,049
	Концентрация ЕРО в плазме крови	13,20	0,023

Примечание: TNF- α – фактор некроза опухолей- α , ТБК – тиобарбитуровая кислота, Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ГПО – гиперполяризационный ответ эритроцитов, ЕРО – эритропоэтин, p - уровень статистической значимости влияния изучаемого фактора на выраженность постперфузионной гемоглобинемии.

Фармакологическая тактика ведения кардиохирургических больных с умеренной гемоглобинемией по сравнению с другой группой оперированных лиц отличалась более редким применением метопролола и фозиноприла до операции (табл. 2), а так же большей дозой пентамина, более частым применением этамзилата и редким использованием суксаметония у пациентов с умеренной гемоглобинемией по сравнению с группой оперированных лиц с выраженной постперфузионной гемоглобинемией (табл. 3). Распределение пациентов вне зависимости от выраженности послеоперационного гемолиза на 3 группы (не получавших препарат, получавших его в низкой дозе или высокой дозе) позволило установить методом однофакторного дисперсионного анализа, что применение метопролола, пентамина, этамзилата и суксаметония не влияет на выраженность гемолиза, в то время как назначение фозиноприла оказывает определенный эффект, который, однако, нельзя назвать статистически значимым ($p=0,06$, табл. 27).

Таблица 26

Влияние длительности перфузии и максимальной величины парциального давления кислорода в крови у больных ИБС во время операции на выраженность внутрисосудистого гемолиза после хирургического вмешательства в условиях искусственного кровообращения (по результатам двухфакторного дисперсионного анализа)

Факторные признаки	Доля межгрупповой дисперсии в общей дисперсии выборки, %	p
Длительность ИК	10,81	0,042
Максимальное содержание pO_2 в крови во время операции	13,35	0,025
Взаимодействие факторов (длительности ИК и максимального содержания pO_2 в крови во время операции)	8,92	0,062

Примечание: См. табл. 21, 25.

Другим статистическим методом исследования, способным наглядно отобразить значимость факторов в патогенезе постперфузионного гемолиза, является кластерный анализ, представляющий собой алгоритм классификации объектов на основе классификационных признаков. Подобный анализ изучаемых параметров у больных ИБС на дооперационном этапе во взаимосвязи с уровнем

постперфузионной гемоглобинемии помог бы выявить ключевые факторы риска развития выраженного гемолиза после ИК, а при аналогичной процедуре с показателями постперфузионного периода – установить ведущие патогенетические факторы данного феномена, уточнив результаты дисперсионного анализа.

Таблица 27

Влияние применения фармакологических препаратов у больных ишемической болезнью сердца до и во время операции на выраженность внутрисосудистого гемолиза после хирургического вмешательства в условиях искусственного кровообращения (по результатам однофакторного дисперсионного анализа)

Факторные признаки	Доля межгрупповой дисперсии в общей дисперсии выборки, %	p
Метопролол	2,38	0,593
Фозиноприл	11,15	0,060
Пентамин	7,49	0,558
Этамзилат	5,14	0,357
Суксаметоний	6,65	0,270

Примечание: См. табл. 21, 25.

При выполнении кластерного анализа были использованы 2 классификационных признака, один из которых представлял собой концентрацию свободного гемоглобина в плазме крови после хирургического вмешательства, а другой – какой-либо из клинико-лабораторных показателей у больных ИБС до- или послеоперационного периода. Среди последних кластерному анализу подвергались все параметры, по которым группы пациентов с выраженным и умеренным гемолизом достоверно отличались между собой или относительно группы здоровых доноров. С помощью кластерного анализа «методом К-средних» статистически значимые и близкие к таковым результаты были получены в отношении только некоторых величин.

В исследовании показано, что исходя из уровня постперфузионной гемоглобинемии пациенты достаточно четко распределялись на 2 кластера по индексу ригидности эритроцитов и концентрации TNF- α в крови до операции, а после ИК – по концентрации ЕРО в плазме крови (табл. 28).

Таблица 28

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

Этапы	Классификационные признаки кластеризации	Кластер №1 (X \pm m)	Кластер №2 (X \pm m)	p
До операции	Индекс ригидности эритроцитов до операции, усл.ед.	67,15 \pm 10,12	163,11 \pm 10,04	0,0003
	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл	26,84 \pm 4,65	51,24 \pm 8,66	0,0447
	Содержание TNF- α в плазме крови до операции, пг/мл	4,56 \pm 0,43	2,52 \pm 0,39	0,0014
	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл	24,33 \pm 1,59	48,38 \pm 1,89	0,0000
После операции	Содержание ЕРО в плазме крови после операции, мМЕ/мл	22,78 \pm 1,91	17,68 \pm 1,48	0,0386
	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл	23,14 \pm 1,60	46,75 \pm 1,95	0,0000
	Активность Г-6-ФДГ в эритроцитах после операции, мккат/мгНб	8,03 \pm 0,77	5,42 \pm 0,94	0,0543
	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл	25,69 \pm 2,90	49,72 \pm 2,27	0,0000
	V ₂ после операции, мэквН ⁺ /(мин \times л клеток)	0,53 \pm 0,06	0,71 \pm 0,06	0,0685
	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операции, мг/дл	20,38 \pm 3,00	49,20 \pm 2,97	0,0001

Примечание: См. табл. 25, V₂ – скорость восстановления мембранного потенциала при гиперполяризационном ответе эритроцитов, p – уровень статистической значимости кластеризации (значимости различий дисперсий образованных кластеров).

Это подтверждалось статистически значимыми различиями между кластерами №1 и №2 как по уровню постперфузионной гемоглобинемии, так и по значениям соответствующего (второго) классификационного признака. Кроме того, высоко

вероятную тенденцию к классификации больных по выраженности постперфузионной гемоглобинемии проявляла величина активности Г-6-ФДГ в эритроцитах и скорость восстановления мембранного потенциала при ГПО эритроцитов после операции. Следует отметить, что уровень статистической значимости различий сформированных кластеров по данным показателям лишь немного не достигал 5% предела, в то время как по концентрации свободного гемоглобина в крови после ИК он превышал уровень 0,1% (табл. 28).

3.16. Взаимосвязь качественных показателей клинического статуса больных ишемической болезнью сердца с выраженностью постперфузионной гемоглобинемии

В соответствии с правилами статистического анализа среди многочисленных параметров клинического статуса больных ИБС корреляционному анализу подвергались лишь количественные показатели, что позволило установить положительную корреляцию уровня постперфузионной гемоглобинемии с длительностью ИК, максимальным содержанием pO_2 в крови, интенсивностью диуреза во время ИК (табл. 21) и с объемом плеврального экссудата после операции, а также отрицательную зависимость с объемом суточного диуреза на 2-й день после хирургического вмешательства (табл. 22).

С целью выявления взаимосвязей качественных показателей клинического статуса пациентов с выраженностью постперфузионной гемоглобинемии рассчитывали коэффициенты ее ассоциации для тех параметров, которые статистически значимо отличались между группами больных ИБС с умеренным и выраженным гемолизом – это частота встречаемости заболеваний почек и легких (табл. 1, Глава 2), особенности АВ0- и Резус-фенотипа эритроцитов (табл. 17, 18, 19), потребность в гемотрансфузиях, наркотических анальгетиках и развитие протеинурии после операции (табл. 5, Глава 2). При этом уровень постперфузионной гемоглобинемии представляли в роли качественного признака, имеющего 2 градации – умеренный или выраженный гемолиз. Концентрацию эритроцитов в крови и фибриногена в плазме крови до операции, являющиеся количественными показателями, также выражали как качественный параметр: высокое/низкое содержание эритроцитов (за пороговую величину принимали

значение 4,81 Т/л, исходя из доверительного интервала содержания эритроцитов в крови больных с умеренным гемолизом [4,81; 5,07] (табл. 6); наличие/отсутствие гиперфибриногенемии (более 4 г/л). Данный подход был необходим для определения возможности разработки в последующем шкалы гемолитического риска перфузии, учитывающей одновременно и качественные, и количественные показатели клинического статуса пациента (в качественном представлении).

Полученные в ходе статистического анализа данные демонстрируют низкую, но достоверную ассоциацию выраженности постперфузионного гемолиза с наличием у больных ИБС в дооперационном периоде заболеваний почек (в том числе и с нарушением их фильтрационной функции), а также ассоциацию с невысоким содержанием эритроцитов в крови до операции (менее $4,81 \times 10^{12}/л$) и особенностями их Резус-фенотипа (табл. 29).

Таблица 29

Ассоциация показателей клинического статуса больных ишемической болезнью сердца с формированием выраженной гемоглобинемии после операции

Признак	Коэффициент ассоциации
Заболевания почек	0,39 $p < 0,05$
Заболевания почек с нарушением фильтрационной способности	0,36 $p < 0,05$
Заболевания легких	0,49 $p < 0,01$
Наличие В-антигена системы АВ0 на эритроцитах	0,28
Наличие С-антигена системы Резус на эритроцитах	0,44 $p < 0,05$
Неполный сс-фенотип эритроцитов по системе Резус	0,44 $p < 0,05$
Гиперфибриногенемия до операции (более 4 г/л)	0,62 $p < 0,001$
Невысокое содержание эритроцитов в крови до операции (менее $4,81 \times 10^{12}/л$)	0,38 $p < 0,05$
Гемотрансфузия аллогенной эритроцитарной массы после операции	0,74 $p < 0,001$
Протеинурия после операции	0,48 $p < 0,05$
Потребность в наркотических анальгетиках после операции	0,60 $p < 0,01$

Примечание: р – уровень статистической значимости величины коэффициента ассоциации.

Сопряженность средней силы с уровнем гемоглобинемии после ИК была установлена в отношении встречаемости заболеваний легких до операции и формирования протеинурии после нее (табл. 29). При этом наибольшие значения коэффициента ассоциации оказались характерными для взаимосвязи выраженности постперфузионного гемолиза с наличием гиперфибриногенемии до ИК и с потребностью пациентов в наркотических анальгетиках и гемотрансфузиях аллогенной эритроцитарной массы после хирургического вмешательства (табл. 29).

3.17. Расчет отношения шансов развития выраженной и умеренной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца после операции с искусственным кровообращением и разработка шкалы гемолитического риска перфузии для клинического использования

Несмотря на достоверную корреляцию ряда структурно-метаболических параметров эритроцитов с выраженностью постперфузионного гемолиза и разработку формулы прогноза уровня постперфузионной гемоглобинемии на основе количественных характеристик клеток красной крови (табл. 23), качественные показатели клинического статуса пациента оказываются при этом неучтенными, так как не могут быть подвергнуты регрессионному анализу, хотя именно этими данными располагают кардиохирурги, перфузиологи и анестезиологи-реаниматологи. В связи с этим в настоящем исследовании была предпринята попытка создания балльной шкалы гемолитического риска перфузии (ГРП), доступной для клинического использования. В ее основу были положены значения отношения шансов развития выраженной и умеренной постперфузионной гемоглобинемии у кардиохирургических больных, рассчитанные для параметров, характеризующихся в дооперационном периоде статистически значимыми коэффициентами ассоциации с постперфузионным гемолизом, среди которых были – встречаемость заболеваний почек и легких, особенности Резус-фенотипа эритроцитов, их содержание в крови и концентрация фибриногена в плазме крови до операции (табл. 29).

Поскольку коэффициент ассоциации для частоты встречаемости заболеваний почек (в целом) был несколько больше, чем для патологии почек, сопровождающейся нарушением фильтрационной функции (табл. 29), то в качестве

прогностического критерия был выбран первый. Среди двух параметров Резус-фенотипа эритроцитов, в равной степени ассоциированных с уровнем послеоперационной гемоглобинемии (наличие С-антигена и неполный сс-фенотип) (табл. 29), в качестве фактора прогноза использовали только наличие С-антигена, так как определение С-антигена требует применения только С-цоликлона; сс-фенотипа – одновременно С-цоликлона и с-цоликлона. При равной информативности этих двух показателей в качестве фактора прогноза целесообразнее использовать именно С-антиген.

Расчет величины отношения шансов (OR) развития выраженной и умеренной гемоглобинемии у пациентов после ИК для вышеуказанных факторов прогноза гемолиза показал, что наибольшие его значения были отмечены в отношении частоты встречаемости патологии легких и гиперфибриногенемии, которые наряду с OR для содержания эритроцитов в крови менее $4,81 \times 10^{12}/л$ превышали 1,0 и поэтому расценивались как факторы риска развития выраженного гемолиза. OR для таких признаков, как заболевания почек и экспрессия С-антигена системы Резус на эритроцитах, напротив, имели сопоставимые значения, не достигающие 1, в связи с чем интерпретировались как протективные факторы (табл. 30).

Таблица 30

Показатели относительно риска развития выраженной постперфузионного гемолиза у больных ишемической болезнью сердца

Признак	OR для выраженного гемолиза	К
Заболевания легких	4,80 (1,70; 13,62)	1,33
Гиперфибриногенемия до операции (более 4 г/л)	6,16 (2,46; 15,48)	1,45
Содержание эритроцитов в крови до операции менее $4,81 \times 10^{12}/л$	2,44 (1,03; 5,75)	1,36
Заболевания почек	0,38 (0,16; 0,92)	0,64
Наличие С-антигена системы Резус на эритроцитах	0,42 (0,22; 0,79)	0,81

Примечание: К – соотношение средних концентраций свободного гемоглобина в плазме крови после операции между больными ишемической болезнью сердца, имевшими и не имевшими соответствующий признак.

В виду того, что OR свидетельствует лишь о вероятности развития выраженного гемолиза после операции, не отражая степень влияния соответствующего фактора на уровень гемоглобинемии, для каждого из прогностически значимых признаков было рассчитано соотношение средней концентрации свободного гемоглобина в плазме крови после ИК у больных, имевших соответствующий признак, относительно аналогичного показателя у пациентов, не имевших его (К), вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 30). Величина этого параметра, как и следовало ожидать, определялась наибольшей для гиперфибриногенемии, однако в отношении заболеваний легких и содержания эритроцитов в крови до операции менее $4,81 \times 10^{12}/л$, OR которых отличались в 2 раза, степень влияния каждого из факторов на выраженность гемоглобинемии (К) оказалась сопоставимой. Протективные признаки характеризовались однонаправленным их влиянием, как на вероятность развития выраженной гемоглобинемии, так и на ее уровень – менее значимое отклонение OR от 1,0 для С-антигена эритроцитов сочеталось с менее существенным влиянием этого фактора на выраженность гемоглобинемии (К) и, наоборот, для заболеваний почек (табл. 30).

Согласно изложенному выше, при разработке эмпирической формулы балльной оценки риска развития выраженного постперфузионного гемолиза следует учитывать как вероятность его развития (OR) при наличии прогностического фактора, так и его вклад в уровень гемоглобинемии (К), что возможно осуществить путем перемножения данных коэффициентов. Между тем, если негативные и протективные признаки поставить в один ряд с одноименными знаками, то влияние протективных факторов искусственно и многократно занижается. Поэтому с целью устранения данного несоответствия, было принято решение обозначать факторы риска знаком «+», а протективные признаки знаком «-», при этом представляя последние как риск развития умеренной гемоглобинемии, OR который является обратной величиной OR выраженного гемолиза (гемолиз той или иной степени развивается у 100% больных): $OR'_{\text{умерен}} = 1/OR_{\text{выраж}}$; $K'_{\text{умерен}} = 1/K_{\text{выраж}}$.

Тогда для заболеваний почек $OR'_{\text{умерен}} = 1/0,38=2,63$ и $K'_{\text{умерен}} = 1/0,64=1,56$; для С-антигена $OR'_{\text{умерен}} = 1/0,42=2,38$ и $K'_{\text{умерен}} = 1/0,81=1,24$. Таким образом,

формула расчета суммарного балла ГРП должна представляться как разность между риском развития выраженного гемолиза и риском развития умеренной гемоглобинемии:

$$\text{ГРП} = (\text{OR}_{\text{лег}} \times \text{K}_{\text{лег}} \times \text{X}_{\text{лег}} + \text{OR}_{\text{ГФб}} \times \text{K}_{\text{ГФб}} \times \text{X}_{\text{ГФб}} + \text{OR}_{\text{Эр}} \times \text{K}_{\text{Эр}} \times \text{X}_{\text{Эр}}) - (\text{OR}'_{\text{поч}} \times \text{K}'_{\text{поч}} \times \text{X}_{\text{поч}} + \text{OR}'_{\text{С}} \times \text{K}'_{\text{С}} \times \text{X}_{\text{С}}) \quad (18),$$

где: $\text{X}_{\text{лег}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) болезней легких;

$\text{X}_{\text{ГФб}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) гиперфибриногенемии до операции;

$\text{X}_{\text{Эр}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) концентрации эритроцитов в крови до операции менее $4,81 \times 10^{12}/\text{л}$;

$\text{X}_{\text{поч}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) болезней почек;

$\text{X}_{\text{С}}$ – наличие (1)/отсутствие(0) на эритроцитах С-антигена системы Резус;

$\text{OR}_{\text{лег}}$, $\text{OR}_{\text{ГФб}}$, $\text{OR}_{\text{Эр}}$ – относительные риски развития выраженной гемоглобинемии при наличии соответствующих факторов;

$\text{OR}'_{\text{поч}}$, $\text{OR}'_{\text{С}}$ – относительные риски развития умеренной гемоглобинемии при наличии соответствующих факторов;

$\text{K}_{\text{лег}}$, $\text{K}_{\text{ГФб}}$, $\text{K}_{\text{Эр}}$ – соотношение средних концентраций свободного гемоглобина в плазме крови после операции между больными ИБС, имевшими и не имевшими соответствующий признак;

$\text{K}'_{\text{поч}}$, $\text{K}'_{\text{С}}$ – величина, обратная соотношению средних концентраций свободного гемоглобина в плазме крови после операции между больными ИБС, имевшими и не имевшими соответствующий признак.

Подставив в данную формулу соответствующие величины OR и K, получим:

$$\text{ГРП} = (4,80 \times 1,33 \times \text{X}_{\text{лег}} + 6,16 \times 1,45 \times \text{X}_{\text{ГФб}} + 2,44 \times 1,36 \times \text{X}_{\text{Эр}}) - (2,63 \times 1,56 \times \text{X}_{\text{поч}} + 2,38 \times 1,24 \times \text{X}_{\text{С}}) = (6,38 \times \text{X}_{\text{лег}} + 8,93 \times \text{X}_{\text{ГФб}} + 3,32 \times \text{X}_{\text{Эр}}) - (4,10 \times \text{X}_{\text{поч}} + 2,95 \times \text{X}_{\text{С}}) \quad (19).$$

С целью установления критической величины балла ГРП, предсказывающей формирование выраженной гемоглобинемии после операции с ИК, разработанная эмпирическая формула расчета ГРП (19) была применена в отношении 46 пациентов (25 пациентов с умеренным и 21 пациента с выраженным гемолизом), у которых мы одновременно определяли все показатели, используемые в уравнении. Обнаружилось, что значение ГРП в общей популяции больных ИБС варьировало от -6,86 балла до +12,25 балла и положительно коррелировало с концентрацией свободного гемоглобина после операции ($r=0,61$, $p<0,01$) (рис. 7). Вычисление

среднего балла ГРП в группе пациентов с выраженной гемоглобинемией продемонстрировало достоверно большие значения показателя, чем в альтернативной когорте пациентов ($8,85 \pm 0,44$ балла против $-0,15 \pm 0,86$ балла, $p < 0,001$). Так как стандартное отклонение значения ГРП в первом случае составило $\pm 2,00$ балла, а во втором $\pm 4,29$ балла, то, согласно «правилу 2σ », 95% значений ГРП у больных с выраженным гемолизом находится в диапазоне (4,85; 12,85). Для пациентов с умеренным гемолизом это правило было неприменимо, поскольку распределение величины ГРП у них не соответствовало нормальному закону.

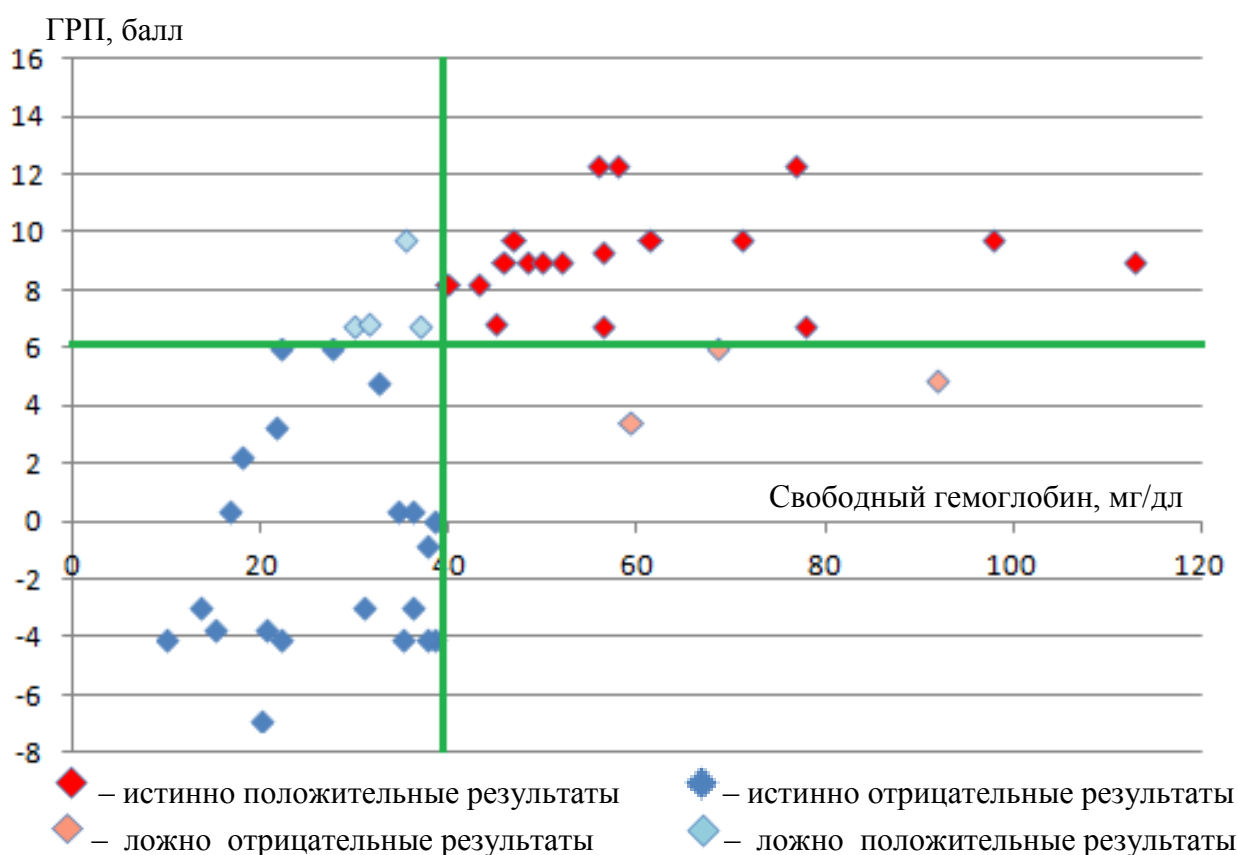


Рис. 7. Распределение балла гемолитического риска перфузии (ГРП) у кардиохирургических пациентов в зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза.

Между тем, оказалось, что интервалу (4,85; 12,85) принадлежат не только значения ГРП у больных с выраженным гемолизом, но и у пациентов с умеренной гемоглобинемией. Учитывая, что величина ГРП не является непрерывной, а принимает строго определенные значения (дискретна), то после исключения из выборки пациентов с умеренной гемоглобинемией аутсайдера (9,70 балла) данному диапазону соответствовали только 3 значения ГРП, встречающиеся в обеих

группах больных, – это 5,96; 6,74 и 6,79 балла. Путем анализа характера распределения ГРП в зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (рис. 7) и вычисления параметров диагностической значимости ГРП (его чувствительности, специфичности и диагностической эффективности) при каждом из трех значений критической величины (5,96; 6,74 или 6,79 балла) попеременно было установлено, что наибольшей диагностической значимостью показатель ГРП обладает в том случае, если в качестве порога принимается цифра 5,96 (т.е. порог равен 6,0 баллов).

Таким образом, если для определенного пациента рассчитанное по эмпирической формуле (19) значение ГРП до операции превышает величину 6,0 баллов, то после ИК следует ожидать развитие выраженного гемолиза и вероятность этого события составляет 0,818 (в настоящем исследовании у 18 из 22 больных ИБС, которым по ГРП прогнозировалось развитие выраженной гемоглобинемии и она действительно сформировалась) (табл. 31).

Таблица 31

Параметры диагностической информативности шкалы гемолитического риска перфузии у больных ишемической болезнью сердца

Параметр диагностической информативности ГРП	Формула расчета параметра (Камышников В.С., 2000)	Величина параметра диагностической информативности ГРП, %
Диагностическая чувствительность, %	$ИП/(ИП+ЛО)$	85,7
Диагностическая специфичность, %	$ИО/(ИО+ЛП)$	84,0
Диагностическая эффективность, %	$(ИП+ИО)/(ИП+ИО+ЛП+ЛО)$	84,8
Предсказательная ценность положительного результата, %	$ИП/(ИП+ЛП)$	81,8
Предсказательная ценность отрицательного результата, %	$ИО/(ИО+ЛО)$	87,5

Примечание: ГРП – гемолитический риск перфузии; ИП – истинно положительный результат, ИО – истинно отрицательный, ЛП – ложно положительный, ЛО – ложно отрицательный результаты.

Следовательно, предсказательная ценность положительного результата равняется 81,8%, которая вместе с предсказательной ценностью отрицательного

результата, равной 87,5% (у 21 из 24 больных ИБС прогноз умеренного гемолиза по ГРП подтвердился), характеризует прогностическую значимость разработанного параметра (табл. 31).

Вычисление диагностической чувствительности, специфичности и эффективности применения шкалы ГРП продемонстрировало высокие значения данных характеристик, превышающие необходимый уровень в 80% (табл. 31), что подтверждает диагностическую надежность использования данной системы прогноза выраженного постперфузионного гемолиза у кардиохирургических больных по разработанной эмпирической формуле (19).

Таким образом, создание шкалы ГРП, величина балла которой определяется по эмпирической формуле, учитывающей не только доступные для анализа количественные показатели клинического статуса пациента, но и качественные его характеристики, не поддающиеся регрессионному анализу, позволяет еще на дооперационном этапе с высокой вероятностью прогнозировать у кардиохирургических больных развитие умеренного или выраженного гемолиза после ИК.

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Развитие внутрисосудистого гемолиза у кардиохирургических больных во время и после операций с искусственным кровообращением (ИК) является неизбежным компонентом постперфузионных реакций организма при хирургических вмешательствах на остановленном сердце [Wright G., 2001; Vercaemst L., 2008]. В ходе экстракорпоральной перфузии эритроциты подвергаются механической травме, действию низких и высоких температур, цитодеструктивному влиянию системы комплемента и свободных радикалов, инициирующих альтерацию и гибель клеток красной крови [Mulholland J. et al., 2000; Чарная М.А. и соавт., 2006; Дементьева И.И. и соавт., 2008; Vercaemst L., 2008; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Чрезмерная интенсификация гемолитических реакций создает угрозу формирования почечной и дыхательной дисфункции, легочной и системной гипертензии, а при массивном гемолизе – индуцирует внутрисосудистое свертывание крови и полиорганную недостаточность [Deem S. et al., 2002; Воробьев А.И., 2005; Jeffers A. et al., 2006; Дементьева И.И. и соавт., 2008; Naase M. et al., 2010; Kato G.J., Taylor J.G., 2010].

Между тем, степень выраженности гемоглобинемии, очевидно, зависит не только от типа применяемых перфузионных систем и длительности ИК, но и от состояния пациента на момент хирургического вмешательства, а также структурно-функционального статуса эритроцитов, особенности которого определяют судьбу клеток в экстракорпоральном контуре. При этом у кардиохирургических пациентов, не страдающих гематологической патологией, данное предположение не имеет четкого научного обоснования и на сегодняшний день можно говорить лишь об исходно пониженной гемолитической стойкости эритроцитов к факторам экстракорпоральной перфузии у больных с массивным интраоперационным гемолизом. Между тем, резистентность эритроцитов к каждому из факторов ИК может определяться их микрореологическими свойствами и особенностями молекулярной организации клетки – экспрессией молекул-ингибиторов системы комплемента (CD35, CD55) и сialосодержащих гликофоринов на клеточной мембране, ее белково-липидной структурой, активностью ион-транспортирующих систем и ферментов антиоксидантной защиты, а также содержанием аденозинтрифосфата (АТФ) в цитозоле [Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., 2001;

Ройтман Е.В. и соавт., 2001; Давыдкин И.Л. и соавт., 2002; Gerrah R. et al., 2003; Кленова Н.А., Фатенков О.В., 2004; Новицкий В. В. и соавт., 2004; Короткина Р.Н. и соавт., 2005; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Vercaemst L., 2008; Rybka J. et al., 2011; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011]. Приходится констатировать, что выделить ключевой фактор в патогенезе выраженной деструкции эритроцитов во время ИК у больных ИБС в настоящее время не представляется возможным, как и неизвестны предрасполагающие этиологические факторы подобной реакции.

Для поиска ответов на столь важные вопросы перфузиологии и кардиохирургии было предпринято исследование структурно-метаболического статуса эритроцитов у больных ИБС с умеренной (концентрация свободного гемоглобина в плазме крови менее 40 мг/дл) и выраженной (концентрация свободного гемоглобина в плазме крови 40 мг/дл и более) гемоглобинемией после операций коронарного шунтирования с применением ИК, осуществляемого с использованием идентичного перфузионного оборудования и в сопоставимых условиях перфузии во время операции.

Результаты проведенного исследования показали, что концентрация свободного гемоглобина в плазме крови у больных ИБС обеих групп сравнения превышала контрольные значения не только после операции, но и до ее проведения (табл. 7). Последнее, видимо, отражает дисфункцию эритроцитов на фоне атеросклероза, ведущую к ускоренной их гибели и компенсаторной активации эритропоэза. Известно, что избыточное содержание холестерина (ХС) в мембране эритроцитов при атеросклерозе сопровождается повышением ее микровязкости, что затрудняет функционирование систем трансмембранного ионного транспорта, подвергающихся частичной деградации под действием большого количества свободных радикалов, генерируемых в эритроцитах в условиях дефицита эндогенных антиоксидантов [Рязанцева Н.В., 2001; Новицкий В.В., и соавт., 2004; 2006; Солоха Л.Н., Пушников А.А., 2007; Geetha A. et al., 2007; Krzystek-Korpaska M. et al., 2010]. В целом это определяет снижение деформируемости эритроцитов и обуславливает их гибель путем внутриклеточного гемолиза при прохождении клеток через селезеночный фильтр, а также лежит в основе естественного старения зрелых клеток эритроидного ряда и активируется при патологии [Glader B., 2004; Воробьев А.И., 2005]. Однако развитие внутриклеточного гемолиза не

сопровождается поступлением свободного гемоглобина в плазму крови [Воробьев А.И., 2005; Рязанцева Н.В. и соавт., 2008; Уразова О.И., Новицкий В.В., 2008], поэтому гемоглобинемия у больных ИБС обеих групп исследования до операции можно расценивать как признак внутрисосудистого гемолиза, который в большей степени проявляется у больных с выраженной постперфузионной гемоглобинемией. Причиной этого может быть как непосредственная травма эритроцитов с пониженной механической резистентностью в условиях аномального тока крови в непосредственной близости от атеросклеротической бляшки, так и комплемент-зависимый лизис клеток на фоне чрезмерной активации системы комплемента.

После операции степень выраженности гемоглобинемии у больных ИБС обеих групп исследования еще более нарастала по сравнению с исходными значениями (табл. 7). Традиционно, внутрисосудистое разрушение клеток крови во время ИК связывают с механической травмой эритроцитов, обусловленной формированием турбулентного потока крови с критической величиной сдвигового напряжения, действием струйных сил, 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]. Кроме того, негативное влияние на гемолитическую стойкость эритроцитов во время ИК оказывают гипероксемия и активация 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. 4), в то время как уровень постперфузионной гемоглобинемии – в 2,6 раза (табл. 7). Более того, вычисление нормализованного индекса гемолиза (НИГ), учитывающего гемодилюцию и длительность ИК и, соответственно, нивелирующего их влияние на выраженность постперфузионного гемолиза [Kawahito S. et al., 2002, Дементьева И.И. и соавт., 2010], обнаружило почти 3-кратное превышение данного показателя у кардиохирургических больных

с выраженным постперфузионным гемолизом, по сравнению с пациентами, проявляющими умеренную гемоглобинемию после экстракорпоральной перфузии (табл. 7). Следовательно, массивный лизис эритроцитов нельзя объяснить только большей продолжительностью экстракорпоральной перфузии.

К подобному выводу пришли Дементьева И.И. и коллеги [2010], которые установили, что при нормотермическом ИК время перфузии оказывает неравнозначное влияние на выраженность гемолиза: при непродолжительном (менее 60 мин) экстракорпоральном кровообращении НИГ не превышает допустимых значений (до 0,0500 мг/дл), в то время как при длительном ИК (более 60 мин) НИГ возрастает практически в 2 раза. Тем не менее, в пределах временного диапазона от 60 до 240 мин увеличение длительности ИК не сопровождается достоверным ростом НИГ. Последнее отмечается только после 240-й минуты ИК [Дементьева И.И. и соавт., 2010].

Исходя из вышеизложенного и учитывая то, что одним из критериев исключения больных из настоящего исследования являлось время перфузии более 240 мин, а средняя продолжительность ИК в группах кардиохирургических больных составляла 100-120 мин, можно с уверенностью заключить, что длительность экстракорпоральной перфузии не может быть причиной столь значимых различий в интенсивности гемолитических реакций у обследованных групп пациентов. Это же подтверждается и результатами статистического анализа, которые демонстрируют слабую положительную корреляционную связь между временем ИК и концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после операции (табл. 21), при этом двухфакторный дисперсионный анализ показал, что лишь 10,8% вариабельности постперфузионной гемоглобинемии обусловлено вариацией времени ИК (табл. 26).

Другими факторами экстракорпоральной перфузии, индуцирующими интраоперационное разрушение эритроцитов, являются функционирование коронарного отсоса и степень оксигенации крови во время хирургического вмешательства [Mulholland J. et al., 2000; Короткина Р.Н. и соавт., 2005; Vercaemst L., 2008]. Между тем, скорость работы коронарного отсоса и среднее (за операцию) значение парциального давления кислорода в артериальной крови (pO_2) были сопоставимыми в группах кардиохирургических пациентов (табл. 4), а значит, не

могли повлиять на интенсивность внутрисосудистого гемолиза. Обращало на себя внимание, что у больных с выраженной гемоглобинемией максимальное значение pO_2 в крови во время операции превышало аналогичный показатель у пациентов с умеренным гемолизом (табл. 4). Однако различие по этой величине между группами пациентов было небольшим, чтобы вызвать столь значимое изменение уровня постперфузионной гемоглобинемии. К тому же, максимальное значение pO_2 в крови, как и длительность ИК, слабо коррелировало с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после операции (табл. 21), а дисперсионный анализ подтвердил низкий вклад этой величины в вариабельность постперфузионного гемолиза – всего 13,4% (табл. 26). Кроме того, сочетанное влияние обоих факторов (времени ИК и максимального значения pO_2 в крови) на интенсивность разрушения эритроцитов во время операции не было статистически значимым (табл. 26), т.е. они не потенцируют друг друга, а гемолитический эффект от их одновременного воздействия равен сумме эффектов от их изолированного влияния.

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

Как известно, поведение эритроцитов в потоке крови определяется их агрегируемостью, деформируемостью и стабильностью, зависящими от структурной организации их мембраны и цитоскелета, а также ряда параметров интра- и экстрацеллюлярной среды [Левтов В.А. и соавт., 1982; Сторожок С.А. и соавт., 1997; Bhattacharya A., 2011; Муравьев А.В. и соавт., 2012]. При увеличении агрегационной способности или снижении деформируемости эритроцитов вязкость крови нарастает и высокое сопротивления току крови требует большего градиента давления, что может привести к альтерации форменных элементов крови [Левтов В.А. и соавт., 1982]. При этом известно, что агрегируемость эритроцитов в условиях

низкой скорости кровотока (*in vivo* имеет место в сосудах венозного русла) определяет порядка 60% периферического сопротивления [Cabel M. et al., 1997]. Деформируемость эритроцитов имеет значение в пределах капиллярной сети, где просвет сосудов сопоставим с диаметром эритроцитов (или меньше, чем он), а стабильность мембраны эритроцитов – в крупных артериальных магистральных с высокой скоростью потока крови, обеспечивая, тем самым, сохранение целостности клеток красной крови [Сторожок С.А. и соавт., 1997].

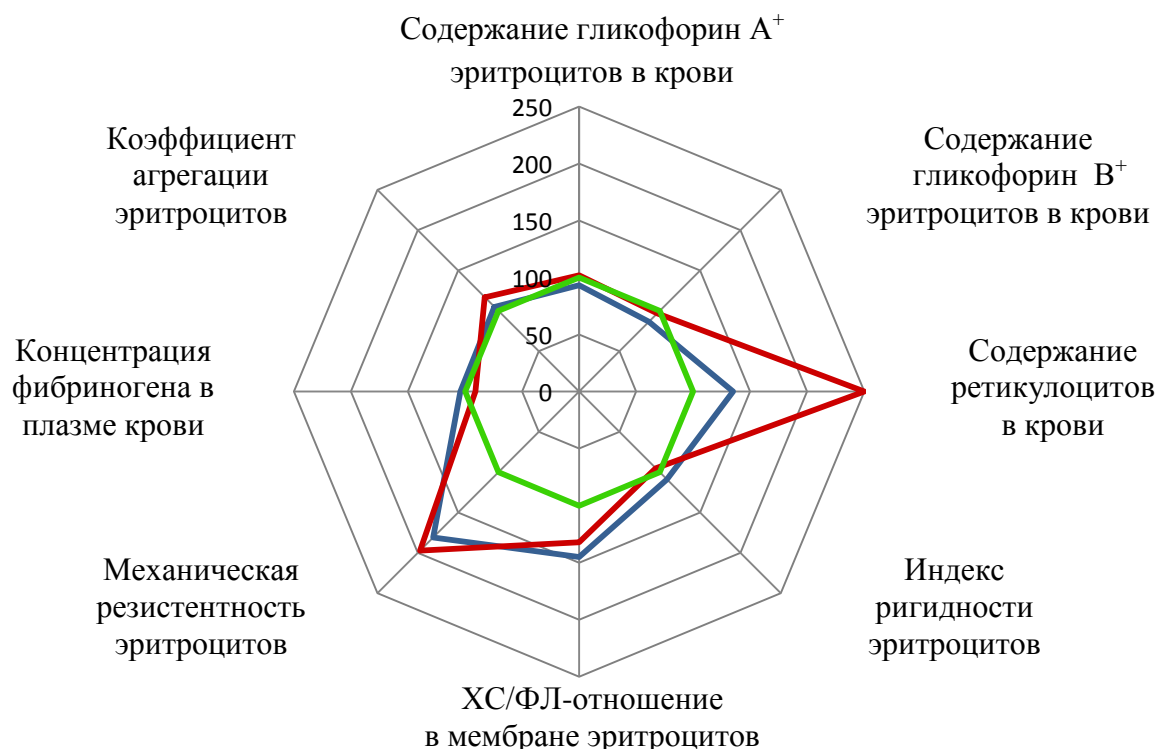
Исходя из технических особенностей модулей аппарата ИК [Меньшугин И.Н., 1998; Солтоски П.Р. и соавт. 2005], проявление агрегируемости эритроцитов наиболее вероятно в кардиотомном резервуаре, имеющем наибольший диаметр и объем; деформируемости клеток – в оксигенаторе, имитирующем легочную капиллярную сеть; свойства стабильности мембраны – в перфузионных магистральных, насосах и канюлях, которые имеют малый просвет и сопряжены с воздействием высокого давления.

Изучение агрегационных свойств эритроцитов показало, что коэффициент агрегации их у больных ИБС с умеренной гемоглобинемией до и после ИК соответствовал норме, а у пациентов с выраженной гемоглобинемией превышал ее (табл. 8, рис. 8). При этом размер агрегатов (количество эритроцитов в агрегате) у больных обеих групп исследования не отличался от параметра у здоровых доноров вне зависимости от этапов исследования (табл. 8, рис. 8).

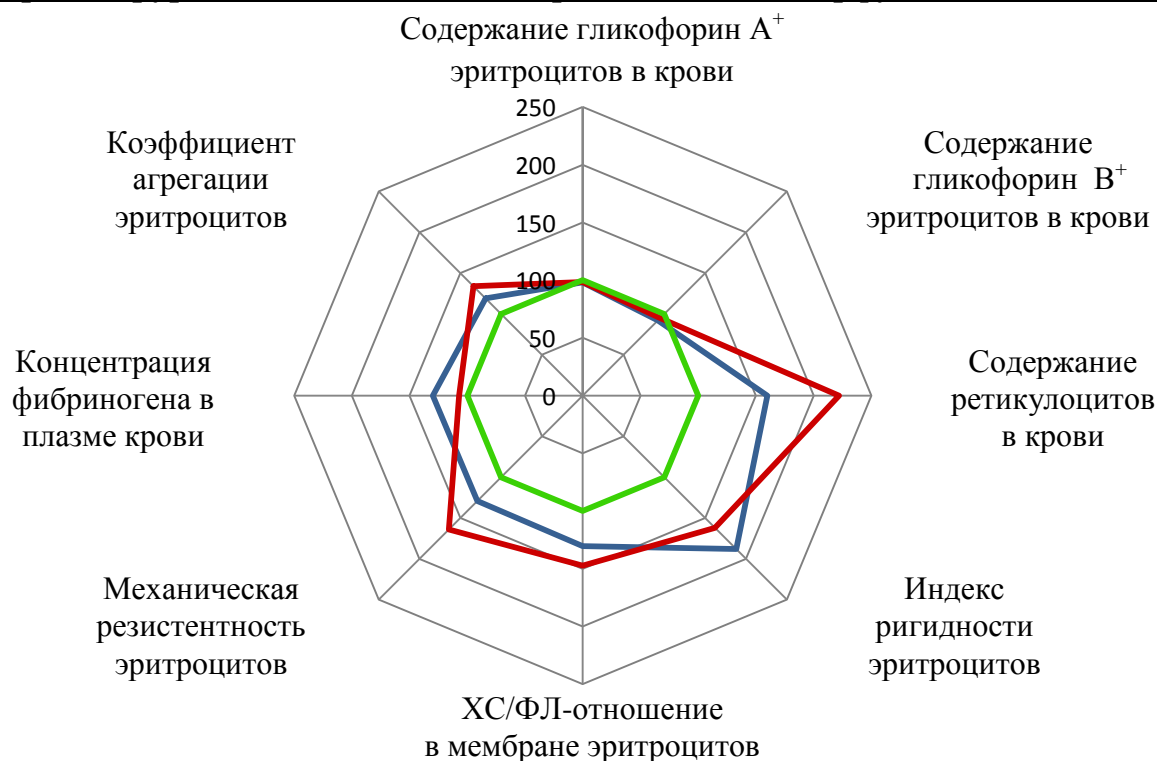
Увеличение агрегируемости эритроцитов (или тенденция к ее повышению) у больных ИБС, очевидно, связано с течением основного и наличием сопутствующих заболеваний. Показано, что агрегационная активность эритроцитов значительно возрастает при некоторых заболеваниях, таких как ИБС, гипертоническая болезнь, ишемические инсульты, сахарный диабет, а также при онкологических, воспалительных, инфекционных и аутоиммунных заболеваниях, неотложных состояниях, обусловленных травмой, и при хирургических вмешательствах [Ройтман Е. В., 2003; Муравьев А. В., 2006; Широкова Т. Е., 2007; Spengler M.I. et al., 2011; Ослякова А.О., Тихомирова И.А., 2012; Arbel Y. et al., 2012].

Универсальность данного феномена при патологии, вероятно, объясняется широким спектром модулирующих его факторов, таких как поверхностный заряд мембраны эритроцитов, их морфологические свойства, содержание фибриногена и

Кардиохирургические больные с умеренным постперфузионным гемолизом



Кардиохирургические больные с выраженным постперфузионным гемолизом



— Здоровые доноры — До операции — После операции

Рис. 8. Содержание гликофорин A⁺, B⁺ эритроцитов и ретикулоцитов в крови, фибриногена в плазме крови, величина холестерол-фосфолипидного отношения в мембране эритроцитов и их микрореологические характеристики у больных ишемической болезнью сердца с различной степенью выраженности постперфузионного гемолиза (по осям — % от контрольных значений).

Примечание: ХС — холестерол, ФЛ — фосфолипиды.

иммуноглобулинов в плазме крови, а также контакт крови с инородными поверхностями и др. [Ройтман Е.В., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Henkelman S. et al., 2012].

Интересно, что в послеоперационном периоде агрегационная активность эритроцитов как у больных с умеренным, так и с выраженным гемолизом принципиально не изменялась, хотя и отмечалась отчетливая тенденция к увеличению коэффициента агрегации относительно дооперационного этапа (табл. 8). Следует отметить, что в литературе нет единого мнения о влиянии ИК на агрегируемость клеток красной крови. По мнению одних авторов, агрегационная способность эритроцитов после экстракорпоральной перфузии снижается вследствие гемодилюции [Graaff R. et al., 2004; Morariu A.M. et al., 2006], по другим данным – усиливается на фоне снижения деформируемости эритроцитов после оперативного вмешательства, поскольку горизонтальное положение больного и воздействие общей анестезии способствуют замедлению кровотока в периферических сосудах на 50%, что создает благоприятные условия для максимального проявления гемореологических расстройств [Muller R., 1987; Zhang S., Yao S., 2004; Морозов Ю.А., 2007; Кузник Б.И., 2010].

Тем не менее, у больных с выраженным гемолизом агрегационная активность эритроцитов оказалось повышенной как до, так и после операции, в основе чего могут лежать различные механизмы. Известно, что агрегируемость эритроцитов обратно пропорциональна величине их поверхностного заряда. В норме мембрана эритроцитов имеет отрицательный электрический заряд, создающий ζ -потенциал (разность потенциалов между эритроцитом и плазмой), величина которого определяется в основном наличием на поверхности клеток различных макромолекул: с одной стороны электроотрицательных сиаловых кислот, а с другой – белков, адсорбированных из плазмы и экранирующих заряд [Левтов В.А. и соавт, 1982; Ройтман Е.В., 2001; Шперлинг И.А. и соавт. 2006; Кузник Б.И., 2010]. Таким образом, агрегационная энергия между соседними эритроцитами определяется балансом между энергией объединения за счет макромолекул, адсорбированных на клетках, и дезагрегационной энергией, создаваемой напряжением сдвига и электростатическим отталкиванием [Chasis J.A., 1992].

На поверхности эритроцитов сиаловые кислоты содержатся в составе гликофоринов – самых многочисленных белков эритроцитарной мембраны (10^6 молекул на клетку), экстраклеточные домены которых богаты полисахаридами и придают поверхности сильный отрицательный заряд [Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., 2001; Riquelme B. et al., 2003; Снегирева Л.В., Ивенков В.П., 2007]. Так, определение в крови эритроцитов, экспрессирующих гликофорины А и В, обнаружило их низкое относительное содержание у больных ИБС с умеренным гемолизом до операции при последующей нормализации величины после хирургического вмешательства (табл. 8, рис. 8). У больных с выраженным гемолизом показатель варьировал в пределах контрольных значений независимо от этапа исследования (табл. 8, рис. 8). В виду этого, можно заключить, что повышенная агрегируемость эритроцитов у данной категории лиц, очевидно, не связана с экспрессией гликофоринов и, вероятно, обусловлена иными механизмами.

Причиной неравнозначной численности гликофорин-позитивных эритроцитов у пациентов с умеренным и выраженным гемолизом, по всей видимости, является различное количество молодых форм клеток (ретикулоцитов) в циркуляции, так как в силу морфофункциональных особенностей зрелые эритроциты неспособны к синтезу белка и липидов, поэтому все компоненты мембраны и внутриклеточного содержимого они приобретают только в процессе эритропоэза [Шифман Ф.Д., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Ghashghaeinia M. et al., 2012]. По данным литературы, гликофорин В (CD235b) экспрессируется на эритроидных клетках с момента проявления ими морфологических свойств вплоть до зрелых эритроцитов включительно [Liu J.J. et al., 2010]. Раннее созревание ретикулоцитов сопровождается избирательным удалением некоторых мембранных белков – рецепторов трансферрина (CD71), CD98, β 1-интегринов путем эндо- и экзоцитоза. Позднее созревание ретикулоцитов, напротив, характеризуется интернализацией плазматической мембраны и генерацией на цитоплазматической поверхности мембраны крупных везикул, содержащих гликофорин А, которые перед экзоцитозом сливаются с аутофагосомами [Griffiths R.E., et al., 2011]. В целом, при созревании ретикулоцитов в эритроциты происходит значительное уменьшение содержания многих интегральных белков в клеточной мембране, таких как

гликофорин А, молекулы межклеточной адгезии 4-го типа, CD47, антигенные детерминанты систем групп крови Kell и Duffy и других [Liu J. et al., 2010]. В дальнейшем по мере старения эритроцитов экспонирование сиаловых кислот и гликофоринов продолжает закономерно уменьшаться, что сопровождается нейтрализацией поверхностного заряда и служит сигналом к разрушению клеток макрофагами ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) [Racca A. et al., 1999; Nigam P.K. et al., 2006; Снегирева Л.В., Ивенов В.П., 2007]. Кроме того, снижение электрического заряда мембраны красных клеток крови обнаруживается при различной патологии. В частности снижение содержания сиаловых кислот в мембране эритроцитов ассоциировано с высокой концентрацией триглицеролов в сыворотке крови и регистрируется у пациентов с гиперхолестеролемией [Hadengue A.L. et al., 1998; Пурло Н.В. и соавт., 2005].

Учитывая выше изложенное, изменение численности гликофорин-позитивных клеток в популяции циркулирующих эритроцитов, по всей видимости, определяется ее возрастными характеристиками и отражает динамику содержания молодых клеточных форм (ретикулоцитов) в крови.

Анализ суправитально окрашенных мазков периферической крови показал, что при исходно (до операции) повышенном содержании ретикулоцитов в крови у больных ИБС обеих групп исследования, у пациентов с выраженным гемолизом доля ретикулоцитов в крови была еще большей, чем в альтернативной группе пациентов (табл. 7, рис. 8). Установленный факт отражает усиление эритропоэтической функции костного мозга на фоне ИБС и сопутствующей недостаточности кровообращения, которая выявлялась у 100% оперированных лиц (табл. 1). Как известно, развитие атеросклероза сопровождается глубокой дисфункцией клеток красной крови и ускоренной их гибелью, что в сочетании с циркуляторной гипоксией индуцирует активацию эритропоэза и поступление в кровотоки 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]. Поэтому вполне закономерно, что подобная компенсаторно-приспособительная реакция оказалась более выраженной у больных с большим дооперационным уровнем гемоглобинемии (т.е. у пациентов с выраженным гемолизом после ИК, табл. 7, рис. 8). Следовательно, исходно

нормальное содержание гликофорин А⁺ и гликофорин В⁺ эритроцитов у больных с выраженным постперфузионным гемолизом, вероятно, обусловлено (что наиболее вероятно) циркуляцией в крови более молодой (чем у больных с умеренной гемоглобинемией) популяции эритроцитов.

В ходе реваскуляризации миокарда количество ретикулоцитов в крови у больных ИБС в настоящем исследовании увеличивалось вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 7, рис. 8). Поступление ретикулоцитов в кровоток в столь короткие сроки (через 6-7 ч от начала операции и кровопотери) нельзя объяснить интраоперационной активацией эритропоэза, которое требует около 3-4 суток [Воробьев А.И., 2005; Рязанцева Н.В. и соавт., 2008; Уразова О.И., Новицкий В.В., 2008]. Вероятно, во время ИК происходит мобилизация костномозгового пула клеток красной крови, в результате чего в периферическую кровь поступают депонированные ретикулоциты, которые после образования в течение 36-44 ч еще остаются в костном мозге, затем покидают пределы кроветворной ткани и на протяжении последующих 24-30 ч созревают в периферической крови [Воробьев А.И., 2005]. Увеличение численности ретикулоцитов в крови после операций с применением ИК было зарегистрировано также и другими исследователями [Cirri S. et al., 2001].

Следует отметить, что кратность увеличения количества ретикулоцитов в крови после хирургического вмешательства зависела от выраженности постперфузионного гемолиза: у пациентов с умеренным гемолизом показатель возрастал на 87%, а при выраженной гемоглобинемии всего на 30% (табл.7, рис. 8). Учитывая, что до операции содержание ретикулоцитов в крови определялось большим именно у последней категории пациентов (табл.7, рис. 8), то подобная реакция, видимо, отражает сокращение костномозгового резерва молодых форм эритроцитов перед операцией вследствие ускоренной их элиминации в ответ на чрезмерную деструкцию эритроцитов (гемоглобинемию) до хирургического вмешательства (табл.7, рис. 8). Вероятно, этим было обусловлено отсутствие позитивной динамики численности гликофорин-позитивных клеток у больных ИБС с выраженным гемолизом (табл. 8, рис. 8). У пациентов с умеренной гемоглобинемией костномозговой резерв эритроцитов, по всей видимости,

оказался сохранным в большей степени, чем при выраженном гемолизе, определив почти двукратный профицит ретикулоцитов после операции (табл. 7, рис. 8).

Послеоперационное увеличение (до нормы) числа гликофорин A^+ и гликофорин B^+ эритроцитов в крови у кардиохирургических больных с умеренным гемолизом (табл. 8), очевидно, имеет благоприятное значение, так как может угнетать агрегацию клеток между собой и взаимодействие их с синтетическими поверхностями экстракорпорального контура. При этом дефицит гликофорин-положительных клеток до операции у данной категории лиц, вероятно, отражает ускоренное старение эритроцитов на фоне атерогенеза и является одним из механизмов их гибели при ИБС. Показано, что сиаловые кислоты гликопротеинов не только предохраняют эритроциты от непосредственной утилизации макрофагами РЭС, но и выполняют функцию кальций-связывающих компонентов на внешней поверхности клеточной мембраны, поэтому слущивание этих структур при старении эритроцитов может сопровождаться ростом ионной проницаемости плазмалеммы для кальция [Bednarek-Skublewska A. et al., 2009]. У больных с выраженным гемолизом ускоренная гибель эритроцитов до операции уравнивается более интенсивной регенерацией красного ростка, что обуславливает нормальное содержание гликофорин A^+ и гликофорин B^+ эритроцитов в крови в до- и послеоперационном периоде. Следовательно, экспрессия данных молекул не влияет на формирование выраженной гемоглобинемии после ИК и высокую агрегируемость эритроцитов. Возможно, причина данного явления кроется в избыточной сорбции на клетках красной крови плазменных белков, экранирующих отрицательный заряд гликофоринов.

Согласно принципам гемореологии, агрегация эритроцитов опосредуется высокомолекулярными соединениями, в том числе белковыми молекулами: прежде всего, фибриногеном, а также иммуноглобулинами и альбумином [Левтов В.А. и соавт, 1982; Ройтман Е.В., 2002, 2003; Тихомирова И.А., 2006, 2007; Spengler M.I. et al., 2011; Arbel Y. et al., 2012]. В частности, синергичное проагрегантное действие фибриногена, иммуноглобулинов и альбумина наблюдается лишь в том случае, если в плазме имеется повышенная концентрация данного прокоагулянта. Если же содержание фибриногена уменьшается, то альбумин начинает оказывать дезагрегантный эффект, а действие иммуноглобулинов нивелируется [Ben-Ami R.,

2003]. Интересно, что помимо неспецифической сорбции фибриногена на эритроцитах, происходит и его специфическое связывание. Например, у крыс количество подобных специфических сайтов для взаимодействия с фибриногеном составляет в среднем более 1800 участков на 1 эритроцит. Даже если содержание фибриногена находится в пределах нормы, то около 80% эритроцитарных сайтов связывания занято фибриногеном [Lominadzea D., 2002]. Кроме того, продукты деградации фибриногена тоже способны взаимодействовать с мембранами эритроцитов. При этом количество связанного фибриногена пропорционально его концентрации в суспензионной среде (при концентрациях от 3,0 до 10 г/л) и в норме не зависит от содержания других белков плазмы или Ca^{2+} [Rampling M.W., 1992].

Определение концентрации фибриногена в плазме крови у кардиохирургических больных показало высокое его содержание только у пациентов с выраженной постперфузионной гемоглобинемией и только в дооперационном периоде (табл. 8, рис. 8). Учитывая, что аналогичная девиация была характерна и для количества гаптоглобина в крови (табл. 7), подобное состояние можно расценивать как проявление системной воспалительной реакции, которая имеет место при ИБС и сопровождается синтезом белков острой фазы [Carter K., Worwood M., 2007; Voigt A. et al., 2013]. Фибриноген и гаптоглобин относятся к одной группе реактантов острой фазы, достаточно инертных по своей кинетике синтеза гепатоцитами. Концентрация этих протеинов существенно увеличивается (в 2-5 раз) под влиянием провоспалительных цитокинов (преимущественно интерлейкина (IL) 6) и зависит не только от интенсивности воспаления, но и от объема повреждения тканей [Вельков В.В., 2008; Brock M. et al., 2011; Nakata K. et al., 2012]. В связи с этим подобные изменения белкового состава плазмы крови в дооперационном периоде у больных ИБС с выраженным гемолизом могут быть обусловлены большей (чем в группе сравнения) площадью атеросклеротического поражения сосудов и/или более глубоким нарушением функционального состояния печени. Так, среди кардиохирургических больных заболевания печени и желчевыводящих путей были зарегистрированы у 42% пациентов с выраженным гемолизом против 25% пациентов с умеренной

гемоглобинемией, хотя отличие между показателями не было статистически значимым (табл. 1).

Сопоставляя результаты исследования, можно резюмировать, что повышенный до операции уровень фибриногена в плазме крови у больных с выраженным гемолизом сочетался с гиперагрегацией эритроцитов, в то время как нормальный показатель у пациентов с умеренной гемоглобинемией – с нормальной агрегируемостью клеток красной крови (табл. 8, рис. 8). Логично заключить, что избыточная агрегация эритроцитов у больных ИБС до операции опосредована гиперфибриногенемией. Это полностью укладывается в концепцию «мостиковой» теории агрегации эритроцитов (иначе – модель макромолекулярного связывания), согласно которой установление жестких связей между клетками возникает в том случае, если силы взаимодействия между ними преодолевают эффективный радиус двойного электрического слоя. Как правило, размеры нитей фибрина или иммуноглобулинов превышают эту величину и при сорбции высокомолекулярных белков на двух соседних клетках образуется «мостик», а мембрана эритроцита выпячивается, напоминая псевдоподию [Левтов В.А., 1982; Ройтман Е.В., 2001; Морозова В.Т., 2007]. При этом среди полипептидов плазмы крови фибриноген занимает исключительные позиции: инкубация эритроцитов с аутологичной сывороткой снижает их агрегируемость в 3 раза по сравнению с инкубацией в аутологичной плазме крови [Тихомирова И.А., 2006].

Следует отметить, что в настоящее время существует и другая точка зрения на процесс агрегации эритроцитов, где фибриноген также играет ключевую роль. С позиции сторонников гипотезы “истощенного слоя”, эритроциты объединяются в агрегаты вследствие того, что вблизи клеточной поверхности образуется истощенный (в сравнении с объемной фазой) по макромолекулам слой, что формирует осмотический градиент, способствующий сближению и взаимодействию клеток. Объединение эритроцитов в агрегаты происходит лишь тогда, когда потенциальная энергия разности осмотического давления превышает энергию электростатического отталкивания, обусловленную мембранными макромолекулами [Катюхин Л.Л. 1995; Baskuri O.K. 2002; Steffen P. et al., 2013]. При любом варианте биофизического описания процессов агрегации, ее начальный этап (сближение эритроцитов) связан с действием гидродинамических сил и

нарастает в условиях замедления кровотока, но формирование собственно агрегатов осуществляется с участием фибриногена, концентрация которого определяет их прочность [Ройтман Е.В., 2001].

После окончания ИК у пациентов с ИБС вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза концентрация фибриногена в плазме крови обнаруживала негативную динамику, что сочеталось с формированием отчетливого дефицита гаптоглобина, очевидно, вследствие возрастающей во время операции гемоглобинемии (табл. 7, 8; рис. 8). Так как основной функцией гаптоглобина является акцепция молекул свободного гемоглобина, предотвращающая их элиминацию через гломерулярный фильтр [Schaer C.A., et al., 2007; Levy A.P. et al., 2010], то негативная динамика этого реактанта острой фазы вполне объяснима и выражена тем сильнее, чем выше интенсивность внутрисосудистого гемолиза. Кроме того, дополнительным фактором депрессии послеоперационного уровня гаптоглобина в плазме крови может служить гемодилюция, которая, по-видимому, является основным механизмом снижения плазменной концентрации фибриногена после операции у больных ИБС с выраженным гемолизом и аналогичной тенденции у пациентов с умеренной гемоглобинемией (табл. 8). Однако не исключено, что в последнем случае интраоперационная скорость синтеза данного белка гепатоцитами может быть несколько выше, чем у больных с выраженным гемолизом, так как при равной гемодилюции (согласно показателю гематокрита, табл. 7) кратность снижения концентрации фибриногена в плазме крови у пациентов с умеренной гемоглобинемией была несколько меньше, чем при выраженном гемолизе (14,3% против 21,2% соответственно).

Тем не менее, в послеоперационном периоде концентрация фибриногена в плазме крови у больных ИБС с различной степенью выраженности гемолитических реакций была сопоставимой и варьировала в пределах нормы, а, следовательно, не могла служить причиной гиперагрегации эритроцитов у пациентов с выраженным гемолизом (табл. 8, рис. 8). Этот феномен, как показано нами ранее, связан с послеоперационным увеличением числа морфологически измененных форм эритроцитов у данной категории больных в отличие от нормального показателя у пациентов с умеренной гемоглобинемией. При этом морфологическая трансформация эритроцитов при выраженном гемолизе после ИК

происходит преимущественно по эхиноцитарному типу [Мальцева И.В. и соавт., 2011]. Кроме того, развитие внутрисосудистого гемолиза, особенно при механическом воздействии, сопровождается появлением лизированных форм эритроцитов и фрагментов их мембран, которые в силу своей неправильной конфигурации легко агрегируют друг с другом [Воробьев А.И., 2005; Уразова О.И., Новицкий В.В., 2008].

Полученные результаты совпадают с данными Морозова Ю.А. и коллег [2007], установивших, что у кардиохирургических больных во время операции и в первые часы после нее в крови выявляется большое количество эхиноцитов, обладающих высоким агрегационным потенциалом, но вязкость крови в целом уменьшается за счет снижения гематокрита. Показано, что ключевым кренирующим агентом, индуцирующим появление спикул на поверхности эритроцитов, служит избыток Ca^{2+} в цитоплазме [Чернух А.М. и соавт., 1981]. Формирование выпячиваний и складок на мембране клеток красной крови увеличивает площадь контактирующих поверхностей при агрегатообразовании, а возникающие агрегаты обладают повышенной механической прочностью [Чернух А.М. и соавт., 1981; Морозов Ю.А., 2007].

Более того, в последние годы было показано, что агрегация эритроцитов не является пассивным процессом, зависящим только от поверхностных свойств эритроцитов и факторов экстрацеллюлярного матрикса, но имеет и активный компонент, связанный с изменением гомеостаза клетки под влиянием различных стимулов (катехоламинов, ацетилхолина, простагландинов). Так, обнаружен феномен адренореактивности агрегационных свойств эритроцитов, который реализуется через β - и α -адренорецепторы посредством неизвестных до сих пор механизмов, инициирующих увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , что ведет к изменению морфологических свойств эритроцитов и активации Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов [Ройтман Е.В. и соавт., 2002; Тихомирова И.А., 2006; Муравьев А.В. и соавт., 2012]. При операционном стрессе, особенно при операциях с применением аппарата ИК, когда концентрация катехоламинов резко возрастает, этот феномен приобретает патофизиологическое значение и должен учитываться клиницистами [Морозов Ю.А., 2007; Кузник Б.И., 2010]. Было показано, что во время операций в условиях ИК адренергическая агрегация эритроцитов носит

волнообразный характер с максимальным ее подъемом перед началом перфузии и последующим линейным снижением, а затем повышением до уровня предоперационных значений. Длительная перфузия (более 90 мин) сопровождается резким снижением адренергической агрегации эритроцитов; короткая гипотермическая перфузия приводит к уменьшению адренергической агрегации эритроцитов, а нормотермическое ИК ведет к повышению агрегационной активности эритроцитов в ответ на стимуляцию норадреналином [Морозов Ю.А., 2007].

Поскольку в настоящем исследовании осуществлялась нормотермическая перфузия с продолжительностью ИК более 90 мин (табл. 4), а при патологии адренореактивность эритроцитов снижается по сравнению с нормой [Тихомирова И.А., 2006], то какое-либо влияние адренергических веществ на агрегационные свойства эритроцитов у больных с выраженным гемолизом маловероятно. Тем не менее, для подтверждения данной точки зрения необходимо располагать сведениями о концентрации катехоламинов в крови после операции. Косвенные данные о введении большей дозы ганглиоблокатора пентамина во время операции у больных с умеренным гемолизом в отличие от пациентов с выраженной гемоглобинемией (табл. 3) не позволяют сделать однозначное заключение, так как подобная тактика может быть как следствием более тяжелого операционного стресса с выраженной централизацией кровообращения, а, следовательно, избыточного содержания катехоламинов в крови, так и ятрогенной причиной их низкого уровня. Более того, проведение однофакторного дисперсионного анализа показало, что использование пентамина в различных дозах во время операции не влияет на выраженность постперфузионного гемолиза (табл. 27).

Подводя итог изучению процессов агрегации эритроцитов у кардиохирургических больных с различной степенью выраженности гемолитических реакций после операции с ИК, можно заключить, что формирование постперфузионной гемоглобинемии в пределах 40 мг/дл и более, в отличие от умеренного гемолиза, ассоциировано с гиперагрегацией эритроцитов как до, так и после хирургического вмешательства. При этом повышенная агрегируемость клеток красной крови у больных с выраженным гемолизом обусловлена избыточным содержанием фибриногена в плазме крови до операции,

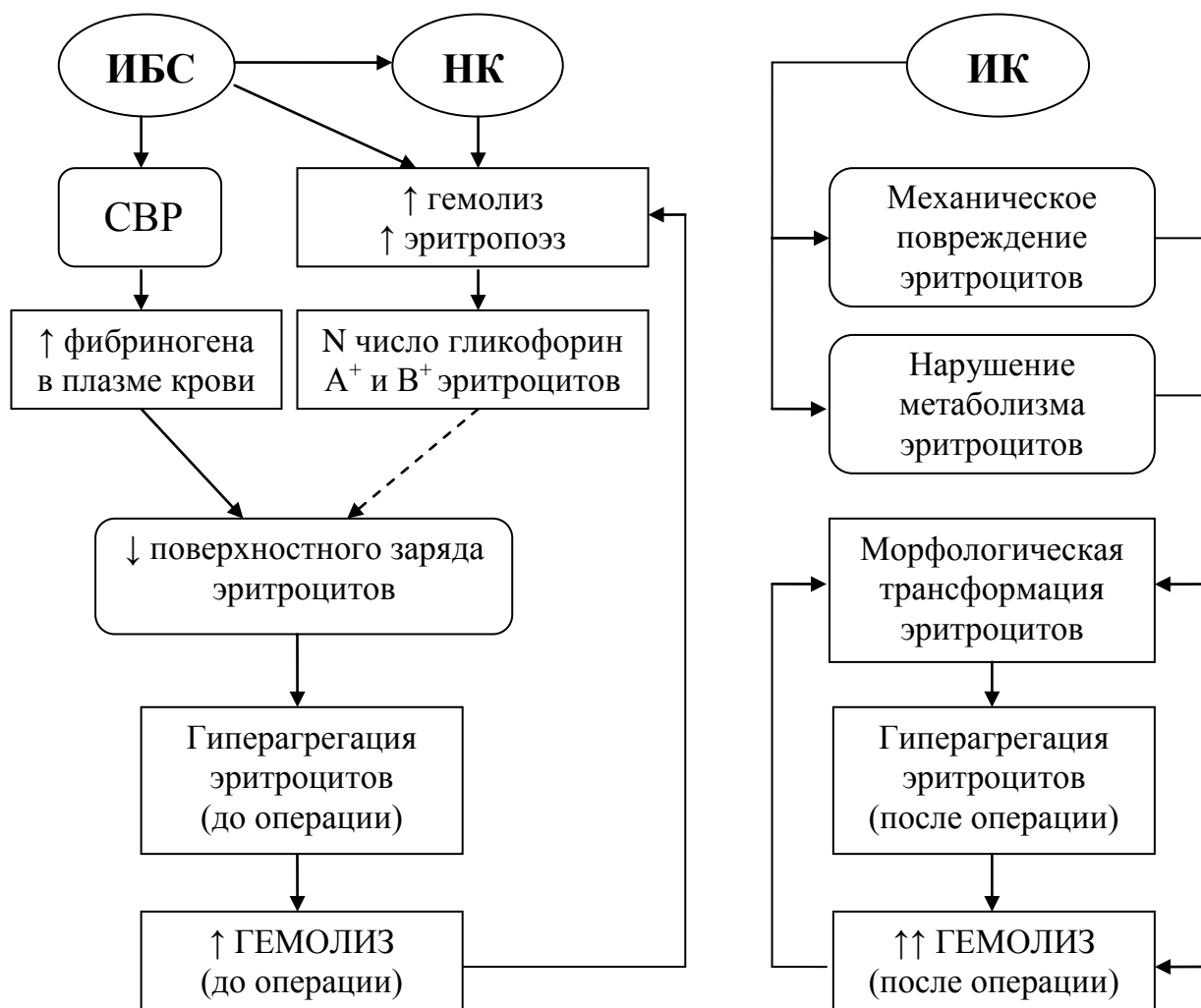


Рис. 9. Механизмы реализации феномена гиперагрегируемости эритроцитов до и после операции в условиях искусственного кровообращения у больных ишемической болезнью сердца с выраженным постперфузионным гемолизом.

Примечание. Здесь и далее в рис. 10-28: ---> отсутствие причинно-следственной связи, - по данным литературы, - по результатам собственных исследований, ↑ или ↓ — повышение или снижение показателя, N - норма, ИБС – ишемическая болезнь сердца, НК – недостаточность кровообращения, СВР – системная воспалительная реакция, ИК – искусственное кровообращение.

а после ее проведения – морфологической трансформацией эритроцитов преимущественно по эхиноцитарному типу (рис. 9). Экспрессия гликофоринов А и В на мембране эритроцитов у кардиохирургических больных, очевидно, не влияет на формирование гиперагрегационного статуса эритроцитов в до- и послеоперационном периоде, так как число гликофорин А⁺ и В⁺ клеток оказывается пониженным лишь у пациентов с умеренной гемоглобинемией и только до операции. При нормальной экспрессии гликофоринов на эритроцитах у больных с выраженным гемолизом отрицательный заряд клеток, вероятно, экранируется

адсорбированными в избытке на их поверхности белками плазмы крови (фибриногеном, иммуноглобулинами).

В отличие от агглютинации, агрегация эритроцитов обратима и существует в физиологических условиях. При достижении определенной величины напряжения сдвига в кровотоке агрегаты клеток разрушаются, после чего эритроциты циркулируют изолированно друг от друга [Левтов В.А., 1982; Cabel M. et al., 1997; Ройтман Е.В., 2001; Муравьев А.В. и соавт., 2012; Ju M. et al., 2013]. Однако, если прочность агрегатов велика, что характерно для патологической агрегации, то деструкция конгломератов происходит при более высоких скоростях потока крови и, поэтому, может сопровождаться нарушением целостности мембраны эритроцитов, особенно в области межклеточных контактов, опосредованных фибриногеном, где даже в покое формируется локальное выпячивание цитоплазмы эритроцита [Шилов А.М. и соавт., 2005; Морозова В.Т., 2007]. Кроме того, нарушение агрегационных свойств эритроцитов модифицирует упорядоченность их в кровеносном русле, способствуя превращению ламинарного течения крови в турбулентное и усугубляя, тем самым, механическую травму эритроцитов в составе конгломератов или свободно расположенных клеток [Катюхин Л. Н., 1995; Ройтман Е.В., 2001]. Некоторыми авторами было показано, что в процессе агрегации эритроцитов из них могут высвобождаться АДФ и другие компоненты цитоплазмы [Альфонсов В.В., 2005; Широкова Т.Е., 2007].

Общеизвестно, что повышенная агрегируемость эритроцитов индуцирует расстройство транскапиллярного обмена вследствие окклюзии капилляров клеточными агрегатами и сокращения суммарной площади газообмена, а также стимулирует адгезию и агрегацию тромбоцитов, что еще более усугубляет нарушение регионарного кровотока в жизненно важных органах [Новицкий В.В., 2004; Муравьев А.В., 2005; Шилов А.М. и соавт., 2005; Муравьев А.В. и соавт., 2012; Ju M. et al., 2013]. Помимо этого, процессы агрегации эритроцитов негативно отражаются на деформируемости клеток, потенцируя реологические расстройства в тканях. Морфологическая трансформация эритроцитов, как и чрезмерная сорбция белков и липопротеинов низкой плотности на их мембране, угнетают способность клеток к упругой деформации [Новицкий В.В., 2000, 2004; Андреева В.Ю., 2001; Glodek A.M. et al., 2010; Zhang Z.G., Zhang X.W., 2011; Jung J.M. et al., 2013]. Кроме

того, при усиленной агрегации эритроцитов численность свободных клеток, обладающих деформируемостью, закономерно уменьшается и нарастает количество эритроцитарных агрегатов, лишенных данного свойства [Ju M. et al., 2013], что в целом может снижать резистентность красных клеток крови к механическому воздействию и повышать риск развития гемолитических реакций.

Следует отметить, что кроме деформируемости эритроцитов, отражающей способность клеток к упругой деформации при низких напряжениях сдвига в микроциркуляторном русле, клетки красной крови обладают еще и стабильностью мембраны, проявляющейся при высоких скоростях потока крови в магистральных артериях, где основной задачей эритроцитов становится сохранение целостности мембраны, а не оксигенация тканей путем пассажа через узкие капилляры [Сторожок С.А. и соавт., 1997; George A. et al., 2010]. В настоящем исследовании для оценки деформируемости красных клеток крови у кардиохирургических больных до и после операции определяли индекс ригидности эритроцитов (величина, обратная деформируемости) путем фильтрации клеточной суспензии через мелкопористую мембрану. Для изучения стабильности мембраны эритроцитов оценивали механическую резистентность клеток как % гемолиза после длительной ротации эритроцитарной суспензии при высоких напряжениях сдвига.

Результаты исследования показали, что у пациентов с выраженной гемоглобинемией вне зависимости от этапа исследования деформируемость эритроцитов оказалась пониженной (т.е. индекс ригидности эритроцитов повышен) по сравнению с величиной у здоровых доноров и больных с умеренным гемолизом (табл. 9, рис. 8). Низкая механическая резистентность клеток (т.е. большая доля гемолизированных клеток при механическом воздействии *in vitro*), напротив, была характерна для пациентов с умеренной гемоглобинемией и только до операции, а после операции определялась для обеих групп больных ИБС в равной степени (табл. 9, рис. 8). Следовательно, фактором, предрасполагающим к развитию умеренного гемолиза, является исходное снижение стабильности мембраны эритроцитов, в то время как формирование выраженной постперфузионной гемоглобинемии сопряжено с низкой деформируемостью клеток красной крови.

Положительная корреляция степени выраженности гемолиза после ИК с долей гемолизированных клеток при механическом воздействии *in vitro* и индексом ригидности эритроцитов до операции позволяет подтвердить это предположение. При этом в отношении механической резистентности эритроцитов определялась ее слабая взаимосвязь с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после перфузии ($r = 0,41$; $p < 0,05$), но только для группы больных с умеренным гемолизом (п. 3.13, рис.10А). Зависимость гемоглобинемии после ИК от деформируемости эритроцитов до операции была достаточно тесной ($r = 0,66$; $p < 0,05$) и устанавливалась в объединенной когорте пациентов (табл. 20, рис. 10Б), что свидетельствует не только об универсальности данного механизма деструкции эритроцитов во время перфузии, но и позволяет прогнозировать уровень постперфузионной гемоглобинемии. Является ли низкая деформируемость эритроцитов механизмом реализации умеренного или выраженного гемолиза в отдельности, утверждать трудно: внутри каждой из групп исследования корреляции между показателями не обнаруживались (рис. 10Б).

Несомненно, деформируемость представляет собой важное микрореологическое свойство клеток красной крови, которое интерпретируется как способность эритроцитов к изменению формы клетки при постоянном объеме и площади поверхности. Между тем, малоизвестно, что оно тесно связано со стабильностью эритроцитарной мембраны, определяемой как способность эритроцитов сохранять свою форму под влиянием механических воздействий, модулирующих линейные размеры клетки [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Новицкий В.В., 2004; George A. et al., 2010].

В условиях высокого напряжения сдвига в липидном бислое мембраны эритроцитов формируются участки пониженной плотности упаковки фосфолипидов, через которые в больших количествах поступает Ca^{2+} («деформационный стресс»), который связывается с кальмодулином, что обеспечивает аддуцин-зависимое включение 2-х дополнительных молекул спектрина в спектрин-актиновый комплекс. В итоге увеличивается сродство белков цитоскелета друг к другу и нарастает стабильность мембраны, что потенцируется увеличением вязкости внутриклеточной среды вследствие открывания Ca^{2+} -зависимых K^{+} -каналов [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Васильева Е.М., 2005;

Тихомирова И.А., 2006; Chakrabarti A. et al., 2006; Wulff H., Castle N.A., 2010; Muravyov A., Tikhomirova I., 2012].

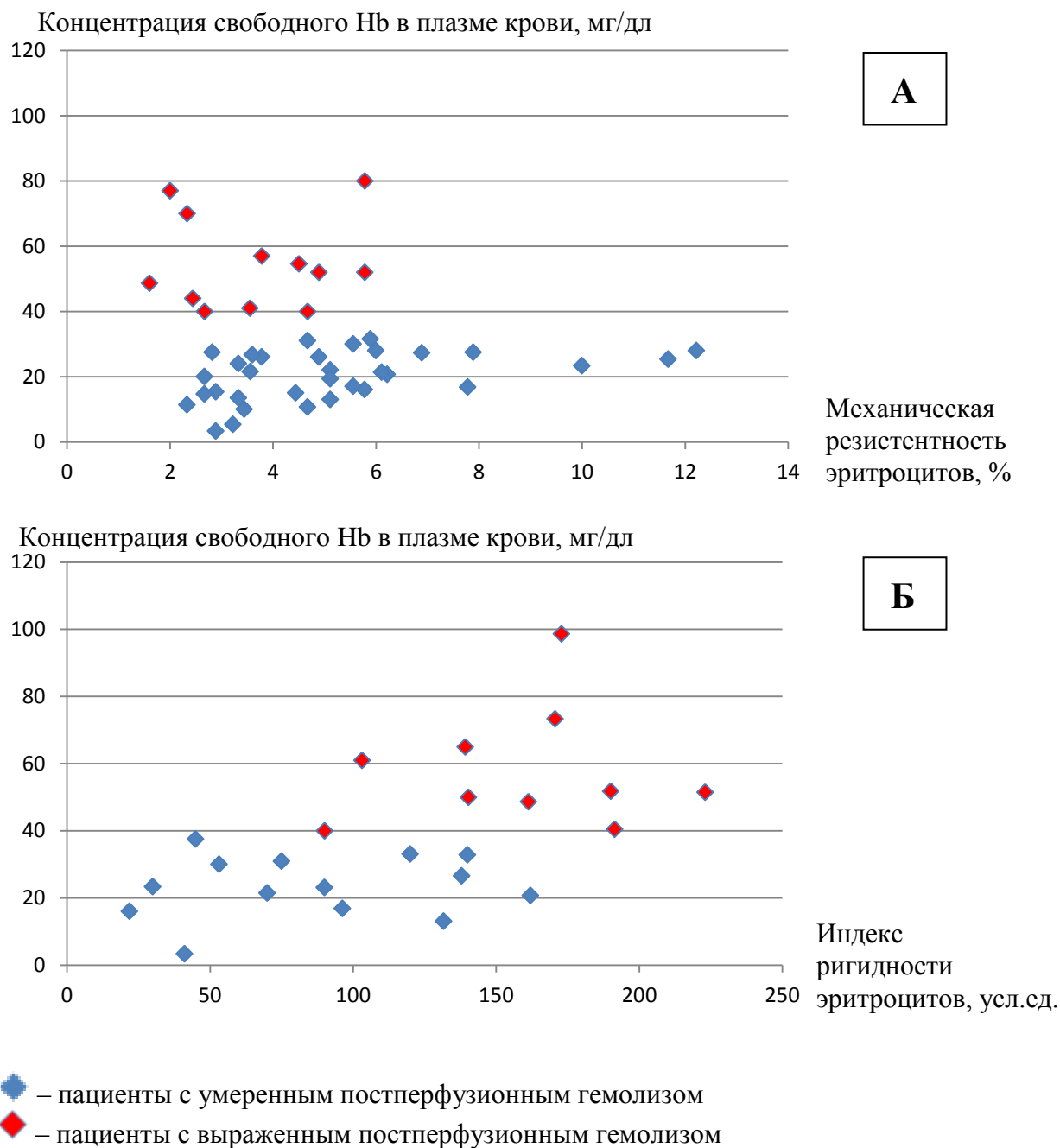


Рис. 10. Зависимость степени выраженности постперфузионной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца от механической резистентности (А) и деформируемости (Б) эритроцитов до операции в условиях искусственного кровообращения

Параллельно избыток Ca^{2+} индуцирует активацию Ca^{2+} -АТФазы и Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы. Последнее обуславливает фосфорилирование белков цитоскелета, что снижает их сродство друг к другу, а уменьшение внутриклеточного уровня кальция до субмикромольных концентраций

ингибирует опосредованное аддуцином связывание спектрина с актином, поэтому клетка утрачивает стабильность и приобретает свойство деформируемости [Сторожок С.А. и соавт., 1997; George A. et al., 2010; Liu J.J. et al., 2010; Муравьев А.В. и соавт., 2012].

Исходя из вышеизложенного, нарушение деформируемости и стабильности мембраны эритроцитов у больных ИБС может быть вызвано различными факторами: повышением вязкости внутриклеточной среды (определяется концентрацией гемоглобина в клетке), нарушением вязкостно-эластических свойств мембраны (зависят от содержания холестерина и ненасыщенных фосфолипидов), дисфункцией белков цитоскелета (их дефектом, избытком Ca^{2+} или недостаточным фосфорилированием) [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Raffy S., Teissie J., 1999; Ройтман Е.В. и соавт., 2001; Глушков В.С., и соавт., 2004; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Шилов А.М., 2008; Bhattacharya A., 2011; Muravyov A., Tikhomirova I., 2012].

Интерпретируя полученные данные, можно заключить, что неоднозначное изменение механических свойств эритроцитов у больных ИБС с различной степенью выраженности постперфузионного гемолиза нельзя объяснить увеличением вязкости их внутриклеточной среды, так как при равном среднем объеме эритроцитов до ИК у кардиохирургических больных обеих групп исследования (табл. 14) содержание гемоглобина в крови у пациентов с выраженной гемоглобинемией было даже несколько меньшим, чем в группе сравнения, как и содержание эритроцитов в их крови (табл. 6). Между тем, в послеоперационном периоде увеличение вязкости цитоплазмы эритроцитов вполне возможно, так как степень гемоглобинизации клеток красной крови после операции априори не изменяется, вследствие отсутствия у них белоксинтезирующей функции [Шифман Ф.Д., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004 Воробьев А.И., 2005; George A. et al., 2010], но уменьшается средний объем клеток (табл. 14). Тогда подобная реакция скорее характерна для пациентов с умеренным гемолизом, у которых средний объем эритроцитов после ИК уменьшался в большей степени, чем при выраженном гемолизе, а низкая деформируемость эритроцитов, тем не менее, отмечалась именно у пациентов с высокой активностью гемолитических процессов (механическая резистентность была пониженной у

больных обеих групп в равной степени). Следовательно, в основе нарушения механических свойств эритроцитов, определяющих вариабельность постперфузионной гемоглобинемии, лежит не модуляция вязкостных характеристик внутриклеточного содержимого эритроцитов, а дисфункция цитоскелета или изменение структурной организации мембраны эритроцитов.

Процессы формирования цитоскелета эритроцитов, как и другие атрибуты эволюции эритроидных клеток-предшественниц, могут существенно нарушаться в условиях напряженного эритропоэза, в результате чего клетки приобретают качественную неполноценность [Новицкий В.В., 2004; Зюзьков Г.Н., 2004; Шперлинг И.А., 2005; Березин М.В. и соавт., 2007; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Buttarello M., Pleban M., 2008; Kones R., 2011; Чанг Н.Т., 2012]. 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; Griffiths R.E. et al., 2012]. В норме процессы самосборки и организации цитоскелета завершаются на стадии поздних форм ретикулоцитов (до поступления их в кровоток), благодаря чему они приобретают способность к упругой деформации и покидают костный мозг через узкие просветы эндотелиальной выстилки синусоидов [Юшков Б.Г. и соавт., 2004; Liu J.J. et al., 2010]. По данным некоторых авторов, в цитоплазме молодых форм ретикулоцитов, преждевременно покинувших кроветворную ткань при кровопотере, обнаруживаются молекулы спектрина в свободном состоянии и интенсивно фосфорилированный белок полосы 4.1, что указывает на незавершенность процессов формирования цитоскелета и объясняет пониженную деформируемость клеток [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Liu J.J. et al., 2010].

Учитывая чрезмерное содержание ретикулоцитов в крови до операции у больных ИБС с выраженным гемолизом, превышающее показатель у пациентов группы сравнения (табл. 7, рис. 8), вполне возможно, что именно нарушение функционирования белков цитоскелета лежит в основе пониженной деформируемости эритроцитов у данной категории больных. Интересно, что число циркулирующих ретикулоцитов было повышенным до операции и у больных с умеренным гемолизом (но в меньшей степени), у которых индекс ригидности

эритроцитов соответствовал норме (табл. 9, рис. 8). В данном случае незначительная дисфункция цитоскелета эритроцитов вследствие их незрелости, возможно, компенсировалась избытком эритропоэтина в крови, чего не отмечалось у пациентов с выраженным гемолизом (табл. 7, рис. 8). Эритропоэтин (ЕРО), контролируя ионный баланс эритроцитов, позитивно влияет на их деформируемость, в связи с чем улучшает микрореологические свойства незрелых форм ретикулоцитов и даже старых клеток красной крови после кровопотери [Белкин А.В., 1996; Сторожок С.А. и соавт., 1997; Lang K.S. et al., 2005, 2008]. Последнее объясняет некоторую тенденцию к снижению индекса ригидности эритроцитов в послеоперационном периоде у больных ИБС независимо от выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 9, рис. 8), что также может быть следствием поступления в кровоток молодых форм эритроцитов, имеющих высокий индекс сферичности (отношение диаметра эритроцита к его толщине) и, соответственно, большую деформируемость по сравнению со зрелыми и старыми клетками [Ройтман Е.В., 2001; Афанасьев Ю.И., Шубикова Е.А., 2002; Zhang Z.G., Zhang X.W., 2011].

Между тем, в послеоперационном периоде индекс ригидности эритроцитов по-прежнему оставался повышенным у пациентов с выраженным гемолизом при равном и даже несколько меньшем содержании ретикулоцитов в крови по сравнению с другой группой пациентов (табл. 7, 9; рис. 8). Данное обстоятельство при выраженной гемоглобинемии предполагает либо интраоперационную миграцию в кровоток крайне неполноценных (вследствие напряженного эритропоэза) ранних форм ретикулоцитов, либо инициацию во время ИК метаболических путей ингибирования деформируемости эритроцитов, которые будут проанализированы ниже. На данном этапе важно отметить лишь то, что у пациентов с выраженным гемолизом как до, так и после операции содержание АТФ в эритроцитах было пониженным в отличие от его нормального уровня у больных с умеренной гемоглобинемией (табл. 15). Энергетическое истощение клеток красной крови при выраженном гемолизе, очевидно, потенцирует дефект белковой сети их цитоскелета. В норме фосфорилированию подвергаются преимущественно молекулы белков полос 3, 4.1, 4.9, спектрина, анкирина и аддуцина, в структуру которых включается до трех остатков фосфорной кислоты, в результате чего они

теряют сродство к друг другу и стабильность мембраны снижается, обеспечивая проявление деформируемости [Сторожок С.А. и соавт., 1997; George A. et al., 2010; Liu J.J. et al., 2010; Муравьев А.В. и соавт., 2012].

Третьей составляющей, способной влиять на деформируемость эритроцитов и стабильность их мембраны, является структурная организация липидной фазы эритроцитарной мембраны. Общеизвестно, что ее вязкостно-эластические свойства во многом определяются качественным составом бислоя липидов: микровязкость плазмолеммы прямо пропорциональна удельному содержанию холестерина (ХС) в ней и обратно пропорциональна количеству фосфолипидов (ФЛ) и степени ненасыщенности их жирных кислот [Raffy S., Teissie J., 1999; Новицкий В.В., 2004; Васильева Е.М., 2005; Шилов А.М. и соавт., 2008; Кононеко В.А., 2009; Шевченко О.Г., 2010; Bhattacharya A., 2011]. При этом отличие в структуре полярных групп молекул ФЛ различных типов не оказывает существенного влияния на величину модуля поверхностного сжатия мембраны [Сторожок С.А. и соавт., 1997].

Интересно, что у больных с выраженным гемолизом, эритроциты которых обладают низкой деформируемостью и нормальной механической резистентностью, соотношение ХС/ФЛ в мембране клеток до операции оказалось повышенным всего на 30%, а у больных с умеренной гемоглобинемией, имеющих нормальную деформируемость эритроцитов и низкую механическую резистентность, – на 45% (табл. 9, 10; рис. 8). Кроме того, после операции деформируемость клеток значительно отличалась между группами больных, в то время как механическая резистентность была сопоставимой при равной величине ХС/ФЛ-отношения (табл. 9, 10; рис. 8). Вполне логично заключить, что увеличение ХС/ФЛ-отношения в мембране эритроцитов не может претендовать на роль ведущего патогенетического фактора в снижении деформируемости эритроцитов у кардиохирургических больных, но, вероятно, определяет недостаточную стойкость эритроцитов к высокой сдвиговой нагрузке.

При этом, с одной стороны, известно, что избыток ХС в мембране придает ей жесткость и нарушает микрореологические свойства эритроцитов [Новицкий В.В., 2004; Васильева Е.М., 2005; Шилов А.М. и соавт., 2008], что согласуется с данными настоящего исследования о низкой механической резистентности эритроцитов при высоком значении ХС/ФЛ-отношения (табл. 9, 10; рис. 8). С

другой стороны, в эксперименте было показано, что увеличение доли ХС в структуре липосом определяет их большую сжимаемость и препятствует разрыву, придавая липосомам механическую прочность за счет увеличения плотности упаковки молекул в мембране и энергии когезии в веществе. Однако эта прямо пропорциональная зависимость имеет нелинейный характер с эффектом насыщения при содержании ХС, равном 55% [Needham D., Nunn R.S., 1990]. Учитывая данный факт, низкую механическую резистентность эритроцитов у кардиохирургических пациентов нельзя объяснить только большой величиной ХС/ФЛ-отношения, так как независимо от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования значение ХС/ФЛ-отношения превышало 55% (т.е. $55:45=1,22$; табл. 10).

Изучение механических свойств липосом, сформированных из ФЛ с различной структурой жирнокислотных остатков, установило, что снижение степени ненасыщенности жирных кислот в составе ФЛ опосредует высокое сопротивление бислоя сжатию, но меньшее растяжение и быстрый разрыв липосом [Needham D., Nunn R.S., 1990]. В виду этого основной причиной пониженной механической резистентности клеток до операции у больных с умеренным гемолизом, возможно, является не рост ХС/ФЛ-отношения в мембране эритроцитов, а уменьшение степени ненасыщенности жирных кислот в бислое клеток более старой популяции, чем у лиц с выраженным гемолизом, у которых зарегистрировано высокое содержание молодых форм эритроцитов в крови (т.е. ретикулоцитов, табл. 7; рис. 8). Это связано с тем, что максимальное число ненасыщенных связей в молекулах жирных кислот эритроцитарной мембраны свойственно молодым клеткам и прогрессивно снижается по мере их старения, а также при активации перекисного окисления липидов [Новицкий В.В., 2004; Шилов А.М. и соавт., 2008; Sohal R.S., Orr W.C., 2012]. Последний механизм, по-видимому, обуславливает снижение механической резистентности эритроцитов в послеоперационном периоде у больных с выраженным гемолизом (табл. 9; рис. 8).

Таким образом, общеизвестный феномен нарушения способности эритроцитов к упругой деформации на фоне ИБС и атеросклероза в целом у кардиохирургических больных с различной степенью выраженности постперфузионного гемолиза реализуется неоднозначно, определяя интенсивность

гемолитических реакций при операциях с ИК. Развитию умеренного гемолиза предшествует снижение стабильности клеточной мембраны эритроцитов до операции, очевидно, вследствие уменьшения степени ненасыщенности жирных кислот и резкого увеличения ХС/ФЛ-отношения в ней, что обусловлено атерогенезом (рис. 11). При этом умеренная активации эритропоэза до операции, вероятно, сопровождается незначительным дефектом белковой сети цитоскелета, не вызывая снижения деформируемости эритроцитов, так как компенсируется высоким содержанием ЕРО в плазме крови и осуществляется при нормальном уровне АТФ в эритроцитах.

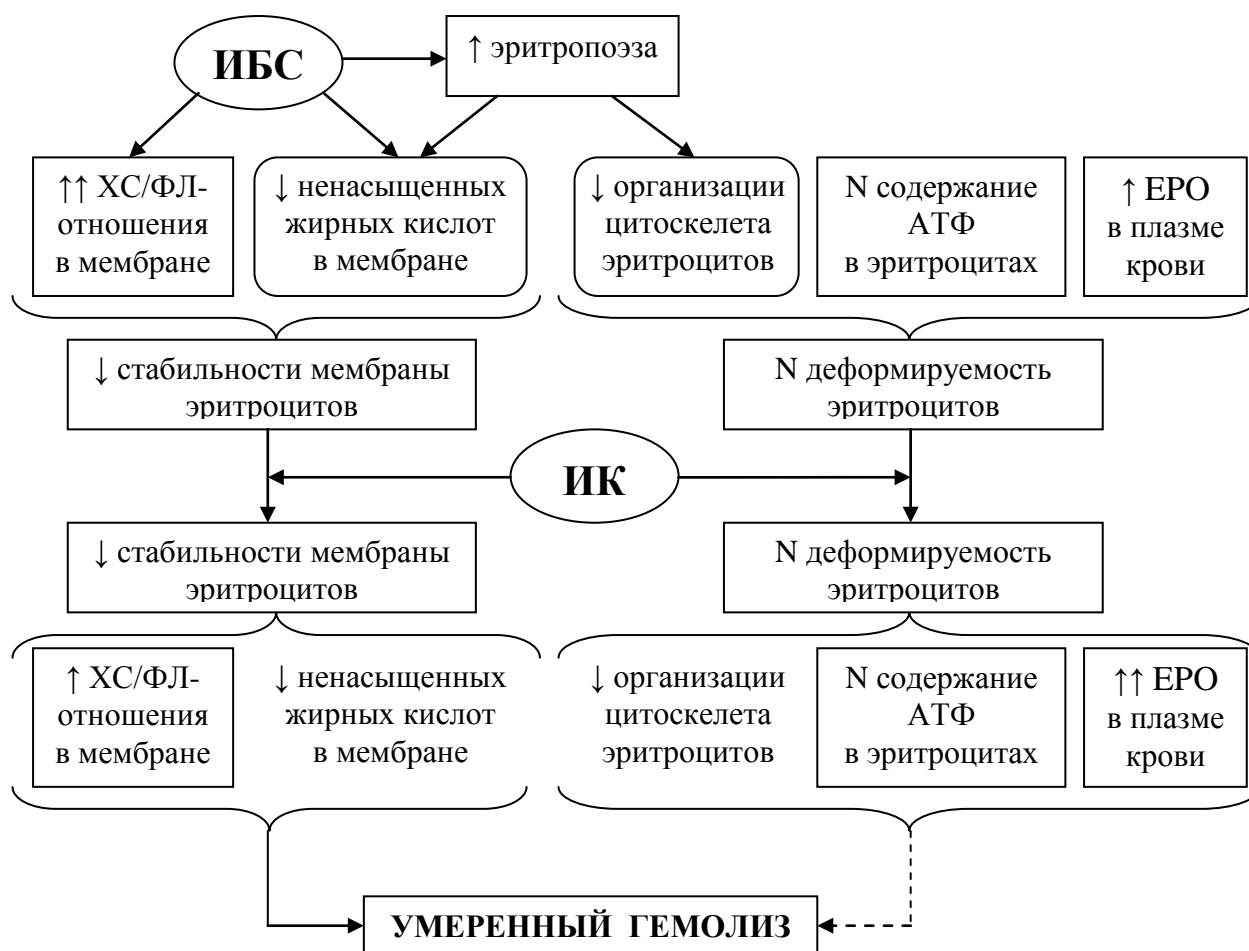


Рис. 11. Механизмы нарушения способности эритроцитов к упругой деформации у больных ишемической болезнью сердца с умеренным гемолизом после операции с искусственным кровообращением.

Примечание: См. рис. 9, ХС – холестерол, ФЛ – фосфолипиды, АТФ – аденозинтрифосфат, ЕРО – эритропоэтин.

Формирование выраженного постперфузионного гемолиза предопределяется низкой способностью эритроцитов к сдвиговой деформации в дооперационном периоде, которая, видимо, обусловлена грубым дефектом структуры цитоскелета

незрелых форм эритроцитов (количество которых повышено), продуцированных в условиях напряженного эритропоэза, и усугубляется дефицитом АТФ в клетках (рис. 12).



Рис. 12. Механизмы нарушения способности эритроцитов к упругой деформации у больных ишемической болезнью сердца с выраженным гемолизом после операции с искусственным кровообращением.

Примечание: См. рис. 9, 10.

Между тем, стабильность мембраны эритроцитов до операции существенно не страдает в виду несколько повышенного коэффициента ХС/ФЛ и, предположительно, нормального содержания числа ненасыщенных связей в молекулах жирных кислот в мембране эритроцитов, составляющих молодую популяцию клеток. Уменьшение стабильности мембраны эритроцитов при выраженной гемоглобинемии инициируется во время ИК, что вместе с исходно пониженной деформируемостью клеток определяет массивную интраоперационную их деструкцию, в отличие от умеренного гемолиза,

обусловленного лишь недостаточностью механической стойкости эритроцитов (рис. 11, 12).

Сохранение формы и целостности эритроцитов при сдвиговой деформации реализуется посредством изменения пространственного расположения молекул спектрина на внутренней поверхности липидного бислоя. Поэтому при больших величинах усилия сдвига в экстракорпоральном контуре, значительных деформациях или несостоятельности белковой сети цитоскелета возможен разрыв клеточной мембраны в местах взаимодействия молекул спектрина, что ведет к ее фрагментации или деструкции эритроцитов [Сторожок С.А. и соавт., 1997; George A. et al., 2010].

Фиксация белковой сети цитоскелета к внутренней поверхности липидного бислоя осуществляется благодаря взаимодействию спектрина с анкирином, аддуцином или белком полосы 4.1, которые, в свою очередь, связаны либо с цитоплазматическими доменами интегральных белков мембраны (белок полосы 3, гликофорины А, С и D), либо непосредственно с фосфатидилсерином [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Gov N., Safran S.A., 2005; George A. et al., 2010; Burton N.M., Bruce L.J., 2011]. Последнее обстоятельство, как и то, что вязкостно-эластические свойства мембраны эритроцитов во многом зависят от содержания в ней ХС, ФЛ и числа ненасыщенных связей в их жирнокислотных остатках, предопределило необходимость изучения состава липидной фазы цитолеммы эритроцитов у кардиохирургических больных с различной степенью выраженности постперфузионного гемолиза.

Результаты исследования показали, что содержание ХС и соотношение ХС/ФЛ в мембране эритроцитов у больных ИБС обеих групп исследования оказались повышенными как до, так и после операции (табл. 10), что свойственно заболеваниям, сопряженным с атеросклерозом, и вполне согласуется с данными литературы [Новицкий В.В., 2004; Васильев А.П. и соавт., 2005; 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; Lappé J.M. et al., 2011]. В условиях гиперлипидемии и гиперхолестеролемии эритроциты активно сорбируют ХС на своей поверхности, в связи с чем его содержание в мембране эритроцитов зависит от липидного состава сыворотки крови [Коновалова Т.Т., Смирнова И.П., 2005;

Мешков А.Н., 2010; Jung J.M. et al., 2013]. Так, рядом авторов установлена прямая корреляционная связь между содержанием ХС в мембране эритроцитов и уровнем общего ХС, триацилглицеролов, ХС липопротеинов низкой плотности в сыворотке крови, а также со скоростью прогрессирования острого коронарного синдрома [Memon L. et al., 2003; Pasterkamp G., Daemen M., 2008; Zhong Y. et al., 2012]. Существует мнение, что связывание незэстерифицированного ХС плазмы крови мембраной эритроцитов осуществляется благодаря сфингомиелину (СФМ) в ее структуре, выполняющему роль ловушки ХС [Tziakas D.N. et al., 2010].

Между тем, у больных с выраженным гемолизом содержание ХС и соотношение ХС/ФЛ в мембране эритроцитов были меньше, чем у пациентов с умеренной гемоглобинемией (табл. 10) при равной и даже несколько большей концентрации общего ХС в плазме крови (табл. 1). Данное обстоятельство позволяет полагать, что неоднозначное нарушение липидного спектра мембраны эритроцитов у больных ИБС с различной степенью выраженности постперфузионной гемоглобинемии обусловлено, вероятно, не особенностями липидного профиля плазмы крови, а длительностью циркуляции эритроцитов в кровотоке, что правомочно предположить ввиду неспособности эритроцитов к поддержанию реакций цикла трикарбоновых кислот.

До операции у пациентов с выраженным гемолизом регистрировался больший, чем в группе сравнения, уровень гемоглобинемии и ретикулоцитоза (табл. 7, рис. 8), что свидетельствует о быстром обновлении циркулирующей популяции эритроцитов. В этом случае эритроциты за короткий период жизни, видимо, не успевают сорбировать на своей поверхности такое количество ХС, как длительно циркулирующие клетки больных с умеренным гемолизом. К тому же содержание ХС в мембране ретикулоцитов меньше такового в зрелых клетках эритроидного ряда [Liu J. et al., 2010].

После операции увеличение численности ретикулоцитов в крови у пациентов с умеренной гемоглобинемией происходило на 87% (в отличие от 30% роста величины данного показателя при выраженном гемолизе), что определяло тенденцию к снижению содержания ХС в мембране эритроцитов у данной группы больных ИБС и уравнивало послеоперационные значения показателя в обеих группах оперированных лиц (табл. 10). При этом величина ХС/ФЛ-соотношения в

мембране эритроцитов после операции подвергалась реципрокным изменениям. При умеренном гемолизе она уменьшалась по сравнению с дооперационным значением, а при выраженной гемоглобинемии, наоборот, возрастала, превышая в итоге показатель ХС/ФЛ больных с умеренным гемолизом (табл. 10). Подобное обстоятельство при отсутствии достоверных послеоперационных изменений содержания ХС в мембране эритроцитов у больных обеих групп исследования могло быть связано с неоднозначной динамикой количества ФЛ в плазмолемме.

Исследование показало, что до операции общее содержание ФЛ в мембране эритроцитов у больных ИБС было пониженным вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 10). Дефицит ФЛ в мембране эритроцитов на фоне атеросклероза подтверждается данными литературы и объясняется активацией процессов липопероксидации, повышающих доступность мембранных ФЛ для действия фосфолипаз, активность которых при атеросклерозе также повышена [Nigam S., Schewe T., 2000; Новицкий В.В. и соавт., 2006; Zhang L. et al., 2010; Елкина Н.М. и соавт., 2011; Canonne J. et al., 2011; Rosenson R.S., Hurt-Camejo E., 2012; Mebarek S. et al., 2013].

В послеоперационном периоде общее содержание ФЛ в мембране эритроцитов у больных ИБС достоверно не изменялось, несколько снижаясь у пациентов с выраженным гемолизом и незначительно возрастая у больных с умеренной гемоглобинемией (табл. 10). Тем не менее, сочетание неоднозначной тенденции в изменении уровня мембранных ФЛ после операции с реципрокной тенденцией количества ХС в плазмалемме у кардиохирургических больных в обеих группных исследования, видимо, оказалось достаточным для формирования после ИК статистически значимых различий по величине ХС/ФЛ-отношения в мембране эритроцитов (табл. 10, рис. 8).

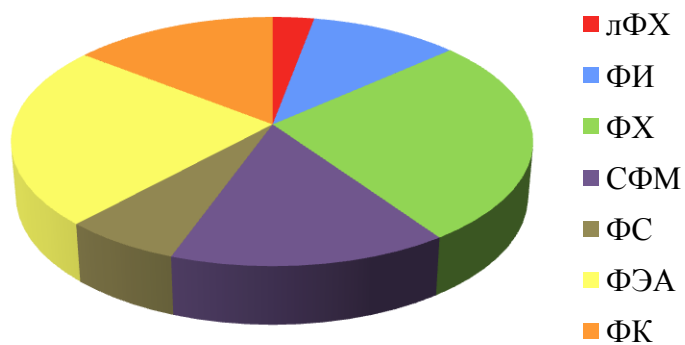
Несмотря на одинаковое содержание общих ФЛ в мембране эритроцитов в до- и послеоперационном периодах у больных ИБС с различной степенью выраженности постперфузионного гемолиза, качественный состав ФЛ в обеих группах исследования существенно различался до хирургического вмешательства и претерпевал значительные изменения после выполнения ИК. Так, до операции у больных с умеренной гемоглобинемией было выявлено высокое относительное содержание фосфатидилсерина (ФС) в мембране эритроцитов при увеличении

абсолютного содержания лизофосфатидилхолина (лФХ) и снижении фосфатидилинозитола (ФИ), фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) (табл. 11, рис 13). Подобные изменения удельного содержания различных фракций ФЛ в мембране эритроцитов согласуются с концепцией типовой реакции клеток на повреждение при патологиях различного генеза [Новицкий В.В. и соавт., 2004].

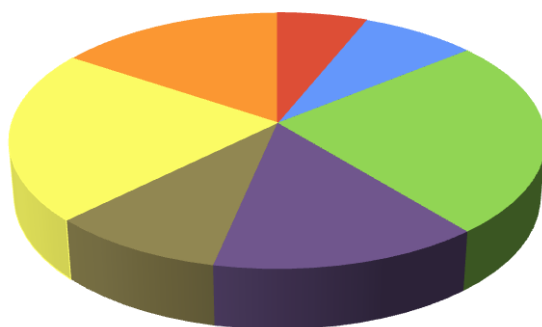
Наиболее активно в норме (и тем более при патологии) окислению подвергаются полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав преимущественно ФХ и ФЭА, содержание которых в мембране снижается по мере старения клетки [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Peng X., Frohman M.A., 2012; Valencak T.G., Ruf T., 2013]. Между тем, эритроциты обладают способностью сорбировать ФХ из плазмы крови, используя в качестве его источника липопротеины высокой плотности, в связи с чем содержание этого ФЛ в старых длительно циркулирующих клетках у здоровых доноров может быть даже повышено [Selle H. et al., 1993]. ФИ также расходуется в процессе жизни зрелых клеток эритроидного ряда, выполняя роль субстрата для фосфолипазы С, которая при активации эритроцита катализирует гидролиз ФИ с образованием вторичных месенджеров (диацилглицерола и инозитолтрифосфата) [Munnik T., Testerink C., 2009; Canonne J. et al., 2011; Mebarek S. et al., 2013]. Закономерно, что при истощении содержания других ФЛ доля ФС в эритроцитах возрастает, индуцируя при его экстернации гибель клеток красной крови в ходе естественного старения эритроцитов и усиление таковой при патологии [Lang F. et al., 2010; Jilani K., Lang F., 2013]. При этом отмечается планомерное накопление лФХ в мембране, который образуется при гидролизе ФХ фосфолипазой A_2 , и дестабилизирует бислой фосфолипидов, повышая неспецифическую проницаемость мембраны эритроцитов и угнетая деятельность ион-транспортирующих систем клетки [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Munnik T., Testerink C., 2009; Boisselier E. et al., 2013].

Исходя из выше изложенного, нарушение фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов до операции у больных с выраженным гемолизом вполне соответствует современным представлениям о модификации липидного бислоя при атеросклерозе, который способствует преждевременному старению клеток красной крови [Медведева И.В. и соавт., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2003, 2004; Васильева А.П. и соавт., 2005; Коновалова Т.Т., Смирнова И.П., 2005; Солоха Л.Н.,

Здоровые доноры

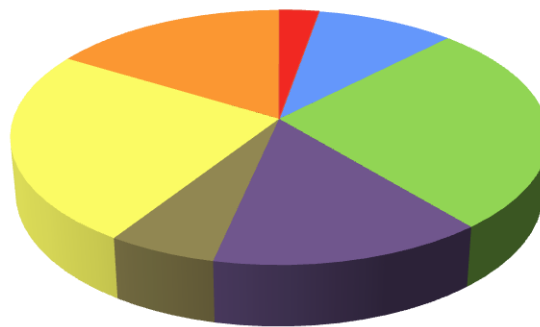


Кардиохирургические больные с умеренным гемолизом

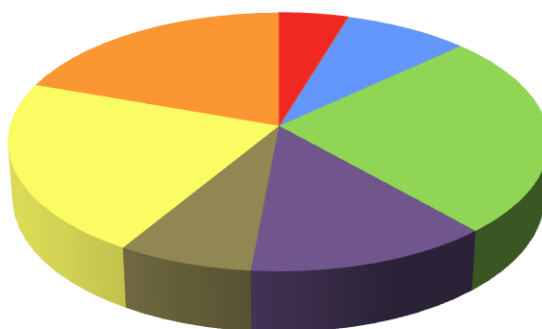


До операции

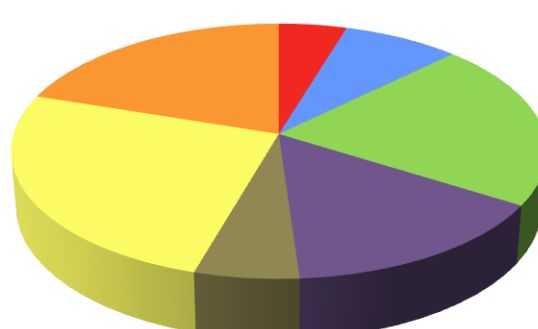
Кардиохирургические больные с выраженным гемолизом



До операции



После операции



После операции

Рис. 13. Фосфолипидный спектр мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца с различной степенью выраженности гемолиза после операций с искусственным кровообращением.

Примечание: лФХ – лизофосфатидилхолин, ФИ – фосфатидилинозитол, ФХ – фосфатидилхолин, СФМ – сфингомиелин, ФС – фосфатидилсерин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин, ФК – фосфатидная кислота.

Пушников А.А., 2007; Lausada N.R. et al., 2007; Свирко Ю.С., 2008; Zhang L. et al., 2010; Colley K.J. et al., 2011; Чанг Н.Т., 2012; Rosenson R.S., Hurt-Camejo E., 2012]. При этом изменение качественного состава ФЛ эритроцитарной мембраны и снижение степени ненасыщенности жирных кислот негативно влияет не только на функциональную активность и микрореологические свойства самих эритроцитов, но и опосредует дисфункцию сосудов микроциркуляторного русла, потенцируя гипоксию тканей при атеросклерозе [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Ohvo-Rekilä H. et al., 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Показано, что эритроциты являются основным источником эпоксиэйкозатриеновых кислот (производные арахидоновой кислоты), которые высвобождаются из клеток через вновь образующиеся поры в мембране при пассаже эритроцитов по микрососудам или при стимуляции пуриновых рецепторов, оказывая вазодилатирующее, профибринолитическое и противовоспалительное действие [Jiang H. et al., 2010].

В отличие от пациентов с умеренной гемоглобинемией, у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом фосфолипидный спектр эритроцитарной мембраны в дооперационном периоде соответствовал таковому в группе здоровых доноров (табл. 11, рис. 13), что само по себе удивительно при наличии клинически верифицированного атеросклероза коронарных артерий. По всей видимости, это обусловлено циркуляцией в их крови большего числа молодых эритроцитов (ретикулоцитов), чем у больных с умеренной гемоглобинемией (табл. 7, рис. 8).

После хирургического вмешательства на фоне неизменно низкого содержания общих ФЛ в мембране эритроцитов (табл. 10) у больных ИБС обеих групп исследования, фосфолипидный спектр плазмалеммы претерпевал существенные изменения (табл. 11, рис. 13): при умеренной гемоглобинемии нормализовалось абсолютное содержание ФИ и доля ФС при аналогичной тенденцией количества лФХ; при выраженном гемолизе абсолютное содержание ФИ и ФХ снижалось на фоне увеличения доли лФХ. Избыточное содержание фосфатидной кислоты (ФК) в мембране эритроцитов после операции отмечалось независимо от интенсивности гемолитических реакций (табл. 11, рис. 13).

Послеоперационное увеличение доли ФК в мембране эритроцитов, характерное для больных ИБС обеих групп исследования, по всей видимости,

обусловлено активацией фосфолипаз С и D. Так известно, что при участии фосфолипазы С образуется диацилглицерол, который с помощью диацилглицероллипазы может быть гидролизован в моноацилглицерол и свободные жирные кислоты, или подвергается фосфорилированию диацилглицеролкиназой с образованием ФК. Фосфолипаза D осуществляет гидролиз ФХ, при этом продуктами реакции являются ФК и холин [Munnik T., Testerink C., 2009; Canonne J. et al., 2011; Peng X., Frohman M.A., 2012].

Между тем, у больных с умеренным постперфузионным гемолизом содержание ФХ и ФИ в мембране эритроцитов после операции не снижается и даже несколько возрастает (табл. 11, рис. 13), что, видимо, связано с невысокой активностью фосфолипаз С и D в клетках и/или с интенсивной миграцией костномозгового пула молодых форм эритроцитов. Этим же можно объяснить нормализацию исходно повышенного удельного содержания ФС в эритроцитарной мембране у данной категории больных в послеоперационном периоде (табл. 11, рис. 12). У пациентов с выраженной гемоглобинемией вследствие предсуществующего истощения костномозгового резерва ретикулоцитов прирост числа молодых форм эритроцитов после ИК был менее значимым и в целом, видимо, не компенсировал усиленный гидролиз ФХ и ФИ (табл. 11, рис. 13), что также может быть следствием чрезмерной активации фосфолипаз С и D в эритроцитах.

Помимо вышеописанной реакции, формирование после операции с ИК выраженной гемоглобинемии, в отличие от умеренной, ассоциировано, по всей видимости, с активацией фосфолипазы A_2 , осуществляющей деградацию ФЛ с образованием лизофракций [Nigam S., Schewe T., 2000; Canonne J. et al., 2011; Rosenson R.S., Hurt-Camejo E., 2012], послеоперационное увеличение уровня которых (в частности лФХ) в эритроцитах было отмечено только у больных с выраженным гемолизом (табл. 11, рис. 13). 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 снижение уровня ФХ в мембране эритроцитов после операции у больных с выраженным гемолизом не только по сравнению с нормой и дооперационным этапом, но и по сравнению с больными группы сравнения (табл. 11, рис. 13).

Кроме того, потенцирующее влияние на процессы деградации ФХ оказывает свободнорадикальная модификация его молекул, богатых ненасыщенными двойными связями и выступающих в роли главного субстрата для перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Boisselier E. et al., 2013; Valencak T.G., Ruf T., 2013]. ФЛ, имеющие в составе гидропероксиды жирных кислот, особенно активно гидролизуются фосфолипазой A_2 [Canonne J. et al., 2011; Peng X., Frohman M.A., 2012; Rosenson R.S., Hurt-Camejo E., 2012]. В этом аспекте важно заметить, что интенсификация ПОЛ в эритроцитах после операции была характерна лишь для пациентов с выраженной гемоглобинемией (табл. 13).

Усиленная деградация ФХ в эритроцитарной мембране во время экстракорпоральной перфузии подтверждается и данными литературы. Так, R. Bruins с коллегами (2000) при моделировании условий ИК обнаружили увеличение содержания лизофосфатидов в мембранах липосом, которое они связали с гидролизом ФХ фосфолипазой A_2 [Metcalf R.G. et al., 2010]. Кроме того, у кардиохирургических пациентов было зарегистрировано интенсивное разрушение ФХ в мембране красных клеток крови в период реперфузии [Frey V. et al., 2000] и активация фосфолипазы A_2 после ИК, коррелирующая со степенью гидролиза ФЛ мембраны эритроцитов [Nakamura H. et al., 1995].

По данным A.L. Heiner и коллег [2008], скорость гидролиза ФЛ фосфолипазой A_2 отрицательно коррелирует с количеством ХС в мембране эритроцитов, который способствует формированию доменов, ограничивающих доступность ФЛ для фермента. Поэтому достоверно большее (до операции) содержание ХС в мембране эритроцитов у больных с умеренным гемолизом по сравнению с пациентами, проявляющими выраженную гемоглобинемию (табл. 10), вероятно, играет роль протективного фактора в патогенезе интраоперационного гемолиза.

Интересно, что доля СФМ и ФЭА в мембране эритроцитов соответствовала норме вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования (табл. 11, рис. 13). Недавние исследования показали, что процентное содержание данных ФЛ в мембране эритроцитов у больных ИБС с окклюзией коронарной артерии более 50% и менее 50% достоверно не различается [Jiménez

J.A. et al., 2012]. Вероятно, что при атеросклерозе и во время экстракорпоральной перфузии СФМ и ФЭА в меньшей степени подвергаются гидролизу, чем ФХ и ФИ.

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

Последствия интраоперационной модификации фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов у больных ИБС в общем следует расценивать как неблагоприятные не только при выраженном, но и при умеренном гемолизе. ФК мембраны эритроцитов, образуемая в больших количествах во время перфузии, обладает способностью связывать комплекс факторов комплемента C5b6, что с одной стороны сдерживает гиперактивацию системы комплемента, а с другой – повышает адгезивность эритроцитов [Marshall P. et al., 1996] и способствует перемещение ФС во внешний слой мембраны красных клеток крови [Noh J.-Y. et al., 2010]. Экспонирование ФС на поверхности мембраны еще более усиливает агрегационную способность эритроцитов, активирует систему гемостаза и запускает процессы естественной гибели эритроцитов путем внутриклеточного гемолиза [Lang K.S. et al., 2005, 2008; Глушков В.С., Сторожок С.А., 2009; Noh J.-Y. et al., 2010]. Последнее особенно важно притом, что у больных ИБС на фоне атеросклероза уже в дооперационном периоде отмечаются нарушения мембранной асимметрии ФЛ мембраны красных клеток крови, которая в норме характеризуется преимущественным расположением СФМ и ФХ во внешнем слое мембраны, а ФС

и ФЭА – во внутреннем ее слое [Choudhury T.D. et al., 1999; Kamp D. et al., 2001; Новицкий В.В., 2004; Jiménez J.A. et al., 2012].

Между тем, развитие гемолитических реакций высокой степени выраженности (в отличие от умеренной) сопровождается формированием в мембране эритроцитов дефицита ФИ и ФХ, также способных удерживать C5b6 комплекс комплемента [Marshall P. et al., 1996], что может привести к гиперактивации системы комплемента. Более того, расщепление ФЛ с их последующей деградацией и образование лФХ приводит к нарушению микровязкости мембраны эритроцитов и изменению ее проницаемости [Bing R. J. et al., 1993; Ohvo-Rekilä H. et al., 2002; Новицкий В.В., 2004]. Установленная в настоящем исследовании отрицательная взаимосвязь ($r = -0,66$; $p < 0,05$) уровня постперфузионной гемоглобинемии с относительным количеством ФХ в мембране эритроцитов после операции (табл. 22) подтверждает важную роль структурной организации липидного бислоя в реализации гемолитической стойкости эритроцитов к факторам экстракорпоральной перфузии.

Сопоставляя незначительные нарушения структуры мембраны эритроцитов у больных с выраженным гемолизом (небольшое увеличение ХС/ФЛ-коэффициента и нормальное соотношение отдельных фракций ФЛ) до операции с почти двукратным увеличением индекса ригидности клеток (табл. 9, 10, 11), следует еще раз подчеркнуть, что дефекты липидной фазы эритроцитарной мембраны, очевидно, не являются причиной пониженной деформируемости клеток красной крови у данной категории пациентов. Между тем, важным фактором, способным негативно влиять на структурно-функциональные характеристики эритроцитов, в том числе, и на состояние липидного бислоя клеток, служат процессы ПОЛ мембраны эритроцитов [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 перекисного окисления липидов, вступающих в реакцию с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) и диеновых конъюгатов (ДК) в плазме крови у больных ИБС до операции выявил

повышенные значения данных показателей по сравнению с нормой вне зависимости от степени выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 12). По-видимому, повышенная концентрация ТБК-активных продуктов в плазме крови у больных ИБС до операции может быть обусловлена избыточным поступлением в кровотоки АФК и продуктов ПОЛ из ишемизированных кардиомиоцитов и других клеток организма, находящихся в состоянии гипоксии при кардиогенной недостаточности кровообращения [Карпов Ю.А., Сорокин Е.В., 2001; Кузьменко Д.И., 2007; Voigt A. et al., 2013].

Как известно, при ишемии миокарда формируется парадоксальная ситуация – снижение содержания кислорода приводит к генерации цитотоксичного супероксид-анион радикала и других АФК. Это происходит вследствие того, что ишемизированный миокард инфильтрируется нейтрофилами, активация которых продуктами фосфолиполиза и протеолиза запускает «респираторный взрыв», приводящий к гиперпродукции АФК и последующему усилению ишемического повреждения миокарда [Неверов И.В., 2001; Васильев А.П., 2005; Neri M. et al., 2013]. Кроме того, типовой реакцией митохондрий на гипоксию является их набухание с последующим разобщением процессов окислительного фосфорилирования, что проявляется дефицитом АТФ и чрезмерным накоплением продуктов его распада – аденизиндифосфата, аденозинмонофосфата и гипоксантина [Суханова Г.А., Серебров В.Ю., 2000; Nohl H., et al., 2003; Bolisetty S., Jaimes E.A., 2013]. Дефицит АТФ, в свою очередь, опосредует перегрузку клеток ионами кальция (Ca^{2+}), которые индуцируют конверсию ксантиндегидрогеназы до ксантиноксидазы, как и частичный протеолиз фермента [Пасечник И.Н., 2001; Мещеряков В. В., 2002; Sakuma S. et al., 2012]. Последняя метаболизирует избыток гипоксантина, используя молекулярный кислород в качестве косубстрата (в отличие от ксантиндегидрогеназы, использующей НАДН) и образуя супероксид-анион, что способствует интенсификации ПОЛ клеточных мембран [Зенков Н.К. и соавт., 2001; Арсюттов В.П. и соавт., 2002; Kuwabara Y. et al., 2003; McNally J.S. et al., 2005; Nishino T. et al., 2008; Plank M. S. et al., 2011; Tsujii A., Nishino T., 2008; Mesquita-Casagrande A.C. et al., 2013].

Избыточная генерация супероксид-аниона ($\text{O}_2^{\cdot-}$), гидроксил-радикала (HO^{\cdot}), пероксида водорода (H_2O_2) и гидропероксидов жирных кислот приводит к резкой

интенсификации свободнорадикальных процессов в организме и образованию органических свободных радикалов (прежде всего, радикалов молекул ненасыщенных липидов). При этом цитопатическим эффектом обладают не только первичные, но и вторичные продукты свободнорадикального окисления липидов, образующиеся при окислительной модификации липидных гидропероксидов [Суханова Г.А., Серебров В.Ю., 2000; Пасечник И.Н., 2001; Ланкин В. З. и соавт., 2004; Титиов В.Н., Лисицын Д.М., 2005; Araneda O.F., Tuesta M., 2012; Sohal R.S., Orr W.C., 2012]. Итогом сложного комплекса биохимических реакций при гипоксии является деструкция мембран внутриклеточных органелл и плазмалеммы, в результате чего в межклеточное пространство высвобождаются продукты ПОЛ, что объясняет увеличение их уровня в плазме крови у больных ИБС до операции.

В послеоперационном периоде концентрация ТБК-активных продуктов в плазме крови у кардиохирургических больных еще более нарастала вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза на фоне сохраняющегося избытка ДК (табл. 12). 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 [Дементьева И.И., 1995; Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007; Vercaemst L., 2008; Young R.W., 2012]. Оба процесса могут быть триггерами послеоперационной интенсификации ПОЛ вследствие гиперпродукции АФК. Так, усугубление ишемии тканей во время ИК потенцирует энергодефицит, разобщение окислительного фосфорилирования и конверсию ксантиндегидрогеназы по выше описанным закономерностям, имевшим место у больных ИБС еще до хирургического вмешательства. Интраоперационный избыток кислорода в адекватно перфузируемых тканях модулирует его метаболизм. Известно, что основным путем утилизации атома кислорода в клетках различных тканей служит его двухэлектронное восстановление с образованием молекулы воды при участии цитохромоксидазы. В то же время небольшая часть кислорода (1-2%) претерпевает одноэлектронное восстановление, при котором образуются в качестве промежуточных продуктов свободные радикалы кислорода. В условиях гипероксии одноэлектронное восстановление кислорода усиливается пропорционально степени

повышения уровня кислорода в крови [Исаков Ю.Ф. и соавт., 1981; Fanburg B.L., 1988; Nohl H., et al., 2003]. Кроме того, возобновление перфузии сердца после кардиopleгии сопровождается реперфузионным повреждением миокарда и поступлением в кровоток большого количества продуктов ПОЛ [Jones S.P., Lefer D.J., 2000; Зенков Н. К. и соавт., 2001; Hu E.B., Jiang H.H., 2003; van Boven W.J et al., 2008; Young R.W., 2012].

В условиях интраоперационного накопления продуктов ПОЛ в плазме крови у больных ИБС ее исходно низкая общая антиокислительная активность (АОА) прогрессивно уменьшалась после операции вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 12). Несомненно, в условиях интенсивной генерации АФК антиокислительный потенциал плазмы крови истощается, что имеет место до операции и усугубляется во время ИК. Кроме того, в послеоперационном периоде дефицит антиоксидантов потенцируется значительной гемодилюцией (согласно уровню гематокрита, табл. 4).

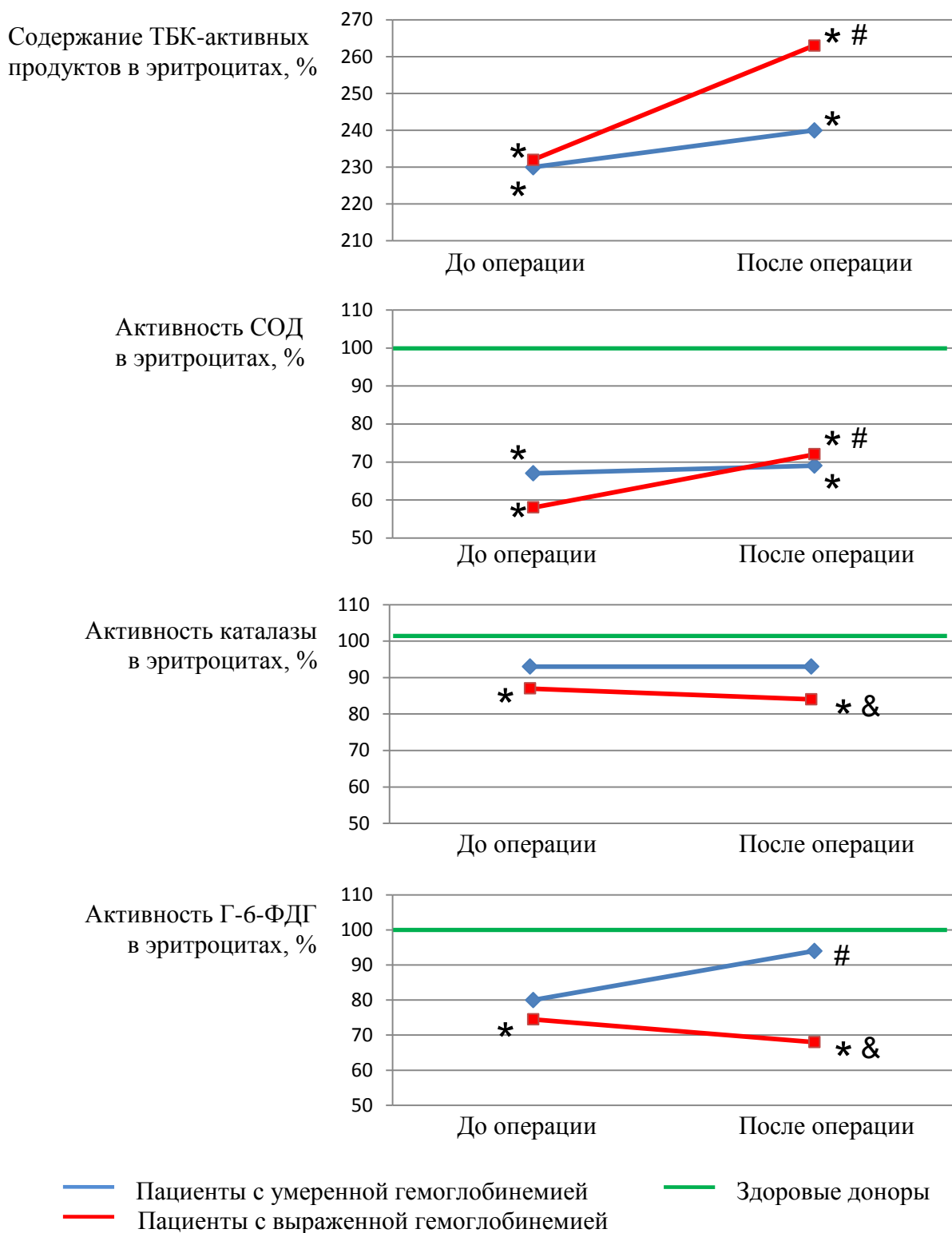
Подводя итог анализу окислительно-антиокислительного баланса плазмы крови у больных ИБС, приходится констатировать, что неоднозначная выраженность цитолиза эритроцитов во время ИК не может быть следствием равного по величине накопления прооксидантов во внеклеточном пространстве, как и равного недостатка антиоксидантов в плазме крови (табл. 12). Поэтому о причастности процессов свободнорадикального окисления к формированию выраженной гемоглобинемии можно говорить лишь в том случае, если источником генерации АФК во время операции является интрацеллюлярный матрикс эритроцитов.

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 (табл. 13, рис. 13). Это свидетельствует об интенсификации ПОЛ в эритроцитарной мембране при ИБС, что 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].

Считается, что высокое содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах

– это результат образования АФК непосредственно в клетке, а также поступления их из плазмы крови. Генерация супероксид-аниона в эритроцитах происходит постоянно при окислении гемоглобина в метгемоглобин, что имеет место в норме и усиливается при патологии [Nohl H. et al., 2003; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Короткина Р.Н. и соавт., 2005]. Кроме того, гемоглобин служит катализатором образования более токсичных радикалов HO^\bullet , которые вытесняют атомы водорода из жирных кислот и белков, опосредуя их свободнорадикальную модификацию. Протоны, в свою очередь, соединяясь с гидроксильными группами, формируют молекулы воды в гидрофобном слое мембраны, опосредуя дестабилизацию липидного бислоя и увеличение его проницаемости [Суханова Г.А., Серебров В.Ю., 2000; Зенков Н.К. и соавт., 2001; Шперлинг И.А. и соавт., 2006].

Также существует мнение, что в условиях сохранной структуры биомембраны составляющие ее липиды недоступны для действия АФК, а это значит, что избыточная липопероксидация в мембране эритроцитов обусловлена фоновыми (ранее сформированными или первичными) нарушениями структуры липидного бислоя с пространственной дезориентацией ее белково-липидных комплексов [Новицкий В. В. и соавт., 2004]. В связи с этим, выявленный избыток ТБК-активных продуктов в эритроцитах у больных ИБС обеих групп исследования до операции (табл. 13, рис. 14) свидетельствует, видимо, об индуцированной атерогенезом модуляции липидного бислоя мембраны красных клеток крови, влекущей за собой активацию ПОЛ. Механизм подобных нарушений может реализовываться через каскад причинно-следственных взаимосвязей: накопление ХС в мембране эритроцитов, повышение ее микровязкости, угнетение функционирования активного ионного транспорта, внутриклеточная аккумуляция Ca^{2+} , активация фосфолипазы A_2 . Результатом последней реакции является накопление в эритроцитах лизофракций ФЛ и свободных жирных кислот, обеспечивающих доступность мембранных структур для повреждающего действия АФК [Nigam S., Schewe T., 2000; Best K.B. et al., 2002; Burton N.M., Bruce L.J., 2011]. Не исключается и прямое электростатическое взаимодействие Ca^{2+} с молекулами кислых фосфолипидов (ФИ, ФС), что может приводить к изменению их физического состояния [Геннис Р., 1997; Новицкий В.В., 2004]. Кроме того, воздействие гипоксантина (образуется при ишемии тканей в больших количествах)



* - уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;
 # - по сравнению с показателями у кардиохирургических больных до операции;
 & - между показателями у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом на соответствующем этапе исследования.

Рис. 14. 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.

на эритроциты *in vitro* само по себе вызывает интенсификацию ПОЛ при снижении активности каталазы и глутатионпероксидазы в клетках красной крови [Mesquita-Casagrande A.C. et al., 2013].

После операции концентрация ТБК-активных продуктов в эритроцитах возрастала по сравнению с дооперационным периодом только у больных с выраженной гемоглобинемией (табл. 13, рис. 14), что свидетельствует об усилении процессов липопероксидации во время экстракорпоральной перфузии у данной категории пациентов в отличие от больных с умеренным гемолизом. Кроме того, именно при выраженной гемоглобинемии в послеоперационном периоде отмечалась положительная корреляция ($r = 0,58$; $p < 0,05$) между ее уровнем и концентрацией ТБК-активных продуктов в эритроцитах (п. 3.13; рис. 15). Следовательно, свободнорадикальное повреждение молекулярных структур эритроцитов лежит в основе патогенеза массивного гемолиза и не свойственно пациентам с умеренной гемоглобинемией.

Механизм цитопатического действия АФК и продуктов ПОЛ на эритроциты достаточно широко известен – это увеличение проницаемости и микровязкости мембраны эритроцитов, ингибирование активности мембран-ассоциированных АТФаз и цитозольных ферментов, потенцирование эффекта фосфолипаз, дезорганизация белков цитоскелета и др. При этом весь комплекс реакций инициируется образованием в мембране эритроцитов первичных продуктов ПОЛ (гидропероксидов липидов, ДК), снижающих плотность упаковки ФЛ в мембранном бислое, и вторичных продуктов (ТБК-активных), которые реагируют с аминокислотами белков и образует поперечные сшивки в структуре полипептидов [Суханова Г.А., Серебров В.Ю., 2000; Nigam S., Schewe T., 2000; Пасечник И.Н., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Васильева Е.М., 2005; Belaia O.L. et al., 2009; Елкина, Н.М. и соавт., 2011; Perrone S. et al., 2012].

При анализе уровня ДК в эритроцитах у больных ИБС было обнаружено его понижение вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования (табл. 13). Известно, что содержание ДК зависит от количества ненасыщенных связей в мембране, которые являются субстратом для свободнорадикального окисления [Камышников В.С., 2000; Суханова Г.А., Серебров В.Ю., 2000; Васильева Е.М., 2005; Belaia O.L. et al., 2009; Boisselier E. et

al., 2013]. Поскольку на фоне атеросклероза имеет место длительная интенсификация ПОЛ, что подтверждается результатами настоящего исследования (табл. 12, 13) и данными литературы (как обсуждалось выше), то усиленная пероксидация липидов эритроцитарной мембраны приводит, вероятно, к сокращению числа ненасыщенных связей в молекулах жирных кислот и меньшему, чем в норме, образованию ДК.

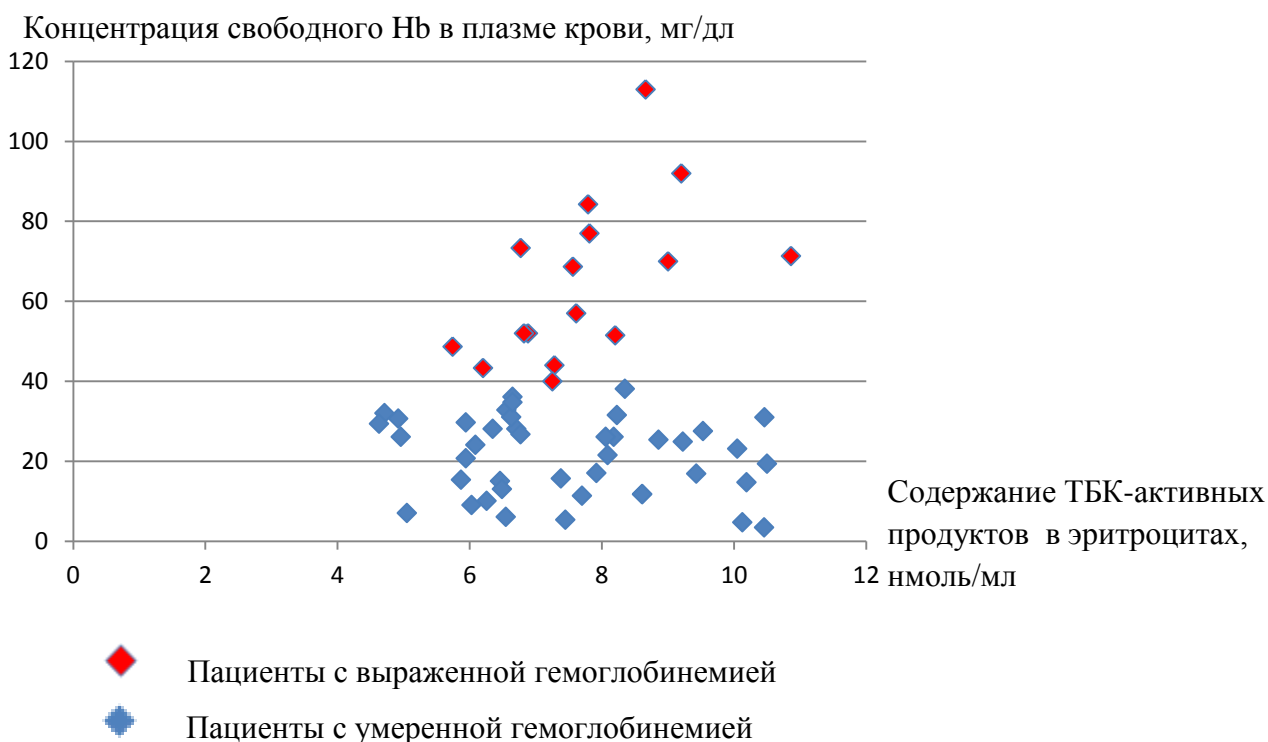


Рис. 15. Зависимость степени выраженности постперфузионной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца от содержания ТБК-активных продуктов в эритроцитах после операции в условиях искусственного кровообращения.

Неустойчивые и короткоживущие ДК представляют собой достаточно лабильный пул молекул, размер которого зависит от скорости их образования и включения в последующие реакции липопероксидации: эти вещества способны как превращаться во вторичные продукты ПОЛ, так и разлагаться с образованием гидропероксидов жирных кислот, которые в норме восстанавливаются глутатинопероксидазой с образованием нерадикального продукта – соответствующего органического спирта, не обладающего цитотоксичностью [Ланкин В.З. и соавт., 2004]. При этом гидропероксиды липидов, находящиеся в растворимом компартменте клетки, метаболизируются цитозольной глутатионпероксидазой эритроцитов, а гидропероксиды ФЛ, локализованные в мембранном бислое, восстанавливаются с помощью глутатионпероксидазы

фосфолипидов. Данный фермент предохраняет ФЛ клеточных мембран от перекисного окисления и участвует в восстановлении радикалов витамина Е [Зенков Н.К. и соавт., 2001; Кузьменко Д.И., 2007; Baseler W.A. et al., 2013].

В виду того, что в эритроцитах у здоровых доноров активность глутатионпероксидазы априори не нарушена, то образование избытка вторичных продуктов ПОЛ из ДК не происходит. Между тем, в эритроцитах у больных ИБС имеется недостаточность ферментов антиоксидантной защиты [Akkus I. et al., 1996; Давыдкин И.Л., Фаттенков В.Н., 2001; Медведева И.В. и соавт., 2002; Kotur-Stevuljevic J. et al., 2007; Мартинович Г.Г. и соавт., 2008; Dandana A. et al., 2011; Ziobro A. et al., 2013] и ДК, по всей видимости, практически полностью метаболизируются до вторичных продуктов ПОЛ, обуславливая избыток ТБК-активных веществ в эритроцитах на фоне низкого содержания ДК (табл. 13).

В зависимости от активности и продолжительности процессов свободнорадикального окисления система антиоксидантной защиты клеток претерпевает двухэтапную модуляцию: сначала в ответ на интенсификацию процессов окисления происходит увеличение антиокислительной активности (стадия адаптации), затем – ее постепенное снижение до нормы и дальнейшее угнетение (стадия истощения) [Зенков Н.К. и соавт., 2001]. Учитывая данную закономерность и тот факт, что длительность клинически верифицированной ИБС у кардиохирургических пациентов обеих групп исследования составила более чем 5 лет (табл. 1), вполне объяснимо равнозначное снижение активности супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах у данных категорий больных на дооперационном этапе (табл. 13, рис. 14).

Как известно, СОД является «первой линией защиты» клеток от АФК, представляя собой индуцируемый фермент, активность которого меняется в зависимости от парциального давления кислорода в среде [Pavliuk N.V. et al., 1998; Кузьменко Д.И., 2007]. Возможно, циркуляторная гипоксия у кардиохирургических больных с ИБС, из которых 100% страдали недостаточностью кровообращения (табл. 1), вносит свой негативный вклад в снижение активности СОД наряду с пролонгированным истощением системы антирадикальной защиты вследствие атерогенеза.

В пользу данной точки зрения свидетельствуют эксперименты, установившие снижение активности СОД и усиление ПОЛ в эритроцитах при адаптации животных к гипоксической гипоксии [Pavliuk N.V. et al., 1998; Zhao Y. et al., 2012]. Поскольку у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом заболевания легких (хроническая обструктивная болезнь легких, пневмофиброз, хронический бронхит), по данным В.В. Новицкого и соавт. [2004], сочетающиеся в 30% случаев с артериальной гипоксемией, встречались в 3 раза чаще, чем у лиц с умеренной гемоглобинемией (табл. 1), то активность СОД в эритроцитах у этих пациентов имела недостоверно меньшие значения до операции, чем у лиц с умеренным гемолизом (табл. 13, рис. 14). Во время ИК гипоксическая гипоксия (но не циркуляторная) устраняется путем создания артериальной гипероксии [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007; Vercaemst L., 2008; Young R.W., 2012], что, вероятно, и объясняет позитивную динамику активности СОД в эритроцитах именно у пациентов с выраженной, но не с умеренной гемоглобинемией (табл. 13, рис. 14).

Другой фактор, который мог бы обусловить неоднозначное изменение активности СОД в эритроцитах у больных двух групп исследования после операции, – это различная степень оксигенации крови в ходе ИК. Между тем, среднее за операцию значение pO_2 в артериальной крови оказалось сопоставимым в группах кардиохирургических пациентов, но максимальное значение pO_2 в крови было большим у пациентов с выраженной гемоглобинемией (табл. 4). Подобная перфузиологическая тактика могла быть продиктована как частой встречаемостью патологии легких у данной категории больных, так и нарушением газотранспортной функции эритроцитов, поскольку pO_2 в крови при ИК поддерживается на уровне, необходимом для 100% насыщения гемоглобина кислородом [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007; Young R.W., 2012]. Учитывая равную величину этого показателя во время операции (как и гематокрита, табл. 4) в обеих когортах оперированных лиц, у пациентов с выраженным гемолизом наиболее логично предположить снижение сродства гемоглобина к кислороду в качестве причины неравномерной оксигенации крови.

В литературе имеются единичные сведения о преимуществах плавной оксигенации перфузата над одномоментным повышением pO_2 в крови во время ИК [Morita K., 2012; Rong J. et al., 2012]. Наряду с этим показано, что 2-часовое

вдыхание чистого кислорода у здоровых доноров не сопровождается изменением активности СОД в эритроцитах [Gasier H.G., Fothergill D.M., 2013]. По всей видимости, в основе интраоперационной активации СОД в эритроцитах у кардиохирургических больных с выраженным гемолизом лежит не гипероксемия как таковая (она отмечалась и у больных с умеренным гемолизом), а редукция более глубокой дооперационной гипоксии, либо эпизоды сверхпороговой гипероксемии (более 200 мм рт.ст., табл. 4) во время ИК, кратковременно активирующей фермент.

В любом случае при выраженной гемоглобинемии интраоперационная активация СОД в красных клетках крови (до уровня больных с умеренной гемоглобинемией) если и влияет на выраженность гемолиза, то незначительно: при выполнении корреляционного анализа обнаружена слабая зависимость уровня постперфузионной гемоглобинемии от максимального значения pO_2 в крови во время ИК (табл. 21) и данный показатель определял лишь 13% вариабельности интраоперационного гемолиза (табл. 26). Кроме того, активность СОД в эритроцитах после операции была сопоставима в группах оперированных лиц (табл. 13, рис. 14), что дает основания предполагать недостаточность других ферментов антиоксидентной защиты эритроцитов, обуславливающих формирование выраженной гемоглобинемии.

Известно, что СОД катализирует дисмутацию супероксид-аниона с образованием пероксида водорода, которая разлагается до воды каталазой и глутатионпероксидазой. Функционирование последней осуществляется при участии восстановленного глутатиона, образование которого зависит от активности ферментов пентозофосфатного шунта в эритроцитах, в частности от глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ) [Зенков Н.К. и соавт., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Кузьменко Д.И., 2007; Perrone S. et al., 2012; Ziobro A. et al., 2013].

Исследование активности каталазы и Г-6-ФДГ в эритроцитах зарегистрировало низкий их уровень (по сравнению с нормой) у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом на всех этапах исследования, в отличие от нормальных ее значений у пациентов с умеренной гемоглобинемией (табл. 13, рис. 14).

Как известно, содержание антиоксидантов в клетках снижается при

активации свободнорадикального окисления. Окисление липидов приводит к резкому нарушению физико-химической структуры мембраны и дезактивации ряда ферментов (Г-6-ФДГ, лактатдегидрогеназы, каталазы) [Кленова Н.А., 2003; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Kotur-Stevuljevic J. et al., 2007; Perrone S. et al., 2012; Ziobro A. et al., 2013]. Между тем, недостаточность каталазы и Г-6-ФДГ в эритроцитах до операции у больных с выраженным гемолизом нельзя объяснить истощением или повреждением этих ферментов вследствие высокой активности свободнорадикального окисления в клетках, так как содержание продуктов ПОЛ в эритроцитах до операции у пациентов обеих групп исследования было сопоставимым (табл. 13).

Принимая во внимание тот факт, что до операции у больных с выраженным гемолизом количество ретикулоцитов в крови было большим (табл. 7), чем в группе сравнения, дефицит антиоксидантов у этой категории лиц не укладывается в традиционное представление о высокой функциональной активности молодых форм эритроцитов, обладающих максимальным запасом метаболически активных молекул (в том числе и антиоксидантов) [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 антиокислительной защиты клеток красной крови, продуцированных в условиях более напряженного (чем у пациентов с умеренным гемолизом) эритропоэза. Так, Ю.А. Лакомой [2006] показано, что старение эритроцитов, образованных в ходе напряженного эритропоэза сопровождается более быстрым снижением активности Г-6-ФДГ, чем в норме. Кроме того, нельзя исключать и недостаточный синтез молекул каталазы и Г-6-ФДГ в клетках красной крови при ускоренной дифференцировке эритрокариоцитов. Данное предположение наиболее вероятно, так как в норме активность каталазы не зависит от числа молодых форм эритроцитов в крови, поскольку не изменяется при созревании ретикулоцита в эритроцит, в отличие от закономерного уменьшения активности Г-6-ФДГ, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, глутатион-S-трансферазы и содержания восстановленного глутатиона [Sailaja Y.R. et al., 2003].

После операции у больных с умеренным гемолизом активность каталазы в эритроцитах оставалась в пределах нормы, при этом активность Г-6-ФДГ даже возрастала по сравнению с дооперационными значениями (табл. 13, рис. 14), 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; Лакомой 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 даже негативную тенденцию по отношению к дооперационным значениям (табл. 13, рис. 14). Последнее можно интерпретировать как элиминацию из костного мозга неполноценных ретикулоцитов, характеризующихся дефицитом каталазы и Г-6-ФДГ, что, вероятно, потенцируется интраоперационным повреждением данных ферментов вследствие активации свободнорадикального окисления (согласно увеличению содержания ТБК-активных продуктов в эритроцитах после операции, табл. 13).

В конечном итоге интенсификация ПОЛ в эритроцитах после операции у больных с выраженным гемолизом сочетается не просто с дефицитом каталазы и Г-6-ФДГ в клетках, а с достоверно меньшей активностью этих ферментов по сравнению с таковой у пациентов группы сравнения на соответствующем этапе исследования (табл. 13, рис. 14). Данное обстоятельство при одинаково низкой активности СОД в эритроцитах у оперированных лиц позволяет думать, вероятно, о недостаточной утилизации пероксида водорода, который индуцирует усиленную липопероксидацию во время операции при выраженной гемоглобинемии (рис. 16).

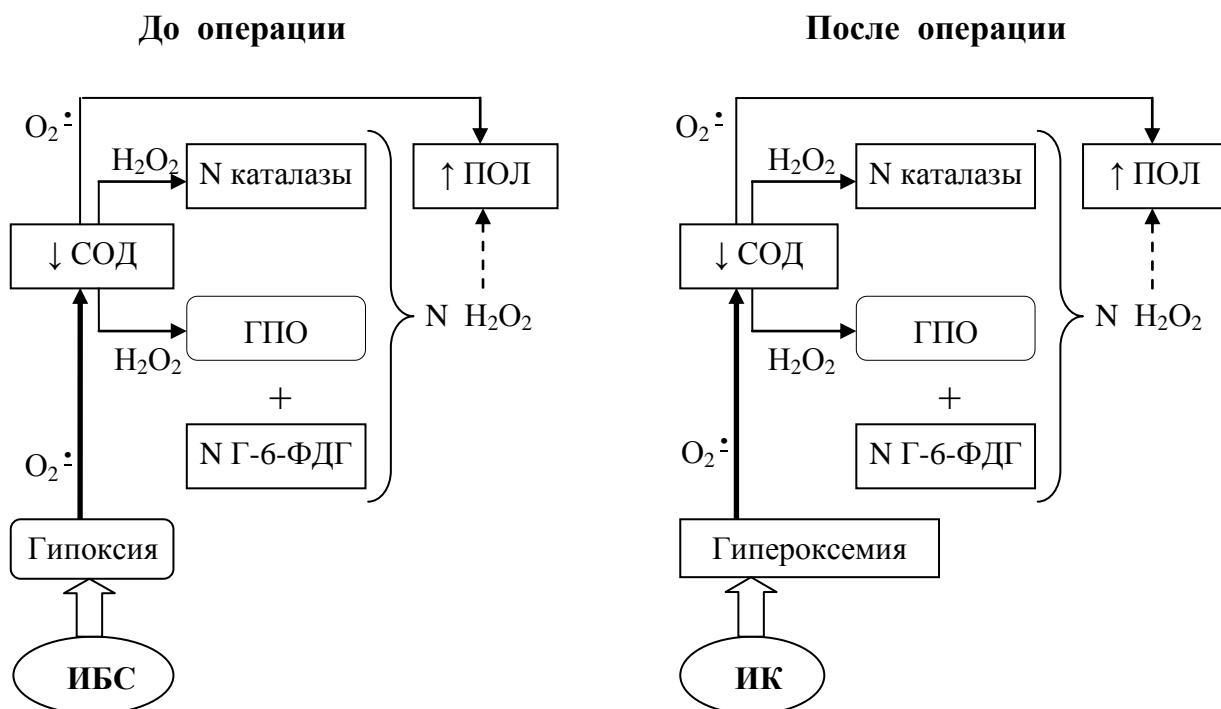
Неполная дисмутация супероксид-аниона (как другой фактор липопероксидации) при его повышенной генерации в условиях интраоперационной гипероксемии и низкой активности СОД в эритроцитах (рис. 16) вряд ли имеет отношение к активации ПОЛ при выраженном гемолизе, так как зарегистрирована и при умеренной гемоглобинемии. Между тем, не исключено повышенное образование данного радикала у больных с выраженным гемолизом вследствие кратковременных эпизодов сверхпороговой гипероксемии (более 200 мм рт.ст., табл. 4), однако этот параметр определяет лишь 13,3% (табл. 26) вариабельности

уровня послеоперационной гемоглобинемии, в то время как низкая активность каталазы и Г-6-ФДГ – 15,2% и 24,7% соответственно (т.е. в сумме 39,9%, табл. 25). Поэтому правомочно заключить, что исходная недостаточность данных энзимов в эритроцитах вследствие функциональной неполноценности клеток является ведущим механизмом интенсификации свободнорадикального повреждения эритроцитов при выраженном гемолизе.

Тем не менее, до операции недостаточность каталазы и Г-6-ФДГ в клетках красной крови у больных с выраженной постперфузионной гемоглобинемией не манифестировала (активность ПОЛ в эритроцитах была равной таковой у пациентов с умеренным гемолизом, имевших нормальную активность этих ферментов), вероятно, вследствие глубокого дефицита СОД, ингибированной на фоне гипоксемии в результате неспецифических заболеваний легких (рис. 16), либо недостаточно продуцированной в эритрокариоцитах в виду напряженного эритропоэза. Кроме того, показано, что наследственно обусловленный дефицит Г-6-ФДГ в эритроцитах в обычных условиях также не проявляется до тех пор, пока в крови не появятся окислители [Радченко В.Г., 2003; Воробьев А.И., 2005; Elyassi A.R., Rowshan H.H., 2009]. У больных с умеренным гемолизом помимо отсутствия дефекта каталазы и Г-6-ФДГ в эритроцитах отмечалось высокое содержание ХС в клеточной мембране до операции (большее, чем при выраженной гемоглобинемии). Данное обстоятельство можно расценивать как протективный фактор в отношении активации ПОЛ, поскольку ХС обладает свойством структурного антиоксиданта, ограничивающего подвижность жирнокислотных остатков фосфолипидов, что делает их более устойчивыми к действию свободных радикалов [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Belaia O.L. et al., 2009].

Таким образом, эритроциты больных ИБС характеризуются низкой активностью СОД вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза, но у пациентов с умеренной гемоглобинемией это сочетается с нормальной активностью каталазы и Г-6-ФДГ, определяя эффективную антиоксидантную защиту клеток в условиях интраоперационной гипероксемии. Развитие выраженного гемолиза, напротив, связано с предсуществующей недостаточностью этих ферментов вследствие функциональной неполноценности молодой популяции

Кардиохирургические больные с умеренным постперфузионным гемолизом



Кардиохирургические больные с выраженным постперфузионным гемолизом

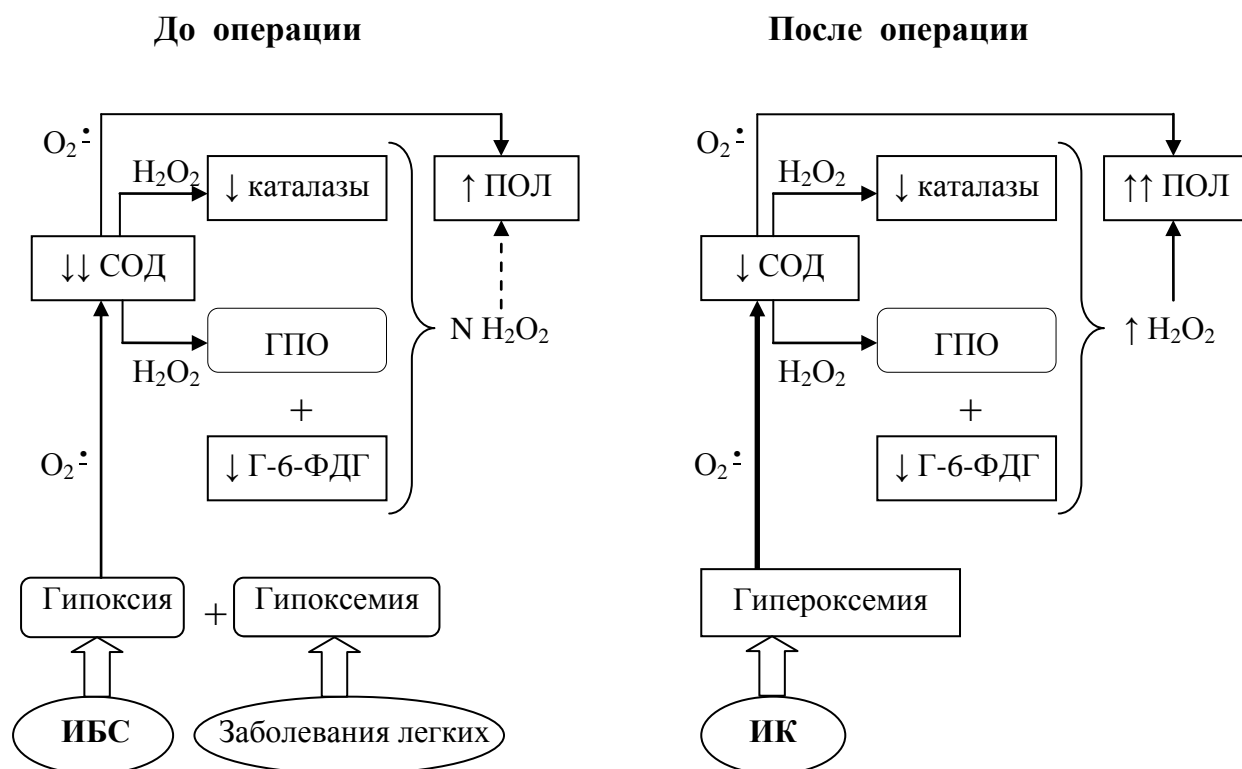


Рис. 16. Роль ферментативного звена системы антиоксидантной защиты эритроцитов в механизм активации ПОЛ их мембраны у больных ишемической болезнью сердца при формировании умеренной и выраженной гемоглобинемии после операции в условиях искусственного кровообращения.

Примечание: см. рис. 9, СОД – супероксиддисмутаза, ГПО – глутатионпероксидаза, Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ПОЛ – перекисное окисление липидов.

эритроцитов, что ведет к усилению ПОЛ и массивной деструкции клеток во время ИК на фоне увеличения активности СОД до значений, не превышающих соответствующий показатель в альтернативной группе больных. Тем не менее, повышение активности СОД во время ИК увеличивает образование пероксида водорода, которая при низкой активности каталазы и Г-6-ФДГ не разлагается до воды и индуцирует свободнорадикальное повреждение эритроцитов, сопровождающееся изменением их свойств.

Одним из эффектов активации ПОЛ в клетках является увеличение неспецифической проницаемости их мембраны, в том числе и для гидрофильных низкомолекулярных веществ, в частности мочевины [Михайлович В.А. и соавт., 1993; Суханова Г.А., Серебров В.Ю., 2000; Пасечник И.Н., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Васильева Е.М., 2005; Belaia O.L. et al., 2009; Perrone S. et al., 2012]. Последняя пассивно проникает в цитозоль через дефекты упаковки молекул в бислое, липидные поры и, будучи осмотически активной, опосредует поступление воды в клетку, вызывая ее сферуляцию и лизис. На этом принципе основано изучение проницаемости мембраны эритроцитов с помощью мочевинового гемолиза, т.е. чем меньше концентрация мочевины, при которой отмечается цитолиз 50% эритроцитов, тем выше проницаемость клеточной мембраны [Михайлович В.А. и соавт., 1993].

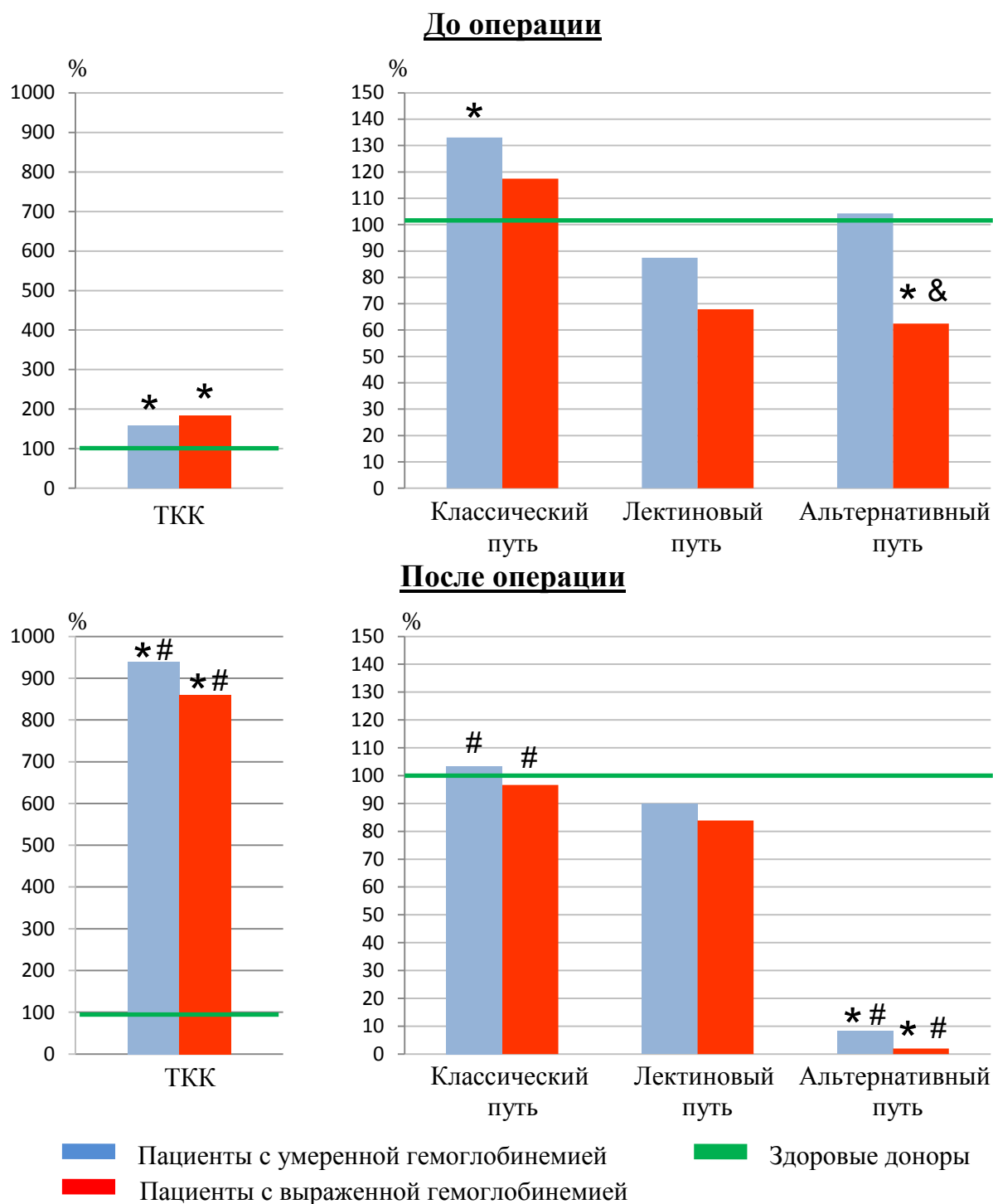
Оценка проницаемости мембраны эритроцитов позволила установить, что у больных с умеренным постперфузионным гемолизом уровень 50% цитолиза эритроцитов в растворе мочевины соответствовал норме до оперативного вмешательства и снижался после его завершения (табл. 15), отражая интраоперационное увеличение проницаемости эритроцитарной мембраны. В то же время формированию выраженной постперфузионной гемоглобинемии предшествовало снижение показателя мочевинового гемолиза, которое сохранялось таковым и в послеоперационном периоде (табл. 15). Следовательно, проницаемость мембраны эритроцитов у этой категории лиц была повышена еще до проведения ИК, выполняя, вероятно, роль предрасполагающего этиологического фактора в развитии выраженного гемолиза после ИК. Очевидно, что увеличение проницаемости мембраны эритроцитов до операции у больных с выраженной гемоглобинемией потенцировало гемолиз на дооперационном этапе исследования.

Это подтверждается отрицательной корреляцией содержания свободного гемоглобина в плазме крови до операции с показателем мочевинового гемолиза в этот же период ($r = -0,39$; $p < 0,05$; табл. 20), что означает – дооперационная гемоглобинемия тем выше, чем больше проницаемость плазмолеммы эритроцитов.

Сопоставляя полученные данные с результатами оценки активности ПОЛ в эритроцитах у кардиохирургических больных, приходится констатировать, что причиной изменения проницаемости эритроцитарной мембраны для низкомолекулярных гидрофильных веществ является иной механизм (отличный от ПОЛ), поскольку содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах до операции не отличалось у пациентов обеих групп и повышалось только у больных с выраженным гемолизом, в то время как проницаемость мембраны – только у пациентов с умеренной гемоглобинемией (табл. 13, 15).

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 др.), как и недостаток таковых на собственных клетках организма, индуцирует активацию системы комплемента, которая завершается образованием терминального комплекса комплемента (ТКК) и мембраноатакующего комплекса (МАК). Последний, представляя собой порообразующую молекулу цилиндрической формы с гидрофильным центром, опосредует повышение проницаемости мембраны клеток и их гибель [Ройт А. и соавт., 2000; Glovsky M. et al., 2004; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Testa L. et al., 2008].

В ходе исследования было показано, что содержание ТКК в сыворотке крови до операции у больных ИБС двух групп сравнения определялось выше значений у здоровых доноров (табл. 16, рис. 17). По данным литературы, усиление активности комплемента при атеросклерозе действительно отмечается [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]. Важную роль в этом процессе играет высокое содержание иммунных комплексов и С-реактивного белка в плазме крови, которые, связываясь с C1q, запускают классический путь активации комплемента



* - уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;

- по сравнению с показателями у кардиохирургических больных до операции;

& - между показателями у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом на соответствующем этапе исследования.

Рис. 17. Содержание терминального комплекса комплемента в сыворотке крови и функциональная активность путей активации комплемента у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом после операций в условиях искусственного кровообращения.

Примечание: ТКК – терминальный комплекс комплемента.

[Pepys M.B., Hirschfield G.M., 2003; Лутай М.И., 2004; Radanova M. et al., 2012]. Кроме того, гипоксия способствует генерации C1q в ишемизированных тканях при ИБС [Редчиц Е.Г., 1989; Banz Y., Rieben R., 2012; Horváth Z. et al., 2013], а высокое содержание провоспалительных цитокинов усиливает продукцию компонентов комплемента [Ройт А. и соавт., 2000; Schlaf G. et al., 2001; Егоренкова Л.В. и соавт., 2005; Gu H. et al., 2012].

Важно отметить, что у пациентов с выраженной постперфузионной гемоглобинемией содержание ТКК в сыворотке крови до операции незначительно превышало показатель у больных с умеренной гемоглобинемией (табл. 16, рис. 17). Является ли это причиной повышенной проницаемости мембраны эритроцитов у данной категории лиц и ускоренной комплемент-зависимой гибели клеток до операции – утверждать трудно, поскольку линейная зависимость между уровнем ТКК в сыворотке крови и дооперационной гемоглобинемией не обнаруживалась. Однако исключить данный механизм тоже нельзя, так как гидрофобный МАК (C5b-9), обладающий цитолитическим действием, не идентичен гидрофильному ТКК в сыворотке крови (C5b-9S), отражающему лишь степень активации системы комплемента [Ройт А. и соавт., 2000; Wehlin L. et al., 2004; Glovsky M. et al., 2004]. При истощении в плазме крови витронектина, удерживающего комплекс C5b67 в жидкой фазе [Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Griffiths N.J. et al., 2011; Lv W. et al., 2013], активация системы комплемента, по всей видимости, может завершаться интенсивным внедрением МАК в мембрану эритроцитов и гемолизом, не сопровождающимся значительным ростом уровня ТКК в крови.

После операции у кардиохирургических больных содержание ТКК в сыворотке крови многократно возросло по отношению к исходным значениям вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 16, рис. 17). Чрезмерная активация системы комплемента в условиях ИК – известный факт, и вызвана она контактом крови с синтетической поверхностью аппарата ИК, введением гепарина и протамина сульфата, гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, транслокацией эндотоксинов через ишемизированную стенку кишечника и непосредственно ишемией тканей [Chambers S.D. et al., 1996; Винницкий Л.И. и соавт., 1997; 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 отметить, что содержание ТКК в сыворотке крови положительно коррелировало ($r = 0,61$) с уровнем гемоглобинемии после операции только у больных с умеренным постперфузионным гемолизом (п. 3.13), в отличие от пациентов другой группы исследования (рис. 18). Следовательно, формирование умеренной гемоглобинемии после ИК обусловлено комплемент-зависимым лизисом эритроцитов во время перфузии и данный механизм не играет ведущей роли в патогенезе выраженного гемолиза, что может указывать на дополнительное участие других процессов (оксидативный стресс, механическая травма) в интраоперационной гибели эритроцитов у данной категории больных.

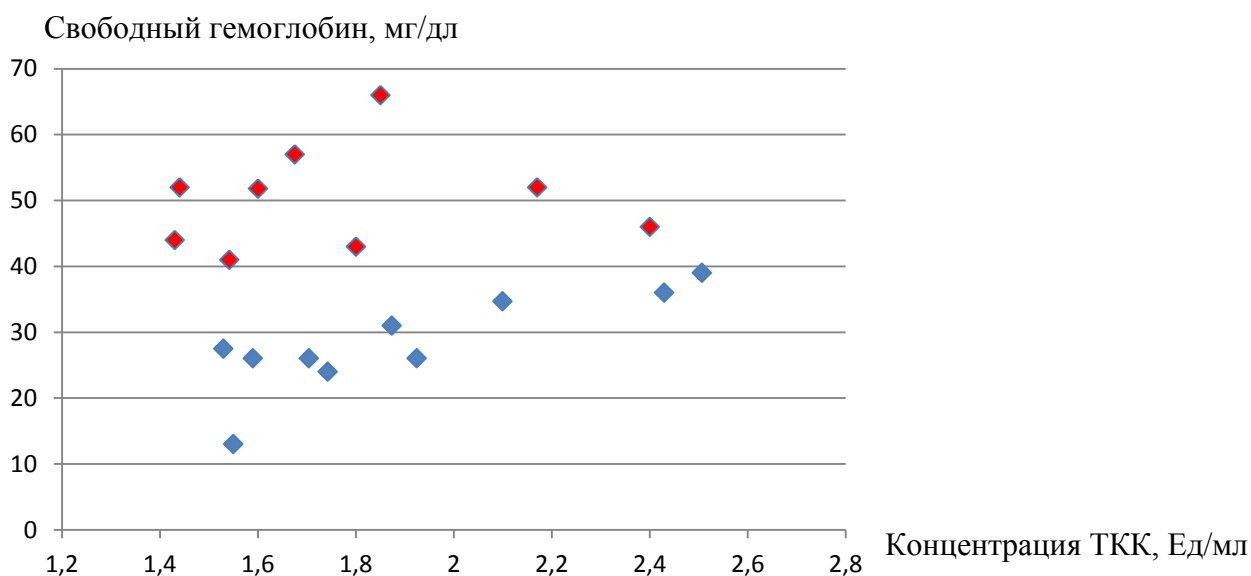


Рис. 18. Зависимость между концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови и количеством терминального комплекса комплемента в сыворотке крови после операции у больных ишемической болезнью сердца (ИБС), оперированных в условиях искусственного кровообращения.

Примечание: ◆ - больные ИБС с умеренным гемолизом, ◆ - больные ИБС с выраженным гемолизом, ТКК - терминальный комплекс комплемента.

Существенное увеличение генерации ТКК во время операции является итогом стимулирующего влияния ИК на все три пути активации комплемента (классический, лектиновый, альтернативный), что является причиной многочисленных органных нарушений в послеоперационном периоде [Винницкий Л.И. и соавт., 1997; Wan S. et al., 1997; Fromes Y. et al., 2002; Van den Goor J. et al., 2004; Banz Y., Rieben R., 2012; Kubicki R. et al., 2013; Lv W. et al., 2013]. При этом

суммарное содержание факторов соответствующего пути в крови составляет его функциональную активность, т.е. суммарный резерв, способный включиться в каскадный механизм генерации ТКК при наличии характерного стимула, что следует отличать от понятия «активация пути комплемента», отражающего уже существующий процесс его инициации [Luo J. et al., 1998].

Функциональная активность классического пути комплемента до операции у кардиохирургических больных с умеренным постперфузионным гемолизом превышала норму, проявляя аналогичную тенденцию у пациентов с выраженной гемоглобинемией (табл. 16, рис. 17). Подобные изменения, скорее всего, обусловлены процессом атерогенеза, который сопровождается гиперпродукцией провоспалительных цитокинов (интерлейкинов (IL) 1, 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], индуцирующих в гепатоцитах, макрофагах и нейтрофилах выработку компонентов комплемента, как белков острой фазы [Ройт А. и соавт., 2000; Schlaf G. et al., 2001; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Degn S.E. et al., 2013]. В частности, у больных с умеренным гемолизом накануне операции обнаруживался профицит TNF- α в плазме крови, чего не отмечалось у пациентов с выраженной гемоглобинемией (табл. 7). Кроме того, у этой категории больных до операции была зарегистрирована положительная корреляционная связь между функциональной активностью классического пути системы комплемента и количеством ТКК в сыворотке крови ($r = 0,79$; $p < 0,05$; рис. 19), т.е. избыточное его образование до ИК у больных с умеренной гемоглобинемией, очевидно, происходит вследствие гиперпродукции факторов классического пути на фоне избытка TNF- α в плазме крови.

После ИК функциональная активность классического пути комплемента у кардиохирургических больных обеих групп сравнения снижалась менее исходных цифр, оставаясь при этом в пределах нормальных значений (табл. 16, рис. 17). Негативная динамика показателя, вероятно, объясняется гемодилюцией и потреблением факторов классического пути во время операции. Поскольку активация классического пути комплемента, согласно общебиологическим закономерностям, осуществляется при взаимодействии C1q-компонента с иммунными комплексами, содержание которых в крови снижается в ходе ИК

[Шумаков В.И. и соавт., 2003; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Radanova M. et al., 2012; Degn S.E. et al., 2013; Horváth Z. et al., 2013], данный механизм вряд ли имеет существенное значение. Скорее всего, инициация пути происходит в конце ИК при нейтрализации гепарина протамином сульфата, что стимулирует классический путь активации системы комплемента [Fromes Y. et al., 2002; Paparella D. et al., 2002; Van den Goor J. et al., 2004; Marcheix B. et al., 2008].

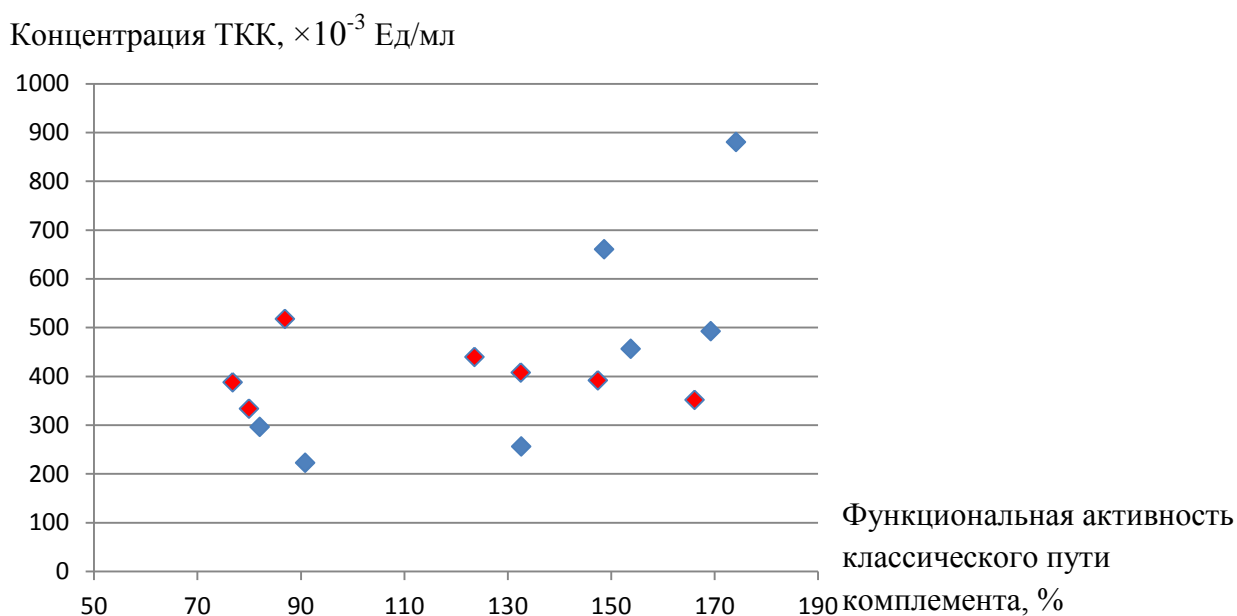


Рис. 19. Зависимость между функциональной активностью классического пути комплемента и содержанием терминального комплекса комплемента в сыворотке крови у больных ишемической болезнью сердца до операции в условиях искусственного кровообращения.

Примечание: см. рис. 18.

В отличие от классического, функциональная активность альтернативного пути комплемента до операции у больных ИБС существенно различалась: у пациентов с выраженным гемолизом данный показатель был снижен по отношению к таковому как у здоровых доноров, так и в группе пациентов с умеренной гемоглобинемией, у которых он соответствовал норме (табл. 16, рис. 17). 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]. Равное дооперационное содержание ТКК в сыворотке крови у больных с выраженным и умеренным гемолизом (табл. 16, рис. 17) служит основанием отвергнуть первую точку зрения. Более того, отрицательная

корреляция между содержанием ТКК в сыворотке крови и активностью альтернативного пути комплемента ($r = -0,86$; $p < 0,05$; рис. 20) у пациентов с выраженным гемолизом позволяет предполагать именно потребление факторов последнего вследствие его гиперактивации.

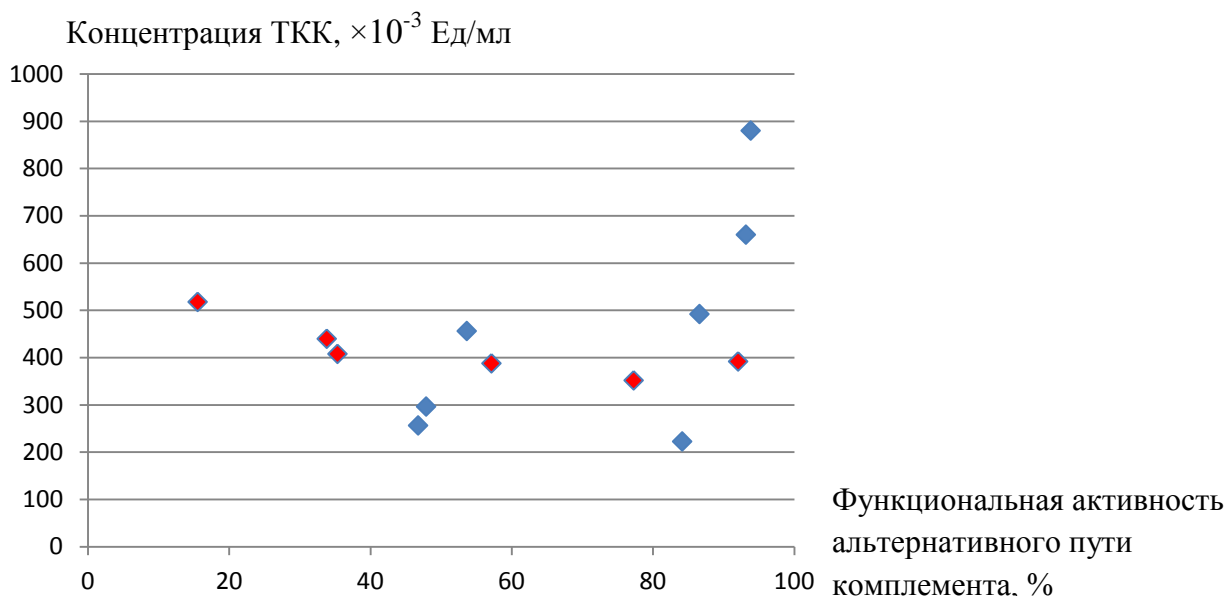


Рис. 20. Зависимость между функциональной активностью альтернативного пути комплемента и содержанием терминального комплекса комплемента в сыворотке крови у больных ишемической болезнью сердца до операции в условиях искусственного кровообращения.

Примечание: см. рис. 18.

Кроме того, при объединении всех пациентов в общую группу больных на дооперационном этапе обнаружена интересная закономерность: увеличение содержания ТКК в сыворотке крови при низкой функциональной активности альтернативного пути комплемента (менее нормы, равной 70%, табл. 16) характеризовалось отрицательной зависимостью данных показателей, а при увеличении выше нормы – положительной (рис. 20). Следовательно, избыточное образование ТКК у больных ИБС до операции может происходить либо на фоне потребления факторов комплемента альтернативного пути, что больше свойственно пациентам с выраженной гемоглобинемией, либо на фоне гиперпродукции этих факторов, что наиболее характерно для лиц с умеренным гемолизом (рис. 20).

После операции у больных ИБС обеих групп исследования определялось резкое снижение активности альтернативного пути комплемента (табл. 16, рис. 17),

что, по всей видимости, отражало массивное потребление его компонентов во время ИК. Как известно, взаимодействие крови с синтетическими компонентами аппарата ИК стимулирует альтернативный путь активации комплемента [Paparella D. et al., 2002; Van den Goor J. et al., 2004; Nilsson B. et al., 2007; Marcheix B. et al., 2008]. При этом глубокий дефицит последнего, очевидно, свидетельствует о его ведущей роли в инициации системы комплемента при экстракорпоральной перфузии.

По данным литературы, триггером активации альтернативного пути комплемента служит непосредственный контакт крови с чужеродной поверхностью, не обладающей естественными ингибиторами комплемента. Это усиливает спонтанный гидролиз тиоэфирной связи в нативной молекуле C3, что в норме имеет место *in vivo*, но сдерживается ингибиторами [Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Nilsson B. et al., 2007; Pangburn M.K. et al., 2008; Degn S.E. et al., 2013]. Между тем, до операции у больных с выраженным гемолизом взаимодействие крови с аппаратом ИК еще не происходит, поэтому на роль чужеродной поверхности могут претендовать только бактериальные мембраны (при наличии инфекционных заболеваний). Последние, благодаря высокому содержанию остатков маннозы, фруктозы и глюкозамина, способны также запускать и лектиновый путь активации комплемента [Ройт А. и соавт., 2000; Tsukamoto H., Horiuchi T., 2006; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Degn S.E. et al., 2013].

Тем не менее, на фоне существенных дооперационных различий в активности альтернативного пути комплемента у больных сравниваемых групп потенциал лектинового пути отличался незначительно (табл. 16, рис. 17), что не позволяет рассматривать микробный агент в качестве индуктора альтернативного пути активации комплемента до операции у больных с выраженным гемолизом. В послеоперационном периоде активность лектинового пути комплемента также оставалась в пределах нормы независимо от выраженности постперфузионной гемоглобинемии и не изменялась в динамике (табл. 16, рис 17), демонстрируя, очевидно, эффективность асептических условий операции и достаточность барьерной функции кишечной стенки оперируемых пациентов.

Анализируя данные о состоянии системы комплемента у кардиохирургических больных, можно заключить, что развитию выраженного постперфузионного гемолиза еще до операции предшествует гиперактивация системы комплемента, преимущественно, по альтернативному пути, которая не связана с инфекционными агентами. Данный факт сочетается с повышением проницаемости мембраны эритроцитов и не отмечается (до ИК) у пациентов с умеренной гемоглобинемией. Следовательно, избыточную активацию альтернативного пути комплемента до операции у пациентов с выраженным постперфузионным гемолизом трудно интерпретировать воздействием какого-либо внешнего фактора, поэтому не исключено наличие дисбаланса в системе регуляторных белков комплемента, в частности, нарушение их экспрессии на мембране эритроцитов как наиболее многочисленных клеток крови.

Среди мембран-ассоциированных ингибиторов комплемента на поверхности эритроцитов экспрессируются CD35-, CD55- и CD59-молекулы. Первые две регулируют степень активации комплемента в крови, а последняя предохраняет клетки от внедрения в цитолемму уже образовавшегося МАК [Ройт А. и соавт., 2000; 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]. По данным литературы, CD59 определяется на поверхности всех клеток организма [Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007], поэтому наследственно обусловленный дефицит этой молекулы имел бы, скорее всего, тяжелые клинические последствия. Приобретенная недостаточность CD59 на клетках эритроидного ряда в обязательном порядке сопровождается развитием пароксизмальной ночной гемоглобинурии – редко встречающейся гемолитической анемии с яркими клиническими проявлениями [Воробьев А.И., 2005; Kelly R. et al., 2009; Kim Y. et al., 2010], которая, как гематологическое заболевание, являлась критерием исключения больных из настоящего исследования. В связи с этим на поверхности эритроцитов у кардиохирургических больных оценивали экспрессию CD35- и CD55-молекул.

В результате было показано, что доля клеток, несущих CD35, имела сопоставимые значения между больными ИБС с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом и варьировала на уровне нормы на обоих этапах исследования (табл. 16). Отсутствие каких-либо изменений этого показателя в

динамике или его различий между группами больных, связано, вероятно, как с достаточно сильной вариабельностью экспрессии CD35 на эритроцитах внутри человеческой популяции [Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., 2001], так и с важной ролью данной молекулы в механизмах иммунологической защиты, поскольку она также экспрессируется на моноцитах, нейтрофилах, эозинофилах, лимфоцитах и дендритных клетках [Ройт А. и соавт., 2000; Yazdanbakhsh K. et al., 2003; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Alegretti A.P. et al., 2012].

Комплексных данных о роли CD35 в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний и постперфузионных осложнений в литературе практически нет. Показано, что введение кардиохирургическим больным растворимой формы CD35 редуцирует негативные эффекты ИК на функциональное состояние миокарда в послеоперационном периоде [Chai P.J. et al., 2000], а у животных снижает интенсивность внутрисосудистого гемолиза в экспериментах с гемотрансфузиями АВ0-несовместимой крови [Yazdanbakhsh K. et al., 2003]. Взаимодействие C3b-компонента комплемента с мембраной эритроцита может оказывать разнонаправленные эффекты на микрореологические свойства клеток: с одной стороны осаждение C3b на CD35 инициирует фосфорилирование нитей спектрина в цитоскелете эритроцитов, повышая тем самым деформируемость клеток, с другой – его связывание с гликофорин А, напротив, существенно снижает деформируемость клеток красной крови [Glodek A.M. et al., 2010]. Учитывая, что после операции в крови у больных с умеренным и выраженным гемолизом число эритроцитов, экспрессирующих гликофорин А, было равнозначным (табл. 8) при различной деформируемости клеток (табл. 9), взаимодействие C3b с CD35 эритроцитов, скорее всего, имело благоприятное значение в изменении их микрореологических свойств при выраженной гемоглобинеми.

Численность CD55⁺ эритроцитов у больных с выраженным гемолизом (в отличие от пациентов с умеренной гемоглобинемией) не достигала нормальных величин как до, так и после операции (табл. 16). Возможно, именно дефицит CD55-молекулы на поверхности эритроцитов является причиной дооперационной гиперактивации альтернативного пути комплемента в данной группе больных ИБС.

Известно, что CD55 угнетает образование комплекса C3bBb (C3-конвертазы альтернативного пути) и ускоряет его диссоциацию в отличие от CD35-молекулы,

которая обладает только вторым эффектом [Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., 2001; Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007; Alegretti A.P. et al., 2012]. В связи с этим недостаток экспрессии CD55, вероятно, потенцирует «холостую» (чужеродная поверхность отсутствует) сборку комплекса C3bBb, который образуется с участием фактора D и стабилизируется фактором P (пропердином) [Ройт А. и соавт., 2000; Degn S.E. et al., 2013]. По данным литературы, оба фактора имеют очень низкую концентрацию в сыворотке крови (1 мкг/мл и 25 мкг/мл соответственно против 1200 мкг/мл для C3 и 500 мкг/мл для C4 [Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007]) и поэтому, возможно, первыми истощаются при длительной активации комплемента, вызванной дефицитом CD55. Так как факторы D и P не участвуют в классическом и лектиновом путях активации комплемента непосредственно, образуя лишь петлю усиления [Ройт А. и соавт., 2000; Degn S.E. et al., 2013], то, видимо, именно поэтому функциональная активность этих механизмов у пациентов с выраженным гемолизом не снижалась до операции (табл. 16, рис. 17).

Экспрессия молекул-ингибиторов комплемента максимальна на молодых клетках красной крови и снижается в процессе циркуляции эритроцитов в кровеносном русле [Alegretti A.P. et al., 2012]. Тем не менее, дефицит CD55⁺ эритроцитов определялся у больных с выраженным гемолизом, у которых содержание ретикулоцитов в крови было наибольшим (табл. 7). В виду того, что зрелые клетки эритроидного ряда не способны к синтезу белка [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Воробьев А.И., 2005; Морозова Т.В. и соавт., 2007; Liu J.J. et al., 2010], недостаточная экспрессия CD55 на мембране эритроцитов, скорее всего, обусловлена нарушением образования этой молекулы в ходе напряженного эритропоэза. Показано, что длительная стимуляция красного ростка при малярии, опосредует снижение данного показателя, в отличие от его увеличения на фоне кратковременного введения эритропоэтина больным с предсуществующей депрессией эритропоэза (при хронической почечной недостаточности). При этом экспрессия CD35 в обоих случаях не изменяется [Ohn H. et al., 2003; Mahajan R.C. et al., 2011].

Молекула CD55, как и CD59, представляет собой белок, удерживаемый в мембране эритроцитов с помощью своеобразной якорной структуры –

гликозилфосфатидилинозитола, глубокий дефицит которого был установлен у больных с пароксизмальной ночной гемоглобинурией [Воробьев А.И., 2005; Kelly R. et al., 2009; Kim Y. et al., 2010]. Кроме того, при системной красной волчанке также предполагается нарушение синтеза данного вещества или неправильное прикрепление белковой части молекулы к мембране в эритрокариоцитах, что сопровождается развитием гемолитической анемии [Alegretti A.P. et al., 2012]. Некоторые авторы придерживаются мнения, что именно дефицит CD59 на эритроцитах ответственен за развитие массивного внутрисосудистого гемолиза у больных пароксизмальной ночной гемоглобинурией, а молекула CD55 имеет второстепенное значение [Kim Y. et al., 2010; Mahajan R.C. et al., 2011]. Учитывая отсутствие интенсивного гемолиза до операции у больных ИБС обеих групп исследования, экспрессия CD59 на эритроцитах, видимо, не была нарушена.

Между тем, в экспериментальных исследованиях на мышах было показано, что выраженный дефицит молекул CD55 и CD59 на эндотелии, ускоряет развитие выраженного атеросклероза, в том числе и коронарных артерий [Leung V.W. et al., 2009; Wu G. et al., 2009; Lewis R.D. et al., 2011]. Вероятно, выявленный дефицит CD55 на мембране эритроцитов у пациентов с высоким уровнем постперфузионной гемоглобинемии также может способствовать развитию более глубоких атеросклеротических изменений сосудистой стенки.

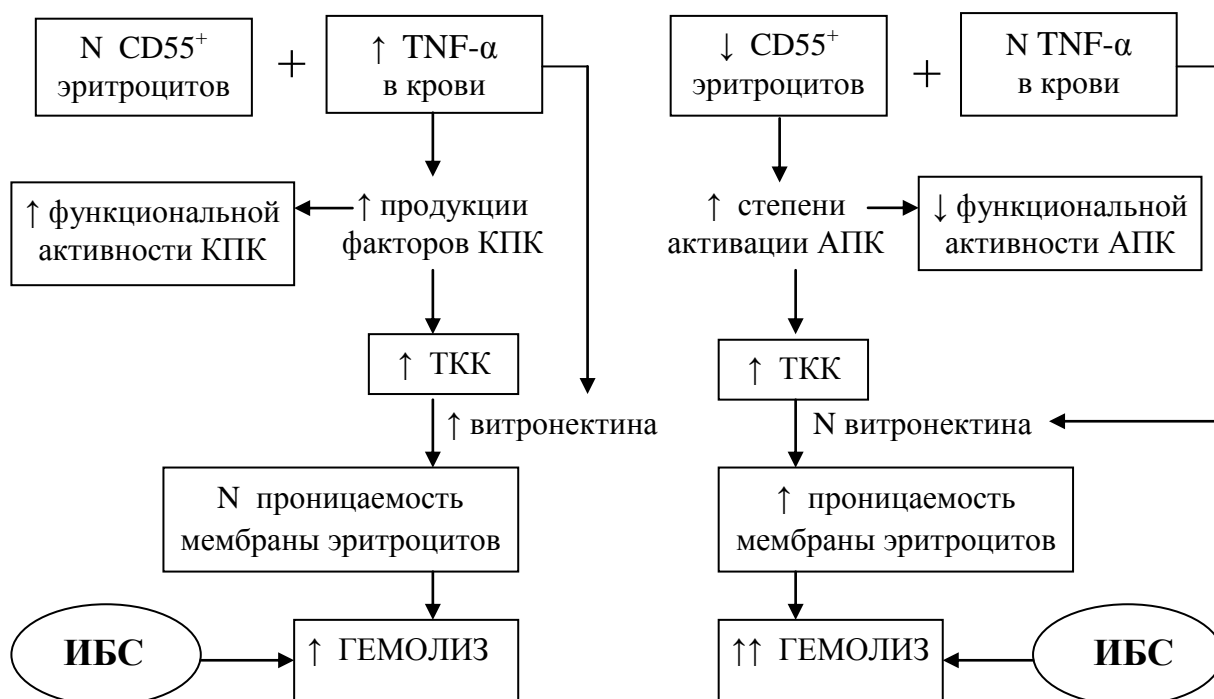
В послеоперационном периоде численность CD55-позитивных эритроцитов в крови у больных ИБС обеих групп исследования оставалась на уровне дооперационных значений, проявляя отчетливую тенденцию к увеличению у больных с умеренной гемоглобинемией (табл. 16). Подобная динамика объясняется миграцией в кровоток костномозгового пула молодых форм эритроцитов, который, видимо, редуцирован у больных с выраженным гемолизом в виду усиленной элиминации ретикулоцитов до операции при напряженном эритропоэзе. Сохраняющийся после ИК дефицит CD55⁺ эритроцитов у этой группы пациентов, тем не менее, не приводит к более интенсивной интраоперационной активации системы комплемента в целом и альтернативного его пути в частности (табл. 16, рис. 16), поскольку основным индуктором этого механизма во время ИК служит синтетическая поверхность аппарата, полностью лишенная CD55-молекул и других естественных ингибиторов комплемента.

Таким образом, подводя итог оценке функционального состояния системы комплемента и ее ингибиторов у кардиохирургических больных, можно заключить, что вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза течение ИБС сопровождается нормальной экспрессией CD35-молекул на эритроцитах и чрезмерной активацией системы комплемента до операции (табл. 16, рис. 17). При этом у больных с умеренной гемоглобинемией это коррелирует с увеличением функциональной активности классического пути инициации комплемента, очевидно, вследствие гиперпродукции его компонентов при высоком содержании TNF- α в крови. Последний также способствует образованию витронектина, удерживающего ТКК в жидкой фазе [Griffiths N.J. et al., 2011; Bae H.B. et al., 2012], что, вероятно, предохраняет эритроциты от комплемент-зависимого лизиса и поддерживает проницаемость их мембраны на уровне нормы (рис. 20). У больных с выраженной гемоглобинемией чрезмерная генерация ТКК в сыворотке крови до операции является результатом гиперактивации системы комплемента по альтернативному пути, очевидно, в виду дефицита экспрессии CD55-молекул на эритроцитах, что сочетается с нормальным уровнем TNF- α и, возможно, витронектина в плазме крови, который не обеспечивает должную акцепцию избытка ТКК, активно внедряющегося в мембрану эритроцитов и опосредующего увеличение ее проницаемости (рис. 21).

Во время операции вне зависимости от выраженности гемоглобинемии происходит массивная активация системы комплемента, преимущественно по альтернативному пути при соприкосновении крови с чужеродной поверхностью экстракорпорального контура, что на фоне недостатка витронектина (вследствие гемодилюции) определяет погружение МАК в мембрану эритроцитов, снижая исходно нормальную ее проницаемость при умеренном гемолизе и поддерживая низкие значения этой величины при выраженной гемоглобинемии (рис. 21). Между тем, комплемент-зависимый лизис эритроцитов лежит в основе умеренного гемолиза и не является ведущим в патогенезе выраженного лизиса клеток красной крови, что означает участие других механизмов (как описано выше – активации ПОЛ в эритроцитах) в реализации этой реакции.

Закономерным последствием нарастания неспецифической проницаемости мембраны эритроцитов являются увеличение их объема и цитолиз [Новицкий В.В.

До операции в условиях искусственного кровообращения



После операции в условиях искусственного кровообращения

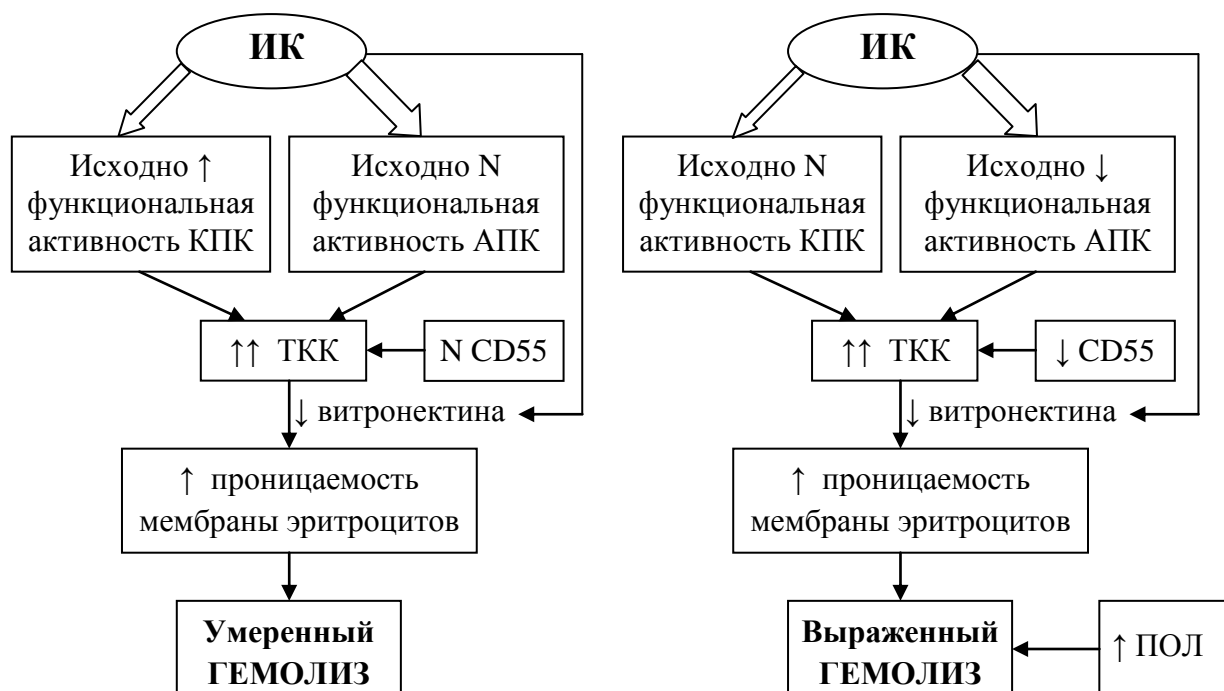


Рис. 21. Роль системы комплемента в патогенезе гемолитических реакций до и после операции у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом.

Примечание: см. рис. 9, TNF – фактор некроза опухолей, КПК – классический путь активации комплемента, АПК – альтернативный путь активации комплемента, ТКК – терминальный комплекс комплемента.

и соавт., 2004; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Bhattacharya A., 2011]. Между тем, определение среднего объема эритроцита у оперированных лиц установило соответствие его норме до операции и уменьшение показателя в послеоперационном периоде (по отношению к этапу до операции) у больных обеих групп исследования (табл. 14). Однако негативная послеоперационная динамика исследуемой величины была менее отчетливой у больных с выраженной гемоглобинемией, что реализовалось в статистически значимое преобладание среднего объема эритроцитов у этих пациентов над таковым у больных с умеренным гемолизом после ИК (табл. 14).

Сопоставляя полученные данные, выявляется необычная закономерность: 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 (табл. 14, 15). Данный феномен означает участие в регуляции объема эритроцитов компенсаторно-приспособительных механизмов поддержания клеточного гомеостаза, таких как система активного транспорта ионов, восстанавливающая концентрационные градиенты Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , и сеть белков цитоскелета, удерживающая форму клеток [Санников А.Г., 1999; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Васильева Е.М., 2005; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Bhattacharya A., 2011; Lewalle A., Parker K.H., 2011; Akman T. et al., 2012].

По результатам настоящего исследования, у больных с выраженным постперфузионным гемолизом имеет место нарушение функционального состояния цитоскелета эритроцитов (увеличение индекса ригидности клеток, табл. 9) и повышение проницаемости мембраны эритроцитов (табл. 15), и в до-, и в послеоперационном периодах. При этом до операции это не сопровождалось модуляцией объема клетки и проявлялось только на послеоперационном этапе, исходя из чего причина вариабельности объема эритроцитов, и собственно постперфузионного гемолиза, вероятно, кроется в дисфункции ионного транспорта клеток красной крови.

Определение активности Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы (АТФазы) в мембране эритроцитов у больных ИБС с умеренным гемолизом установило низкие значения показателя до операции, которые оставались таковыми и после

завершения ИК (табл. 15, рис. 22). Подобное состояние вполне укладывается в современные представления о патологии периферического звена эритрона при ИБС и других заболеваниях, ассоциированных с атеросклерозом [Новицкий В.В. и соавт., 2003; Broncel M. et al., 2007; Кравец Е.Б. и соавт., 2010]. Эффекты влияния обнаруженных у данной категории лиц нарушений структурно-метаболического статуса эритроцитов (избыток ХС и лФХ в мембране, активация ПОЛ) на активность Na^+/K^+ -АТФазы в клетках красной крови широко известны.

Интенсификация свободнорадикального окисления, накопление лФХ и деградация ФС в мембране эритроцитов угнетают деятельность Na^+/K^+ -АТФазы непосредственно, поскольку заряженные боковые цепи фермента вступают в контакт с полярными головками ФЛ. Аккумуляция ХС и увеличение ХС/ФЛ-соотношения повышает микровязкость мембраны эритроцитов в области анулярных липидов, затрудняя «флип-флоп» переходы АТФаз [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Васильева Е.М., 2005; Кравец Е.Б. и соавт., 2010; Suhail M., 2010]. Однако, M. Broncel и коллеги [2007] предполагают возможность прямого взаимодействия молекулы Na^+/K^+ -АТФазы с ХС, что приводит к формированию менее активной конформации белка. При этом степень изменения активности фермента на фоне атеросклероза зависит от типа гиперлипидемии, и с увеличением тяжести заболевания молярное соотношение ХС/ФЛ нарастает при прогрессивном угнетении активности Na^+/K^+ -АТФазы [Коновалова Т.Т., 2005; Suhail M., 2010].

В свою очередь, снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов в итоге приводит к избытку Na^+ и дефициту K^+ в клетках, что изменяет их объем. При этом высокие интрацеллюлярные концентрации Na^+ являются основным сигналом к увеличению активности Na^+/K^+ -АТФазы, если отсутствуют ингибиторные влияния [Shahid S.M, Akram H., 2004; Атауллаханов Ф.И. и соавт., 2009; Suhail M., 2010]. Очевидно, поэтому у больных ИБС с умеренной гемоглобинемией до операции при низкой активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов зарегистрирована отчетливая тенденция к увеличению среднего объема клеток (табл. 14, 15).

Стабильно низкая послеоперационная активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов у больных с умеренной гемоглобинемией (табл. 15, рис. 22), вероятно, объясняется интеграцией разнонаправленных процессов в мембране в

ходе ИК: повреждающее влияние прооксидантов со стороны внеклеточного пространства (содержание ТБК-активных продуктов в плазме крови возрастало после операции), по-видимому, уравнивалось поступлением в кровоток молодых форм эритроцитов (табл. 7), обладающих максимальной активностью фермента [Liu J.J. et al., 2010] и определяющих снижение ХС/ФЛ-соотношения в липидном бислое по сравнению с дооперационным этапом (табл. 10).

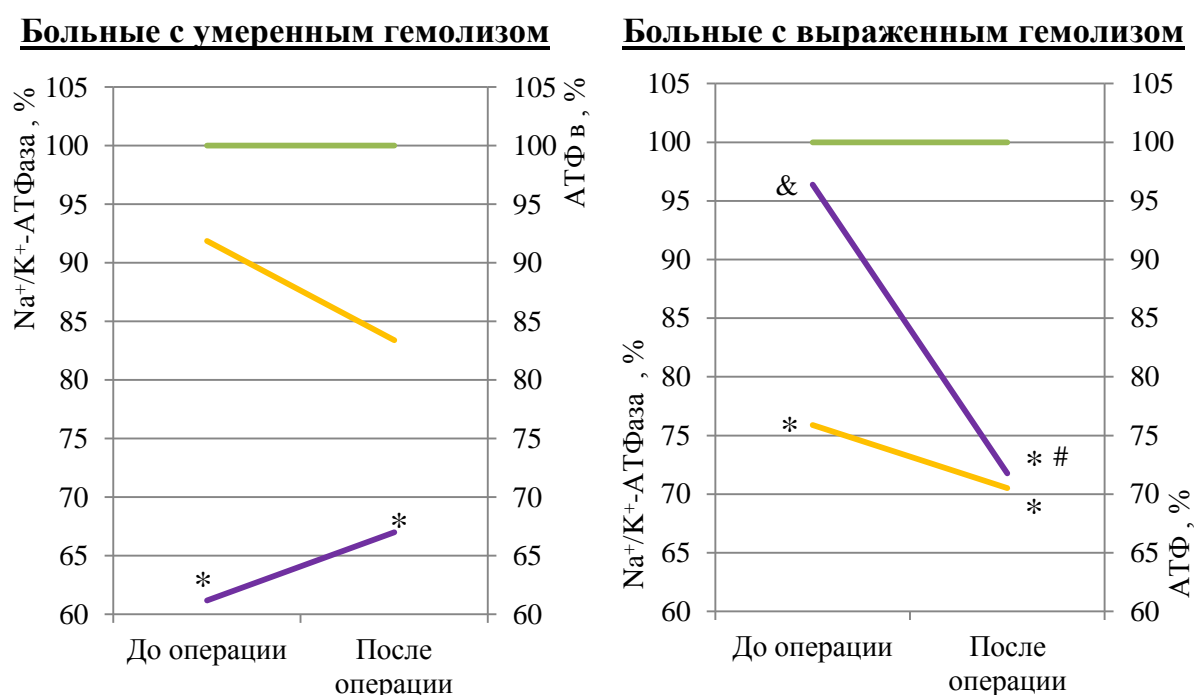


Рис. 22. Активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов и содержание АТФ в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.

Примечание: ■ - активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов, %; ■ - содержание АТФ в эритроцитах, ■ - здоровые доноры (100 %); См. рис. 1; & - статистически значимые различия между показателями у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом на соответствующем этапе исследования.

При развитии выраженного гемолиза, наоборот, до операции активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов была нормальной (табл. 15, рис. 22), что, вероятно, связано с резко выраженным ретикулоцитозом у пациентов уже в дооперационном периоде (табл. 7) и имеет, в общем, аналогичное объяснение: невысокое увеличение ХС/ФЛ-соотношения в мембране (табл. 10), ее нормальный фосфолипидный спектр (табл. 11) и, видимо, нативная (малоповрежденная в силу возраста клеток) конформационная структура фермента. Возможно, нормальная активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов у больных с выраженным гемолизом компенсировала высокую проницаемость последней, в результате чего

объем эритроцитов до операции не отличался от такового у пациентов с умеренной гемоглобинемией, у которых пониженная активность фермента сочеталась с нормальной проницаемостью мембраны эритроцитов (табл. 15, рис. 22).

Между тем, в послеоперационном периоде активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране клеток красной крови при выраженном гемолизе еще более снижалась, очевидно, вследствие интраоперационной активации механизмов свободнорадикального окисления в эритроцитах (по нарастанию ТБК-активных продуктов, табл. 13), влекущих нарушение фосфолипидного спектра мембраны с накоплением лФХ (табл. 11), увеличение ХС/ФЛ-соотношения в ней (табл. 10) и непосредственную окислительную модификацию самого фермента. Последнее, видимо, превалирует над процессами пероксидации липидов цитолемы, поскольку согласно результатам дисперсионного анализа, аккумуляция продуктов ПОЛ в эритроцитах у кардиохирургических больных после операции обуславливает 10,36% вариабельности постперфузионного гемолиза, в то время как недостаточность ферментов, участвующих в антиоксидантной защите клеток (каталаза и Г-6-ФДГ) в сумме – 39,88% данного эффекта (табл. 25). Это означает, что неутилизированные АФК у больных с выраженным гемолизом, по всей видимости, оказывают свое повреждающее действие на эритроциты преимущественно путем деградации молекул нелипидной природы.

Общеизвестно, что наиболее чувствительны к свободнорадикальному окислению сульфгидрильные группы (-SH) мембранных белков: ферментов, ионных каналов и насосов [Пасечник И.Н., 2001; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Sohal R.S., Orr W.C., 2012; Cai Z., Yan L.J., 2013]. Окислительная модификация Na^+/K^+ -АТФазы, действительно, угнетает ее активность [Suhail M., 2010; Liu C.C. et al., 2013], что было показано у кардиохирургических больных при гипотермической перфузии [Zhang S., Yao S., 2004; Deng Y.K. et al., 2010]. Кроме того, функционирование Na^+/K^+ -АТФазы может подавляться также в присутствии эндогенных ингибиторов – кальнактина, снижающего сродство фермента к K^+ при повышенных интрацеллюлярных концентрациях Ca^{2+} и убаин-подобного фактора, содержание которого возрастает в плазме крови на фоне стрессорного воздействия любой этиологии [Драбкина Т.М., Кривой И.И., 2004; Васильева Е.М., 2005]. О

динамике содержания этих веществ у кардиохирургических больных во время операции с ИК, к сожалению, ничего не известно.

Несмотря на послеоперационное снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в эритроцитах у больных с выраженным гемолизом, ее активность соответствовала таковой у пациентов с умеренной гемоглобинемией после ИК, что само по себе не может объяснить вариабельность гемолитических реакций. Принимая во внимание особенности методики определения активности данного фермента в суспензии отмытых теней эритроцитов в присутствии экзогенного АТФ строго определенной концентрации [Казеннов А.М. и соавт., 1984], полученные результаты у кардиохирургических больных не учитывали внутриэритроцитарное содержание АТФ, как субстрата для деятельности фермента [Атауллаханов Ф.И. и соавт., 2009; Suhail M., 2010; Liu C.C. et al., 2013].

Измерение содержания АТФ в эритроцитах обнаружило дефицит этого макроэрга у больных с выраженным постперфузионным гемолизом и его нормальное содержание у пациентов с умеренной гемоглобинемией вне зависимости от этапа исследования (табл. 15, рис. 21). Это вполне согласуется с неоднозначными данными литературы о модуляции энергетического метаболизма эритроцитов на фоне атеросклероза, демонстрирующими как дефицит АТФ в клетках красной крови [Волошин П.В. и соавт., 1991; Drozd W. et al., 2004], так и его нормальные количества [Бокерия Л.А. и соавт., 2004; Осетров И.А. и соавт., 2006]. При этом среди возможных механизмов формирования недостатка АТФ в эритроцитах у больных атеросклерозом рассматриваются нарушение активности гликолитических ферментов, повышенная утилизация глюкозы в реакциях пентозофосфатного пути с целью поддержания восстановительных процессов, расход АТФ и аденозинмонофосфата (АМФ) через повышение активности АМФ-деаминазы вследствие усиления оксидативного повреждения эритроцитов [Осетров И.А. и соавт., 2006].

Между тем, в дооперационном периоде интенсивность процессов ПОЛ в эритроцитах у больных с выраженным и умеренным гемолизом была одинаковой (табл. 13), что позволяет предположить именно недостаточность ферментов гликолиза в клетках красной крови у лиц с выраженным гемолизом, у которых к тому же был зафиксирован дефицит фермента пентозофосфатного шунта Г-6-ФДГ

(табл. 13). Последнее еще раз подчеркивает неполноценность молодой популяции эритроцитов, образуемой у этой категории больных на фоне напряженного эритропоэза, поскольку известно, что ферменты гликолиза в ретикулоцитах более активны, чем в старых клетках [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Bhattacharya A., 2011]. Кроме того, на содержание АТФ в клетках негативное влияние может оказывать интенсивное функционирование АТФаз [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Васильева Е.М., 2005; Tiffert T., Lew V.L., 2011], в связи с чем пониженная активность Na^+/K^+ -АТФазы в эритроцитах у больных с умеренным гемолизом могла способствовать сохранению внутриклеточного пула АТФ в пределах нормы (табл. 15, рис. 21).

Известно, что роль АТФ в эритроцитах тесно связана с функционированием цитоскелета, при фосфорилировании белков которого деформируемость клеток возрастает [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Санников А.Г., 1999; Betz T. et al., 2009; Ipsaro J.J., Mondragón A., 2010]. В связи с этим не исключено, что дефицит АТФ в эритроцитах у больных с выраженным гемолизом потенцировал увеличение ригидности клеток красной крови (табл. 9), обусловленное, предположительно, дефектом структуры спектрин-актиновой сети (как обсуждалось выше).

С другой стороны некоторые белки цитоскелета (β -спектрин, анкирин и белок полосы 3) участвуют в формировании мембранного пула АТФ, необходимого для функционирования АТФаз, а белок полосы 3 к тому же ассоциирован с ферментами гликолиза [Васильева Е.М., 2005; Barvitenko N.N. et al., 2005; Кузник Б.И., 2010; Chu H. et al., 2012]. В связи с этим дисфункция цитоскелета эритроцитов у больных с выраженным гемолизом может усугублять недостаточность мембранного пула АТФ при установленном его общем дефиците в клетке (табл. 15, рис. 22). Это, вероятно, потенцируется гипоксией в до- и интраоперационном периоде ввиду того, что за связь с белком полосы 3 помимо ферментов гликолиза конкурирует восстановленный гемоглобин [Barvitenko N.N. et al., 2005]. Содержание последнего, в свою очередь, возрастает в присутствии 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ), который снижает сродство гемоглобина к кислороду и с избытком содержится в молодых эритроцитах [Шифман Ф.Д., 2001; Осетров И.А. и соавт., 2006; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Bhattacharya A., 2011].

Следовательно, функциональная незрелость молодой популяции эритроцитов у больных с выраженной гемоглобинемией в виде предполагаемого дефицита ферментов гликолиза, дисфункции цитоскелета и избытка 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) становится, по всей видимости, причиной редукции лабильного мембранного пула АТФ в эритроцитах, угнетения деятельности АТФаз и усугубления ионного дисбаланса, индуцирующего гемолиз. Более того, возможно, что высокое содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах у этих больных обуславливает чрезмерное увеличение pO_2 в крови во время ИК (табл. 4), которое создается с целью 100% насыщения гемоглобина кислородом [Меньшугин И.Н., 1998], провоцируя манифестацию скрытого до операции дефицита антиоксидантов у больных с выраженным гемолизом (табл. 13).

В послеоперационном периоде концентрация АТФ в эритроцитах кардиохирургических больных обеих групп исследования значительно не изменялась, что продемонстрировано и другими авторами [Cavaliere F. et al., 1999; Бокерия Л.А. и соавт., 2004]. В условиях экспериментального деформационного стресса в эритроцитах возрастает потребление АТФ, но компенсаторно при наличии глюкозы в инкубационной среде, усиливаются и процессы его ресинтеза. При этом через 30-60 мин после начала сдвиговой нагрузки продукция АТФ в клетках возрастает даже более исходных значений, плавно снижаясь в последующем [Санников А.Г., 1999], что, очевидно, мы и регистрировали как отчетливую тенденцию к снижению уровня АТФ в эритроцитах у кардиохирургических больных (табл. 15, рис. 22) после 100-120 мин ИК (табл. 4). Сохраняющийся в послеоперационном периоде дефицит АТФ в эритроцитах у больных с выраженным гемолизом сочетается со снижением исходно нормальной активности Na^+/K^+ -АТФазы (табл. 15, рис. 22), что, видимо, опосредует увеличение объема клетки (по отношению к таковому у больных с умеренной гемоглобинемией) и способствовало быстрому лизису эритроцитов.

Другим механизмом, способным влиять на объем клетки является система Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов ($K^+(Ca^{2+})$ -каналов), открывание которых при повышении внутриклеточных концентраций Ca^{2+} приводит к пассивному выходу ионов K^+ из клетки, что влечет за собой удаление Cl^- по электрохимическому градиенту и H_2O [Maher A.D., Kuchel P.W., 2003; Begenesich T. et al., 2004;

Трубачева О.А. и соавт., 2011; Yuan P. et al., 2011]. Это наиболее раннее событие в каскаде цитотоксических реакций, индуцированных ионами Ca^{2+} , благодаря чему при увеличении проницаемости мембраны объем клетки стабилизируется и может даже уменьшаться [Атауллаханов Ф.И. и соавт., 2009]. Обнаружено, что этот механизм предохраняет эритроциты от осмотического лизиса при развитии микросфероцитоза и комплемент-зависимого повреждения эритроцитов [Петрова И.В., 1999; Новицкий В.В. и соавт., 2003, 2004; Shen A.Y. et al., 2007; Атауллаханов Ф.И. и соавт., 2009; Föller M. et al., 2010].

Изучение деятельности $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов возможно путем оценки Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа (ГПО) эритроцитов, в ходе которого мембранный потенциал эритроцитов при добавлении Ca^{2+} сначала возрастает (гиперполяризация, т.е. V_1), что обусловлено открыванием $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов, а затем восстанавливается до нормы вследствие активации Ca^{2+} -АТФазы, удаляющей ионы Ca^{2+} из цитоплазмы и опосредующей закрывание этих структур [Орлов С.Н. и соавт., 1992; Петрова И.В., 1999]. Таким образом, методика дает представление как о функционировании $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов, так и косвенные сведения об активности Ca^{2+} -АТФазы мембраны эритроцитов.

Изучение ГПО эритроцитов показало, что скорость гиперполяризации мембраны (V_1) и амплитуда ГПО (ΔE) у больных ИБС вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза и этапа исследования соответствовали показателям у здоровых доноров (табл. 14). Согласно данным литературы эти величины характеризуют суммарную проводимость $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов, которых в эритроците насчитывается несколько десятков, и функционируют они по принципу «все или ничего», т.е. находятся только в 2 состояниях – либо полностью открыты, либо полностью закрыты [Петрова И.В., 1999; Maher A.D., Kuchel P.W., 2003; Yuan P. et al., 2011]. Являясь пассивным ионным транспортером, $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы, по всей видимости, менее чувствительны к изменениям липидного спектра мембраны эритроцитов на фоне атеросклероза, чем АТФазы. Тем не менее, у больных с выраженным гемолизом отмечается некоторое повышение показателей V_1 и ΔE ГПО эритроцитов в дооперационном периоде, что, вероятно, связано с высоким содержанием ретикулоцитов в крови (табл. 7), так как молодые формы эритроцитов обладают большей проводимостью $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов [Tiffert T. et al., 2007].

Показано, что изменение K^+ -проводимости мембраны эритроцитов при патологии (онкологические, воспалительные заболевания) может как подавляться, представляя собой неспецифический ответ эритроцитов на повреждение, так и возрастать, являясь следствием ретикулоцитоза при гемолитических реакциях (микросфероцитоз) [Петрова И.В., 1999; Muzyamba M.C., Gibson J.S., 2003]. По всей видимости, сочетание этих разнонаправленных процессов (неспецифической альтерации эритроцитов на фоне атеросклероза с усилением их гибели и активацией эритропоэза) у больных ИБС в итоге определило нормальные показатели K^+ -проводимости мембраны эритроцитов, отражающие открытие $K^+(Ca^{2+})$ -каналов.

Важно отметить, что в послеоперационном периоде скорость гиперполяризации мембраны (V_1) и амплитуда (ΔE) ГПО эритроцитов у больных ИБС с выраженным гемолизом проявляли отчетливую тенденцию к уменьшению (табл. 14), демонстрируя, очевидно, повреждение мембраны клеток красной крови в условиях ИК. У пациентов с умеренной гемоглобинемией, напротив, скорость гиперполяризации мембраны эритроцитов даже несколько нарастала, что, вероятно, явилось следствием более значимого ретикулоцитоза (табл. 7, 14).

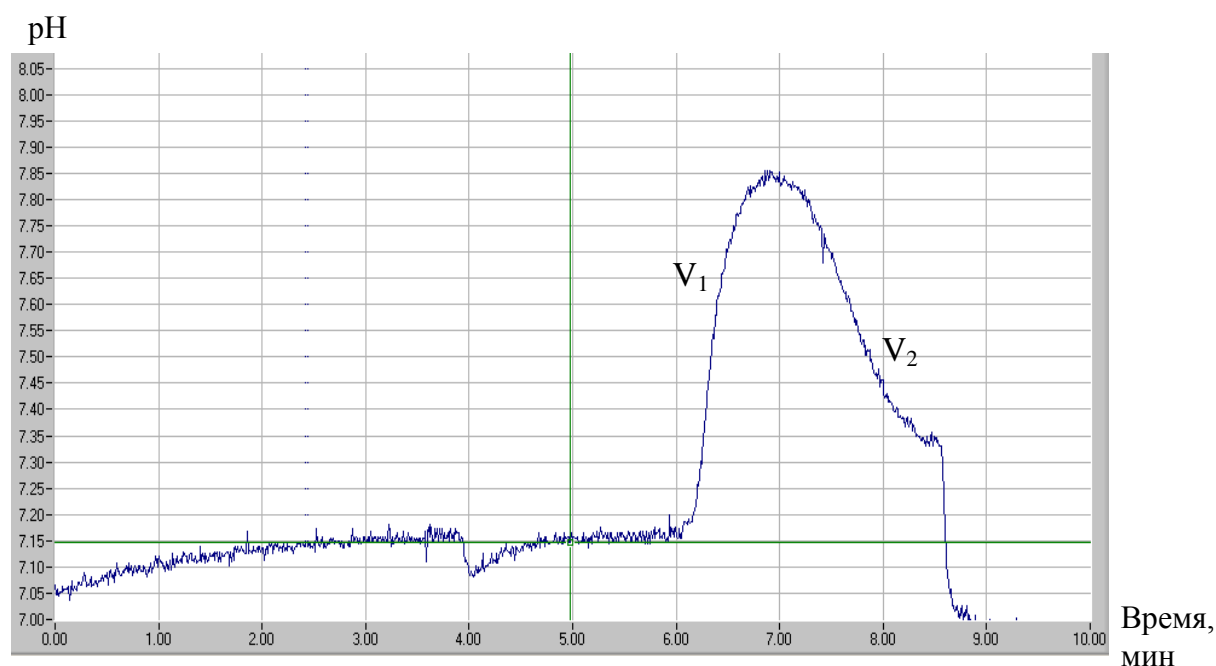
При установленной в исследовании незначительной роли процессов открывания $K^+(Ca^{2+})$ -каналов в механизмах интраоперационного гемолиза, закрывание этих структур, обусловленное активностью Ca^{2+} -АТФазы, как оказалось, является важным. До операции скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов (V_2) у больных с умеренным гемолизом была существенно ниже таковой у пациентов с выраженной гемоглобинемией и у здоровых доноров (табл. 14). Это хорошо согласуется с данными литературы об угнетении активности Ca^{2+} -АТФазы в мембране эритроцитов у лиц, страдающих атеросклерозом [Медведева И.В. и соавт., 2002; Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Механизм ее ингибирования, очевидно, аналогичен таковому для Na^+/K^+ -АТФазы – увеличение ХС/ФЛ-соотношения в мембране эритроцитов, нарушение ее ФЛ спектра, активация ПОЛ, что показано нами для данной категории больных (табл. 10, 11, 13) и уже обсуждалось выше. При этом нормальную дооперационную величину V_2 и, соответственно, активность Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитарной мембране у пациентов

с выраженным гемолизом можно объяснить высоким содержанием ретикулоцитов в крови (табл. 7) [Asha Devi S. et al., 2011].

В послеоперационном периоде у кардиохирургических больных определялись реципрокные тенденции в изменении скорости восстановления мембранного потенциала: при умеренной гемоглобинемии она несколько снижалась, а при выраженной – существенно возрастала, статистически значимо превышая таковую у больных первой группы (табл. 14). При этом время достижения максимального потенциала мембраны при ГПО эритроцитов (ΔT) у пациентов с выраженным гемолизом сокращалось менее нормы, чего не отмечалось у них до операции и у больных с умеренным гемолизом на обоих этапах исследования (табл. 14).

Графическая регистрация Ca^{2+} -индуцированного ГПО эритроцитов у кардиохирургических больных после операции обнаружила неоднозначный характер кривой: при умеренном гемолизе ее форма характеризовалась округлой вершиной и плавным спуском, в случае выраженной гемоглобинемии – остроконечным максимумом и быстрым восстановлением мембранного потенциала (рис. 23). При визуальном анализе подобных диаграмм становится очевидным, что площадь, ограниченная графиком и изолинией, у больных с выраженным гемолизом намного меньше таковой в группе сравнения. Это означает, что у больных с умеренной гемоглобинемией из-за пониженной активности Ca^{2+} -АТФазы в мембране эритроцитов реверсия внутриклеточной концентрации Ca^{2+} до квазистационарного состояния клетки происходит медленно, медленно закрываются $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы, благодаря чему из клетки удаляется большее количество K^+ и объем эритроцита сильно уменьшается, предохраняя его от лизиса на фоне возросшей проницаемости мембраны во время ИК. При выраженном гемолизе несколько возросшая активность Ca^{2+} -АТФазы быстро элиминирует ионы Ca^{2+} из клетки, $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналы быстро закрываются (т.к. сокращение ΔT) и объем эритроцита уменьшается незначительно, что при высокой проницаемости цитолеммы способствует скорейшему лизису клетки. Приоритетность механизмов регуляции объема эритроцитов в патогенезе постперфузионного гемолиза подтверждается положительной корреляцией ($r = 0,40$; $p < 0,01$;) этого показателя с концентраций свободного гемоглобина в плазме крови после операции (табл. 22).

Пациент Д. (60 лет) с умеренным постперфузионным гемолизом



Пациент М. (58 лет) с выраженным постперфузионным гемолизом

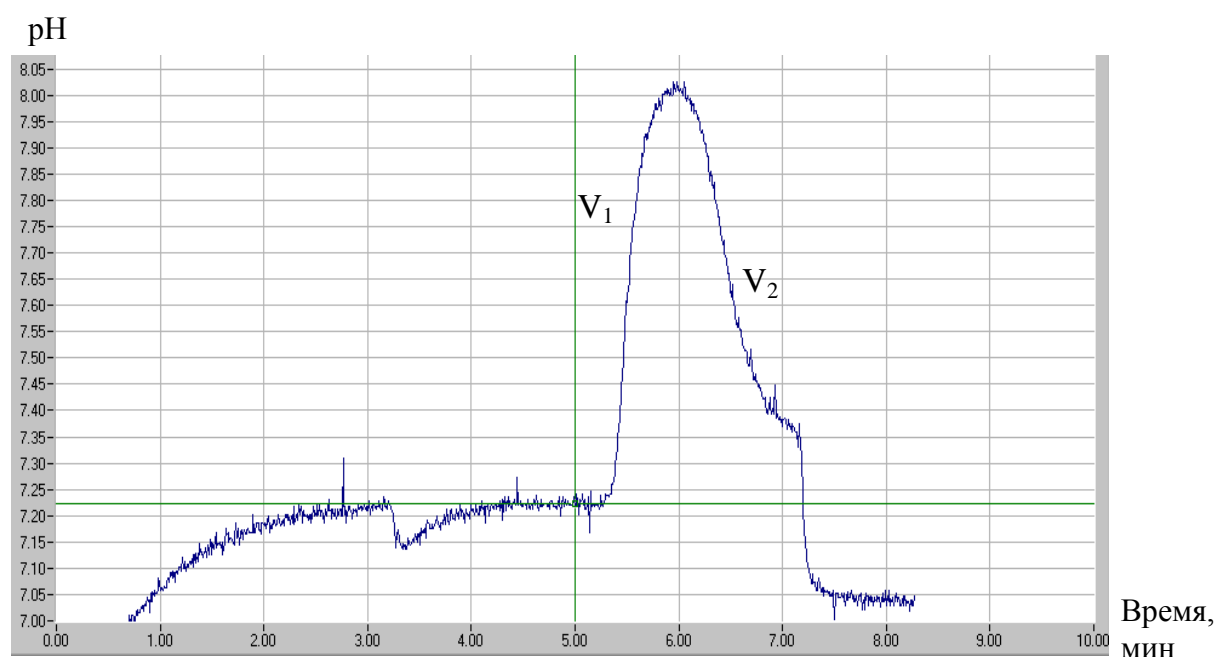


Рис. 23. Примеры кривых изменения pH инкубационной среды при графической регистрации Ca^{2+} -индуцированного гиперполяризационного ответа эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным гемолизом после операции с искусственным кровообращением.

Примечание: V_1 – скорость гиперполяризации мембраны эритроцитов, V_2 – скорость восстановления мембранного потенциала эритроцитов.

Таким образом, участие $K^+(Ca^{2+})$ -каналов в патогенезе выраженного постперфузионного гемолиза является весьма важным, но определяется оно интраоперационным изменением кинетики Ca^{2+} -АТФазы. При этом, видимо, меняется не столько ее активность, которая, немного возрастая, остается в пределах нормы, сколько скорость индукции фермента – время достижения максимума ГПО эритроцитов сокращается менее нормальных значений (табл. 14). Не исключено также изменение кинетических параметров самих $K^+(Ca^{2+})$ -каналов, в результате чего они начинают закрываться при внутриклеточных концентрациях Ca^{2+} несколько больших, чем в норме.

Вполне вероятно, что причиной активации Ca^{2+} -АТФазы в эритроцитах у больных с выраженным гемолизом служит интраоперационная интенсификация ПОЛ, поскольку известно, что незначительная свободнорадикальная модификация Ca^{2+} -АТФазы, как и частичный ее протеолиз эндогенным кальпаином или другими протеазами, приводят к увеличению активности фермента [Новицкий В.В. и соавт., 2003; Васильева Е.М., 2005; Pengpanichpakdee N. et al., 2012]. Активация протеинкиназы С оказывает аналогичный эффект; активация цАМФ-протеинкиназы и опосредованное ею фосфорилирование белков цитоскелета угнетают функционирование Ca^{2+} -АТФазы [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Cortes V.F. et al., 2011].

Кроме того, существуют кальмодулин- и фосфолипид-зависимая регуляция активности Ca^{2+} -АТФазы, молекулы которой обладает различными сайтами связывания для этих факторов. В присутствии высоких концентраций лФХ, ФС, ФИ, ФХ и ФЭА в липидном бислое деятельность Ca^{2+} -АТФазы возрастает [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Васильева Е.М., 2005; Mangialavori I. et al., 2011]. Однако содержание ФС и ФЭА в мембране эритроцитов после операции у больных двух обследованных групп было равным, доля лФХ во время операции при выраженном гемолизе нарастала, но не превышала значений группы сравнения, а в отношении ФХ и ФИ обнаруживался даже дефицит (табл. 11). В связи с этим, более вероятно, что активация Ca^{2+} -АТФазы в мембране эритроцитов при выраженном гемолизе происходила через кальмодулин-зависимые механизмы.

Кальмодулин содержится в эритроцитах в большом количестве, превышающем концентрацию Ca^{2+} , благодаря чему выполняет роль

цитоплазматического буфера. При увеличении интрацеллюлярной концентрации Ca^{2+} , образующийся комплекс кальмодулин- Ca^{2+} активирует Ca^{2+} -АТФазу [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Васильева Е.М., 2005; Mangialavori I. et al., 2011; Pengpanichpakdee N. et al., 2012]. Несмотря на то, что оценка содержания Ca^{2+} в эритроцитах у кардиохирургических больных в настоящем исследовании не проводилась, мы регистрировали у больных с выраженным гемолизом, в отличие от пациентов другой группы, все косвенные признаки этого феномена в послеоперационном периоде: активацию ФЛ-A2 (по накоплению лФХ в мембране эритроцитов, табл. 11), эхиноцитарную трансформацию клеток (как показано нами ранее [Мальцева И.В. и соавт., 2011]) и собственно активацию Ca^{2+} -АТФазы (уменьшение V_2 при ГПО эритроцитов, табл. 14). Учитывая, что увеличение неспецифической проницаемости мембраны эритроцитов после операции у больных обеих групп выявлено в равной степени (табл. 15), то при выраженной гемоглобинемии, видимо, имеет место избирательное поступление ионов Ca^{2+} в эритроциты.

Существуют данные о том, что кислые фосфолипиды, ФС и ФК могут электрохимически связывать Ca^{2+} , более того, последняя даже названа природным ионофором кальция, поскольку транспортирует его внутрь клетки [Васильева Е.М., 2005; Mangialavori I. et al., 2011]. Между тем, роль данного механизма в увеличении проницаемости мембраны эритроцитов для кальция маловероятна, так как содержание ФК в липидном бислое возрастало после операции как при выраженном, так и при умеренном гемолизе (табл. 11). Скорее всего, аккумуляция Ca^{2+} в эритроцитах у пациентов с выраженной гемоглобинемией обусловлена открыванием Ca^{2+} -каналов, наличие которых в эритроцитах еще предполагается, либо участием неспецифических ионных каналов [Сторожок С.А и соавт., 1997; Санников А.Г., 1999; Lang K.S. et al., 2005; Föller M. et al., 2008].

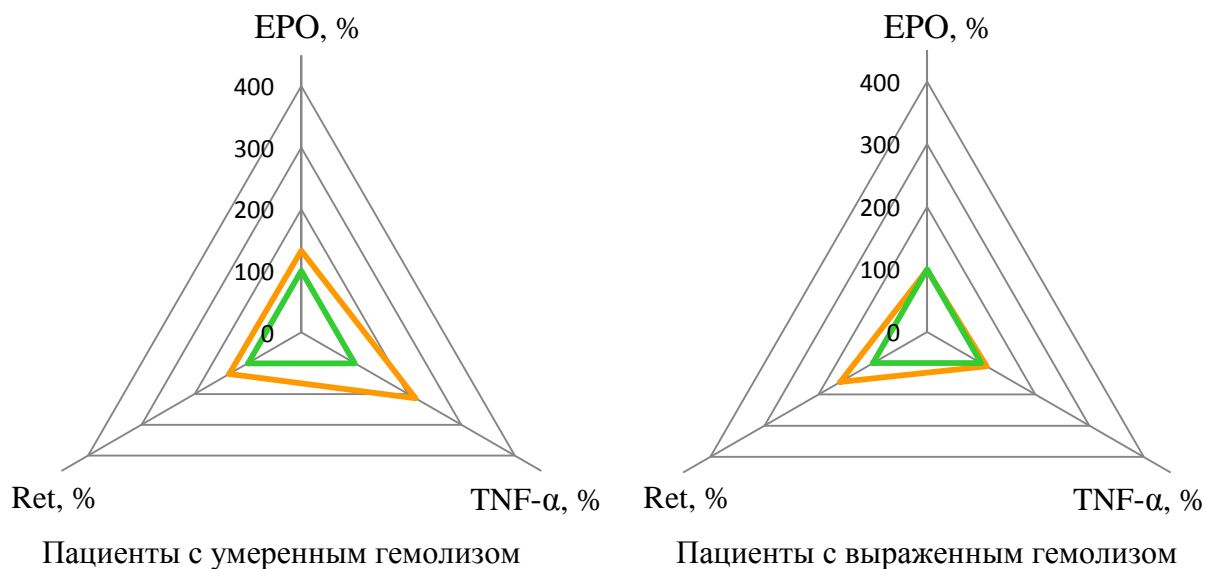
В настоящее время показано, что поступление Ca^{2+} в эритроциты происходит через неспецифические катионные каналы TRPC6 типа, которые активируются при окислительном стрессе и воздействии простагландина E_2 [Kaestner L., Bernhardt I., 2002; Föller M. et al., 2008; Lang E. et al., 2012]. Поскольку у больных с выраженным гемолизом, в отличие от пациентов с умеренной гемоглобинемией, отмечалось интраоперационное накопление ТБК-активных продуктов и активация

ФЛ-А2 (по нарастанию уровня лФХ в эритроцитах), то, видимо, открытие TRPC6 каналов инициировало вход Ca^{2+} в клетку. С другой стороны, поступление Ca^{2+} в эритроциты может ограничиваться в присутствии эритропоэтина (ЕРО), который в концентрациях до 1000 мМЕ/мл дозозависимо блокирует этот процесс [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. 7, рис. 24). Это означает, что эритроциты пациентов с умеренным гемолизом были лучше защищены от поступления Ca^{2+} в клетку. То есть у больных с высокой интенсивностью гемолитических реакций избыток Ca^{2+} в эритроцитах после операции, по-видимому, обуславливался сочетанием факторов: усилением активирующих влияний на TRPC6-каналы (активация ПОЛ и ФЛ-А2) и невысокой эритропоэтин-зависимой протекцией клеток, в то время как при умеренном гемолизе активационные стимулы сохранялись на дооперационном уровне при значительном увеличении протективной роли ЕРО. При этом последний механизм, видимо, является основополагающим в патогенезе интраоперационного гемолиза, так как, согласно результатам кластерного анализа, концентрация ЕРО в плазме крови в послеоперационном периоде позволяет классифицировать больных на группу с умеренной и выраженной гемоглобинемией (табл. 28, рис. 25). Аналогичную тенденцию проявляет и параметр V_2 ГПО эритроцитов (т.е. активность Ca^{2+} -АТФазы) (табл. 28). К тому же содержание ЕРО в крови после операции вносит 13,2% в вариабельность постперфузионной гемоглобинемии, параметр ΔT (отражает время активации Ca^{2+} -АТФазы) –18,7%, а средний объем эритроцитов – 23,9% (табл. 25), положительно коррелируя с ее уровнем ($r = 0,40$; $p < 0,01$; табл. 22).

Таким образом, в основе ионного дисбаланса эритроцитов и внутрисосудистого гемолиза во время ИК лежат сложные механизмы. У больных с умеренным постперфузионным гемолизом активность АТФаз в мембране эритроцитов до операции понижена вследствие избыточного накопления в ней ХС, что, видимо, опосредует некоторое повышение внутриклеточной концентрации Na^+ , проявляющееся отчетливой тенденцией к увеличению объема эритроцита в

До операции в условиях искусственного кровообращения



После операции в условиях искусственного кровообращения

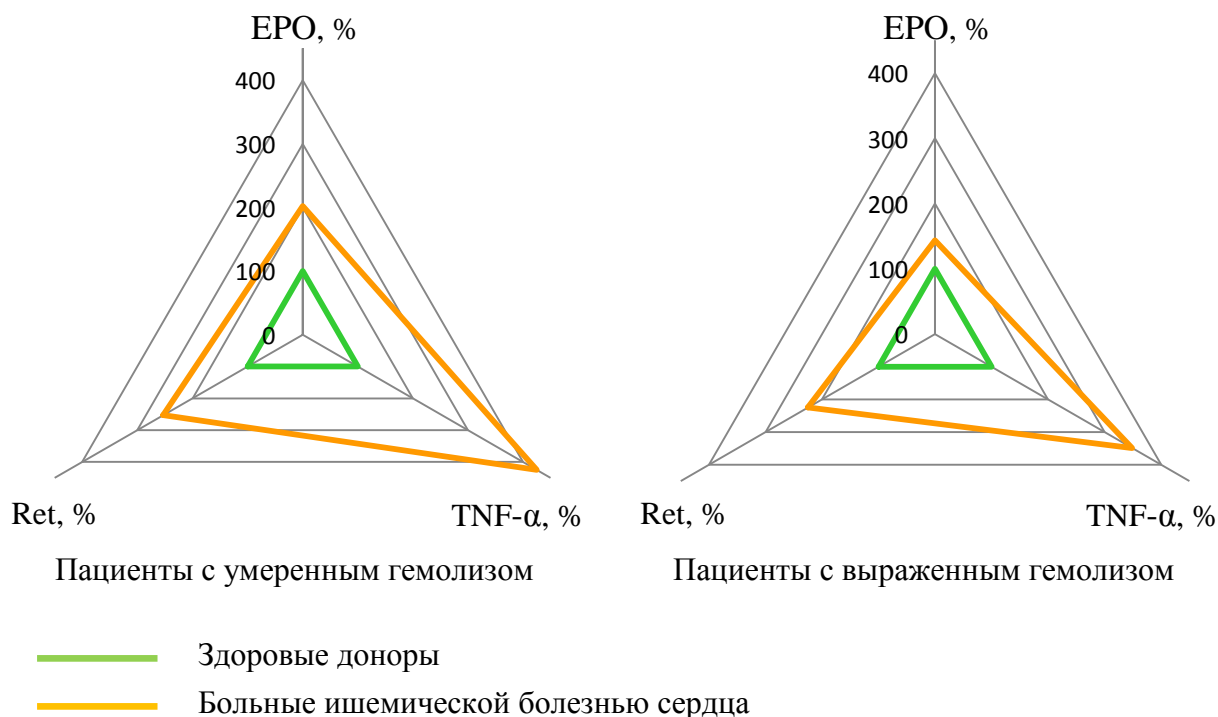


Рис. 24. Содержание эритропоэтина, фактора некроза опухолей α и ретикулоцитов в крови до и после операции у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом.

Примечание: EPO – эритропоэтин, TNF- α – фактор некроза опухолей α , Ret – ретикулоциты.

Код пациента

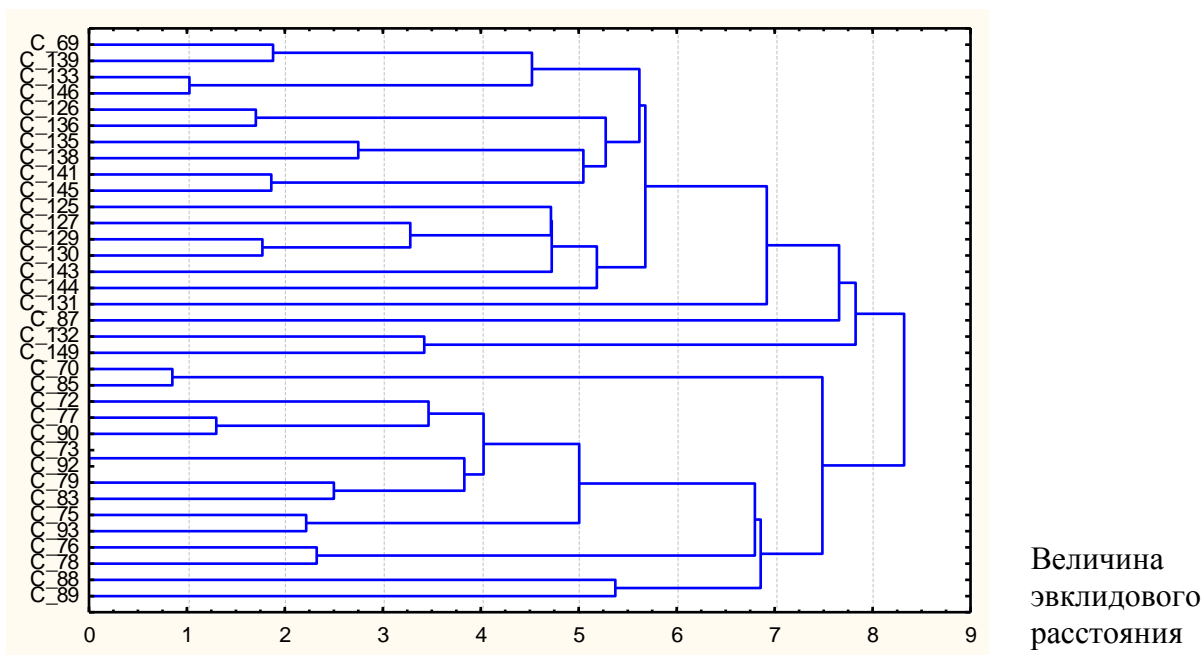


Рис. 25. Дендрограмма кластеризации больных ишемической болезнью сердца в зависимости от содержания эритропоэтина в плазме крови после операции и выраженности постперфузионной гемоглобинемии.

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

Развитию выраженного гемолиза предшествует нормальная активность АТФаз, обусловленная высоким содержанием ретикулоцитов в крови, что сопровождается низким содержанием АТФ в эритроцитах и высокой проницаемостью их мембраны, определяя, видимо, некоторое повышение внутриклеточной концентрации Na^+ и незначительное увеличение объема клетки до операции. При этом содержание Ca^{2+} в цитоплазме остается нормальным. В послеоперационном периоде на фоне сохраняющейся высокой проницаемости мембраны эритроцитов и дефицита АТФ происходит интраоперационная активация свободнорадикального окисления, в результате чего активность Na^+/K^+ -

АТФазы в цитолемме снижается и открываются неспецифические катионные каналы TRPC6, возрастает вход Ca^{2+} , опосредующий открывание $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов и увеличение активности Ca^{2+} -АТФазы. Последнее способствует быстрому прерыванию выходящего калиевого тока, что не позволяет эритроциту существенно уменьшить свой объем, предрасполагая к скорейшему лизису. При этом протективное влияние ЕРО на эритроциты выражено слабо.

Следует отметить, что ЕРО поддерживает жизнеспособность эритроцитов не только путем модуляции кальциевого гомеостаза. Безъядерные клетки красного ростка, как и эритрокарициты, экспрессируют рецепторы к ЕРО, численность которых относительно невелика, но их дисфункция или недостаточность ЕРО индуцируют эриптоз [Глушков В.С., Сторожок С.А., 2009]. Последний представляет собой запрограммированную гибель эритроцитов, которая запускается при увеличении уровня Ca^{2+} в цитоплазме эритроцитов, энергодефиците и активации свободнорадикального окисления. Это ведет, с одной стороны, к открыванию $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов и уменьшению объема клетки, а с другой – к активации скрэблазы и экстернализации ФС, что служит маркером для элиминации таких эритроцитов клетками РЭС [Myssina S. et al., 2003; Lang K.S. et al., 2005; Föller M. et al., 2008; Глушков В.С., Сторожок С.А., 2009; Lang F., Qadri S.M., 2012]. При этом АФК активируют редокс-чувствительные каспазы эритроцитов, осуществляющие деградацию белка полосы 3, выполняющего функцию ионного обменника ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$), якоря для закрепления цитоскелета в мембране эритроцитов и сайта для связывания ферментов гликолиза [Mandal D. et al., 2003; Новицкий В.В. и соавт., 2004; Chu H. et al., 2012].

Экспериментально доказано, что ЕРО блокирует эриптоз, индуцированный Ca^{2+} , и окислительным стрессом [Vota D.M. et al., 2013]. Ввиду того, что у больных с выраженным гемолизом в эритроцитах сформировались оба стимула эриптоза во время операции при невысоком увеличении ЕРО в крови, а у лиц с умеренной гемоглобинемией – ни один из них при резком нарастании плазменной концентрации ЕРО, то активация эриптоза у больных с выраженной гемоглобинемией могла потенцировать гибель эритроцитов в послеоперационном периоде. Кроме того, у этой категории лиц эриптоз, вероятно, усугублялся недостатком АТФ в эритроцитах, который отмечался у них на обоих этапах

исследования и не обнаруживался у больных с умеренной гемоглобинемией (табл. 15, рис. 24).

Данный факт означает, что зарегистрированная в настоящем исследовании усиленная дооперационная гибель эритроцитов у больных с выраженной гемоглобинемией путем внутрисосудистого гемолиза (по концентрации свободного гемоглобина в плазме крови до операции, табл. 7) сочеталась, по всей видимости, с активацией эритроцитоза, который не ингибировался ввиду отсутствия роста содержания ЕРО в плазме крови, что, напротив, имело место у больных с умеренной гемоглобинемией, имевших высокий уровень ЕРО до операции. В связи с этим возникает вопрос: что явилось причиной различной концентрации ЕРО в крови у больных с умеренным и выраженным гемолизом?

Известно, что ЕРО образуется, преимущественно интерстициальными клетками кортикального слоя почек, представляющими собой трансформированные макрофаги, расположенные вблизи проксимальных канальцев, а также макрофагами печени, костного мозга, гепатоцитами и некоторыми другими клетками, при этом доля внепочечного ЕРО не превышает 10-15%. Экспрессия гена ЕРО, расположенного в 7 хромосоме, запускается под влиянием гипоксией-индуцируемого фактора 1 (hypoxia inducible factor, HIF-1), который связывается с концевой частью гена ЕРО и обуславливает его секрецию уже через 1-2 ч с момента гипоксии. Между тем, образование HIF-1 происходит, по-видимому, во всех клетках организма, как универсальная адаптивная реакция на гипоксию, в условиях которой изменяется уровень эндогенного H_2O_2 , что стимулирует синтез HIF-1. Кроме того, клетки почечных канальцев при дефиците кислорода способны высвобождать АМФ, который с участием экто-5-нуклеотидазы повышает содержание аденозина в интерстициальных клетках почек и продукцию ими ЕРО [Ермоленко В.М., Иващенко М.А., 2000; Wenger R.H., Kurtz A., 2011; Bunn H.F., 2013; Zhao S., Wu J., 2013]. Подобная цепь событий вполне объясняет увеличение концентрации ЕРО в плазме крови у кардиохирургических больных после операции, сопровождающейся ишемией тканей и кровопотерей.

Учитывая вышеизложенное, и равную степень тяжести сердечной недостаточности (СН) у больных ИБС с умеренным и выраженным гемолизом (табл. 1), концентрация ЕРО в плазме крови у них до операции должна быть

одинаково повышенной, но в последней группе больных этого не отмечалось (таб. 7, рис. 24). Более того, у данной категории лиц несколько чаще встречались СН III ст. и заболевания легких (хроническая обструктивная болезнь легких, пневмофиброз, хронический бронхит; табл., 1), что, наоборот, предрасполагало к потенцированию кислородной недостаточности и повышению синтеза ЕРО.

При этом у больных с умеренной постперфузионной гемоглобинемией чаще встречались заболевания мочевыделительной системы, которые могут сопровождаться как гипер-, так и гипопродукций ЕРО. Известно, что если деструктивные процессы в почке локализуются преимущественно в кортикальной зоне (гломерулонефрит, хроническая почечная недостаточность), то это ведет к дефициту ЕРО, если корковый слой первично не затронут и превалирует гипоксия, то это проявляется гиперсекрецией ЕРО [Ермоленко В.М., Иващенко М.А., 2000; Bunn H.F., 2013]. Ввиду того, что у больных с умеренным гемолизом в структуре урологической патологии встречались хронический пиелонефрит, мочекаменная болезнь, солитарные кисты, нарушение фильтрационной функции почек (видимо, вследствие атеросклеротического поражения почечных артерий) и отсутствовали заболевания почек с повреждением кортикального слоя, можно предположить, что повышенное содержание ЕРО в плазме крови у этой категории лиц было обусловлено почечной патологией.

Тем не менее, остается непонятной природа нормальной продукции ЕРО при сердечной недостаточности у больных ИБС с выраженным гемолизом, что дает основания полагать наличие у них, наряду с гипоксией, также факторов, ингибирующих синтез ЕРО. На роль таковых претендует избыток TNF- α , который через активацию нуклеарного фактора kB (NF-kB) угнетает продукцию ЕРО [Pregi N. et al., 2009; Sancilio S. et al., 2011; Nairz M. et al., 2012]. Как провоспалительный цитокин TNF- α участвует в патогенезе атеросклероза у больных ИБС и образуется ишемизированными кардиомиоцитами при СН [Yamashita H. et al., 2003; Визир В.А., Березин А.Е., 2004; Егоренкова Л.В. и соавт., 2005; Харченко Е.П., 2012]. Между тем, в системном кровотоке его уровень не всегда изменяется, повышаясь только со II стадии СН и нарастая по мере снижения насосной функции сердца [Егорова Е.Н., 2012].

Измерение концентрации TNF- α в крови у кардиохирургических больных позволило выявить ее повышение у пациентов с умеренным гемолизом (что согласуется с данными литературы) и нормальное содержание цитокина у больных с выраженной гемоглобинемией (табл. 7, рис. 24), что, безусловно, не может быть причиной сдерживания гиперпродукции EPO в условиях гипоксии. После операции величина параметра нарастала вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 7, рис. 24), отражая, по всей видимости, феномен системной воспалительной реакции, индуцированной операционной травмой, активацией системы комплемента при взаимодействии с аппаратом ИК, ишемией/реперфузией тканей, транслокацией эндотоксинов через ишемизированную стенку кишечника и др. [Spanier T. et al., 2000; Paparella D. et al., 2002; Шумаков В.И. и соавт., 2003; Levy J.H., Tanaka K.A., 2003; Wehlin L. et al., 2004; Apostolakis E. et al., 2010; Kubicki R. et al., 2013].

Следовательно, несмотря на сопоставимые характеристики течения основного заболевания и наличие хронических воспалительных заболеваний в обеих группах больных (табл. 1), уровень TNF- α (как и EPO) в плазме крови до операции был повышенным у больных с умеренным гемолизом и нормальным у пациентов с выраженной гемоглобинемией (табл. 7, рис. 24). Возможно, причина этих отличий кроется в особенностях дооперационного лечения больных ИБС.

Анализируя спектр применяемых препаратов у кардиохирургических пациентов в дооперационном периоде, можно заключить, что отдельные группы лекарственных средств у обследованных лиц применялись одинаково часто (табл. 2). Однако в структуре медикаментозного лечения в пределах групп имелись различия: у больных с умеренным гемолизом среди ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента чаще использовался эналаприл, у пациентов с выраженной гемоглобинемией – фозиноприл, к тому же у последних чаще применялся метопролол (β 1-адреноблокатор, табл. 2).

Метопролол обладает более сильным отрицательным инотропным эффектом в сравнении с бисопрололом, и его предпочтительное использование у больных с выраженным гемолизом, видимо, объясняется несколько меньшей (чем у больных с умеренной гемоглобинемией) фракцией выброса левого желудочка (табл. 1). Однако данные о непосредственном влиянии метопролола на синтез EPO в

литературе отсутствуют, а в настоящем исследовании его влияние на выраженность гемоглобинемии крайне низко и недостоверно (табл. 27). Между тем, для ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента характерна противовоспалительная активность, описана их способность подавлять синтез ЕРО в ткани почек и пролиферацию эритрокариоцитов в костном мозге (в норме индуцируется непосредственным связыванием ангиотензина II с одноименным рецептором) [van der Meer P. et al., 2005; Hubert C. et al., 2006]. Учитывая это и тот факт, что фозиноприл, в отличие от эналаприла, является липофильным веществом и лучше проникает в клетки организма, обладая большей эффективностью [Уранов В.Н., 2010], противовоспалительное и ЕРО-ингибирующее действие у него, вероятно, тоже выражено в наибольшей степени. Кроме того, установлено высоковероятное влияние фозиноприла на выраженность постперфузионного гемолиза у обследованных пациентов (табл. 27).

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

Подобный дисбаланс цитокинов, способных регулировать эритропоэз, не мог не отразиться на эритропоэтической функции костного мозга. Последняя у больных ИБС до операции была усиленной (согласно содержанию ретикулоцитов в крови), что вполне закономерно на фоне повышенного гемолиза и проявлялось в большей степени у лиц с выраженной гемоглобинемией (табл. 7). У больных с умеренным гемолизом индукция эритропоэза происходила на фоне высокого уровня ЕРО, способного стимулировать пролиферацию и дифференцировку эритрокариоцитов, а также избытка TNF- α , обладающего неоднозначным действием на эритропоэз.

Давно известно, что рецепторы для ЕРО появляются на клетках эритроидного ряда со стадии зрелой бурстообразующей единицы эритроцитов,

максимально экспрессированы на колониеобразующей единице эритроцитов и эритроблестах, прогрессивно снижая свою численность на базофильных нормоблестах (полихроматофильные нормобласты уже нечувствительны к ЕРО) [Koury M.J., Bondurant M.C., 1992; Воробьев А.И., 2005; Rhodes M.M. et al., 2008]. При этом для реализации пролиферативного эффекта ЕРО необходимо обязательное взаимодействие эритрокариоцитов с костномозговыми макрофагами, которые индуцируют вступление клеток в митоз путем стимуляции экспрессии на их поверхности рецепторов к эфрину-2, костномозговому морфогенетическому протеину 4 (участвует в стресс-эритропоэзе), и к фактору стволовых клеток, активирующему тирозиновую киназу c-Kit в эритрокариоцитах [Гольдберг Е.Д. и соавт., 2000; Suenobu S., et al., 2002; Lenox L.E. et al., 2005]. ЕРО влияет на численность красных клеток крови преимущественно путем ингибирования апоптоза эритроидных предшественников, поскольку показано, что даже в условиях избытка ЕРО пролиферативный ответ эритрокариоцитов снижается в случае нарушения функции костномозговых макрофагов [Ермоленко В.М., Иващенко М.А., 2000; Rhodes M.M. et al., 2008; Bunn H.F., 2013].

Влияние TNF- α на эритропоэз зависит от типа гемопоэтических клеток и условий среды [Vittori D. et al., 2010; Sancilio S. et al., 2011]. На ранних стадиях созревания эритроидных прекурсоров, еще нечувствительных к ЕРО, цитокин оказывает стимулирующее действие за счет активации нуклеарного фактора κB ; на поздних стадиях – угнетающее влияние, которое может реализовываться как через ограничение пролиферации эритропоэтин-зависимых клеток (в норме это преимущественный механизм), так и через индукцию апоптоза таковых посредством активации ряда каспаз [Гольдберг Е.Д. и соавт., 2000; Rhodes M.M. et al., 2008; Vittori D. et al., 2010; Дыгай А.М., Жданов В.В., 2012]. При этом TNF-рецептор типа 1 (TNF-RI) экспрессируется на ранних предшественниках эритропоэза, TNF-RII – на всех этапах дифференцировки эритрокариоцитов в комплексе с рецептором TNF-sf13, обеспечивающим выживание пронормобластов и потенцирующий эффект ЕРО [Xiao W. et al., 2002]. Экспериментально доказано, что в присутствии ЕРО эритрокариоциты приобретают резистентность к проапоптотическому действию TNF- α [Pregi N. et al., 2009].

Резюмируя вышеизложенное можно предположить, что у больных ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом в условиях избытка TNF- α до операции увеличивается количество олигопотентных гемопоэтических клеток, а негативное влияние этого цитокина в последующем на уровне коммитированных предшественников уравнивается позитивным эффектом избытка EPO, что в итоге приводит к компенсаторному увеличению численности клеток красного ростка и нормализации их количества в крови на фоне дооперационного гемолиза. У пациентов с выраженной гемоглобинемией содержание обоих цитокинов в крови до операции определяется в нормальных пределах и, видимо, не компенсирует убыли эритроцитов, обусловленной дооперационным гемолизом. Данная точка зрения подтверждается большим дооперационным содержанием эритроцитов в крови у больных с умеренным гемолизом, чем у лиц с выраженной гемоглобинемией (табл. 6). При этом в первом случае повышенное содержание ретикулоцитов в крови объясняется профицитом TNF- α и EPO, а во втором, видимо, иными механизмами.

Кроме данных цитокинов среди позитивных многолинейных регуляторов эритропоэза значатся такие как: фактор стволовых клеток (фактор Стила), IL -3, IL -6, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; среди однолинейных – бурстопромоторная активность, простагландин E2, андрогены, тиреоидные гормоны др. При этом конечный гемопоэтический ответ определяется кооперацией факторов дистантной и локальной регуляции кроветворения в пределах гемопоэзиндуцирующего микроокружения [Гольдберг Е.Д. и соавт., 2000; Воробьев А.И., 2002; Zhu J., Emerson S.G., 2002; Sarrazin S., Sieweke M., 2011; Дыгай А.М., Жданов В.В., 2012; Musiychuk K. et al., 2013]. Учитывая несколько более редкую встречаемость заболеваний предстательной и щитовидной желез у больных с выраженной гемоглобинемией (относительно пациентов группы сравнения, табл. 1), нельзя предполагать компенсирующее участие андрогенов и тиреоидных гормонов в активации эритропоэза у этой категории лиц.

Между тем, было показано, что IL-6 даже в отсутствие гипоксии и EPO способен непосредственно индуцировать пролиферацию олигопотентных предшественников эритропоэза [Li P. et al., 2011]. Нужно отметить, что у больных ИБС с выраженным гемолизом мы регистрировали косвенные признаки

гиперпродукции этого цитокина в дооперационном периоде – повышенное содержание фибриногена и гаптоглобина в плазме крови (табл. 7, 8), что в условиях нормального содержания TNF- α у этой категории лиц могло быть обусловлено избытком IL-6, как основного индуктора синтеза белков острой фазы. Синтез фибриногена и гаптоглобина находится под контролем собственно IL-6, в то время как IL-1 β и TNF- α практически не влияют на продукцию этих белков, способствуя преимущественно гиперсекреции СРБ [Bode J.G. et al., 2012]. Кроме того, по данным литературы, IL-6 (а не TNF- α) является доминирующим среди провоспалительных цитокинов у больных ХОБЛ [Markoulaki D. et al., 2011], которые составляли более 30% среди пациентов с выраженной гемоглобинемией (табл. 1). Ранее нами было показано, что популяция кардиохирургических больных с ИБС действительно неоднородна по цитокиновому профилю плазмы крови: часть пациентов имеет избыток TNF- α , а часть из них – избыток IL-6 [Новицкий В.В. и соавт., 2006]. Поэтому не исключено, что дооперационная гиперсекреция IL-6 у больных с выраженным гемолизом лежит в основе поддержания ЕРО-независимой активации красного ростка кроветворения. Последняя также может потенцироваться путем отрицательной обратной связи, в результате которой значительная активация эритропоэза у больных с выраженным гемолизом является следствием резко повышенного разрушения эритроцитов до операции.

В классических экспериментах было показано, что введение животным предгемолитических форм эритроцитов усиливает пролиферацию эритроидных клеток в костном мозге и это не сопровождается увеличением концентрации ЕРО в сыворотке крови, но при ингибировании функции макрофагов эффект исчезает [Новиков Н.М., 1986]. Неэритропоэтиновый механизм индукции эритропоэза, видимо, достигается модуляцией архитектоники эритробластических островков в костном мозге, численность которых возрастает как неспецифическая реакция на стресс, обусловленная активацией моноцитопоэза, усилением функции макрофагов и ускоренным выходом эритрокариоцитов из структуры островков [Гольдберг Е.Д. и соавт., 2000; Улитко М.В., 2008]. Кроме того, ФЭА и ФХ, которые содержатся в составе фрагментов мембран разрушенных эритроцитов, способны стимулировать стволовые клетки к пролиферации, активировать макрофаги и увеличивать образование очагов кроветворения [Новицкий В.В. и соавт., 2004]. По всей

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

В настоящем исследовании было показано, что у больных ИБС с выраженным гемолизом (в отличие от пациентов с умеренной гемоглобинемией) клетки красной крови до операции характеризуются нерезко повышенным ХС/ФЛ-соотношением в мембране, нормальным фосфолипидным спектром цитолеммы, нормальной активностью Na^+/K^+ - и Ca^{2+} -АТФаз в ней при нормальной экспрессии гликофоринов А и В, что вполне характерно для молодой популяции эритроцитов. Между тем, в этих клетках отмечается недостаточность каталазы (в сравнении с другой группой больных), Г-6-ФДГ, АТФ и, вероятно, нарушение структурной организации цитоскелета при сниженной экспрессии CD55 и высокой проницаемости мембраны. Однако в литературе описано, что молодые формы эритроцитов обладают повышенной деформируемостью, экспрессией антигенных детерминант и активностью ферментов, включая антиоксидантные и гликолитические энзимы [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Морозова В.Т. и соавт., 2007; Bhattacharya A., 2011].

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

Известно, что ЕРО регулирует не только пролиферацию, но и дифференцировку эритроидных предшественников. Связывание ЕРО с его рецептором на эритрокариоцитах инициирует гомодимеризацию ассоциированной с рецептором киназы Jak2, которая фосфорилирует молекулу рецептора по восьми остаткам тирозина, саму себя и цитозольный фактор транскрипции STAT5,

проникающий в ядро для усиления экспрессии антиапоптотического гена *Bcl-XL*. Одновременно при взаимодействии фосфорилированных остатков тирозина с белком p85 активируется PI3-киназа, которая через активацию фактора транскрипции АКТ фосфорилирует ядерный транскрипционный фактор GATA-1 [Chateauvieux S. et al., 2011; Sarrazin S., Sieweke M., 2011]. Последний интенсивно экспрессируется во всех эритроидных клетках, поскольку функциональный GATA-связывающий ДНК мотив присутствует в регуляторных областях практически всех эритроид-специфичных генов и прежде всего ферментов синтеза гемоглобина [Lin K.R. et al., 2013].

В этом аспекте важно отметить, что для трансдукции сигнала с ЕРО-рецептора необходимо взаимодействие некоторых белков с геранил-геранил-пирофосфатом, образующимся при метаболизме мевалоната, синтезируемого с участием 3-гидрокси-3-метилглутарил-KoA-редуктазы [Hamadmad S.N. et al., 2006]. Поэтому статины, как специфические ингибиторы этого фермента, блокируют передачу активационного сигнала с ЕРО-рецепторов [Hamadmad S.N., Hohl R.J., 2007; Kaneda T. et al., 2010]. Несмотря на то, что больные ИБС с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом принимали статины одинаково часто и в равной дозе (табл. 2), у последней категории лиц, видимо, это имело важное патогенетическое значение в формировании неполноценных эритроцитов, поскольку сочеталось с нормальным уровнем ЕРО в плазме крови, в то время как в другой группе – с повышенным (табл. 7, рис. 24). Кроме того, у больных с выраженной гемоглобинемией это могло усугубляться предположительно высоким содержанием в плазме крови IL-6, который через STAT3 ингибирует трансдукцию сигнала с ЕРО-рецепторов, детерминируя резистентность эритрокариоцитов к ЕРО [Inrig J.K. et al., 2011; Won H.S. et al., 2012].

Показано, что образование основной части эритроцитарных белков происходит на этапе дифференцировки ЕРО-зависимых кроветворных клеток. Синтез субъединиц спектрина, актина и аддуцина наиболее активно протекает в малодифференцированных клетках (пронормобластах и базофильных нормобластах), но фиксация спектрин-актиновой сети к внутренней поверхности мембраны эритроцитов происходит благодаря белкам полос 3 и 4.1, которые синтезируются на этапе более зрелых клеток (полихроматофильных и

оксифильных нормобластов) [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Chen K. et al., 2009; Liu J.J. et al., 2010]. Интенсивная продукция ферментов гликолиза фосфофруктокиназы и пируваткиназы также начинается со стадии эритробласта и характеризуется чередованием экспрессии нескольких форм изоферментов на различных стадиях созревания эритрокариоцитов [Jimeno P. et al., 1998]. Экспрессия гликофорина А на клетках эритроидного ряда происходит на поздних стадиях эритропоэза, в то время как CD55 синтезируется на стадии эритробластов [Griffiths R.E., et al., 2007; Liu J.J. et al., 2010; Griffiths R.E., et al., 2011], что, видимо, и объясняет нормальную экспрессию гликофорина А при пониженном экспонировании CD55 на эритроцитах у больных с выраженным гемолизом.

В связи с этим становится очевидным, что продукция эритроцитарных белков преимущественно происходит на ЕРО-зависимых этапах эритропоэза и является залогом функциональной полноценности эритроцитов. При этом высокие концентрации ЕРО вызывают укорочение фаз клеточного цикла G_0/G_1 с целью ускорения пролиферации эритрокариоцитов, что влечет за собой сокращение времени синтеза компонентов дочерних клеток [Воробьев А.И., 2001, 2005; Rhodes M.M. et al., 2008], но при физиологическом ответе на гипоксию, очевидно, компенсируется активацией метаболических процессов под влиянием высоких доз ЕРО. Если же активация эритропоэза достигается неэритропоэтиновыми механизмами, что характерно для больных ИБС с выраженным гемолизом, то интенсивная пролиферация клеток при нормальном содержании ЕРО формирует, очевидно, его относительный дефицит и, как следствие, недостаточное образование белков будущих эритроцитов. При этом у больных, проявляющих умеренный гемолиз при ИК, избыток ЕРО в крови до операции сочетается с профицитом $TNF-\alpha$, который увеличивает продолжительность клеточного цикла эритрокариоцитов и, соответственно, время синтеза эритроцитарных белков [Dai C. et al., 2003].

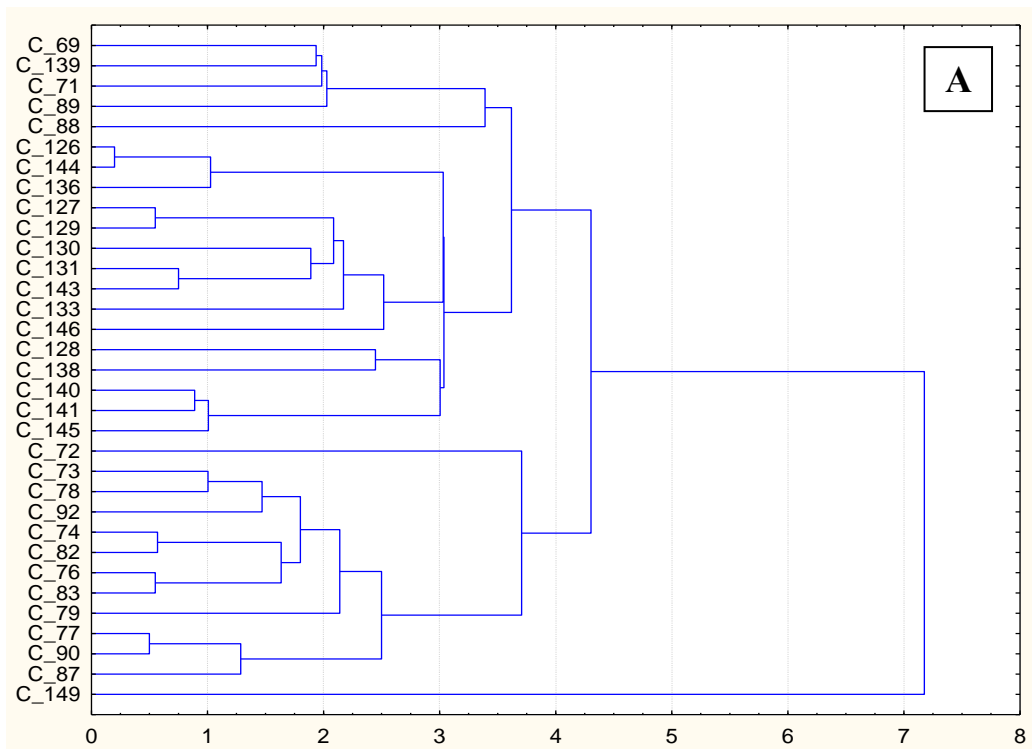
Согласно вышеизложенному, $TNF-\alpha$ может оказывать позитивное действие на эритропоэз путем усиления пролиферации олигопотентных эритроидных предшественников, поддержания выживаемости эритрокариоцитов (при высоком содержании ЕРО) и удлинения их клеточного цикла на поздних этапах кроветворения, что обеспечивает пролонгированные биосинтетические процессы в клетках. Наверное, поэтому в настоящем исследовании нами была

зарегистрирована отрицательная взаимосвязь ($r = -0,38$; $p < 0,05$) уровня TNF- α в крови до операции с выраженностью гемоглобинемии в послеоперационном периоде (табл. 20). Более того, этот параметр оказался одним из двух, которые позволили уже до операции распределить кардиохирургических больных на пациентов с умеренным и выраженным гемолизом (по результатам кластерного анализа, табл. 28, рис. 26А). Вторым фактором оказался индекс ригидности эритроцитов (табл. 28, рис. 26Б), что позволяет предполагать определяющую роль TNF- α в механизмах формирования цитоскелета, процессы сборки которого продолжаются в эритроидных клетках вплоть до стадии ретикулоцитов включительно и требуют времени [Сторожок С.А. и соавт., 1997; Chen K. et al., 2009; Liu J.J. et al., 2010]. При этом чувствительность эритрокариоцитов к ЕРО теряется гораздо раньше, что наряду с применением у больных ИБС до операции статинов, ингибирующих трансдукцию сигнала с ЕРО-рецептора, может объяснять отсутствие взаимосвязи между выраженностью постперфузионного гемолиза и концентрацией этого цитокина до операции.

В послеоперационном периоде наличие какого-либо влияния TNF- α на клетки красной крови и выраженность гемоглобинемии у кардиохирургических больных маловероятно, поскольку, во-первых, его высокая концентрация в этот период не отличалась между группами обследованных пациентов (табл. 7, рис. 24), а, во-вторых, в литературе нет сведений о наличии рецепторов к TNF- α на поверхности эритроцитов. Эритропоэтические эффекты TNF- α и ЕРО на данном этапе тоже были незначимыми в патогенезе гемолиза, так как не успевали реализоваться в силу короткого промежутка времени с начала операции. Однако действие этих цитокинов может определять элиминацию костномозгового пула молодых форм эритроцитов и зрелых депонированных клеток. Показано, что ЕРО вызывает сокращение адвентициальных клеток, покрывающих большую часть стенки венозных синусов, а также увеличение в ней числа и диаметра пор, что облегчает миграцию клеток красной крови [Юшков Б.Г. и соавт., 2004; Liu J.J. et al., 2010].

В виду того, что даже после операции у больных ИБС с выраженной гемоглобинемией содержание ЕРО в крови оставалось меньшим, чем при умеренном гемолизе, на фоне равной интраоперационной оксигенации крови

Код пациента



Код пациента

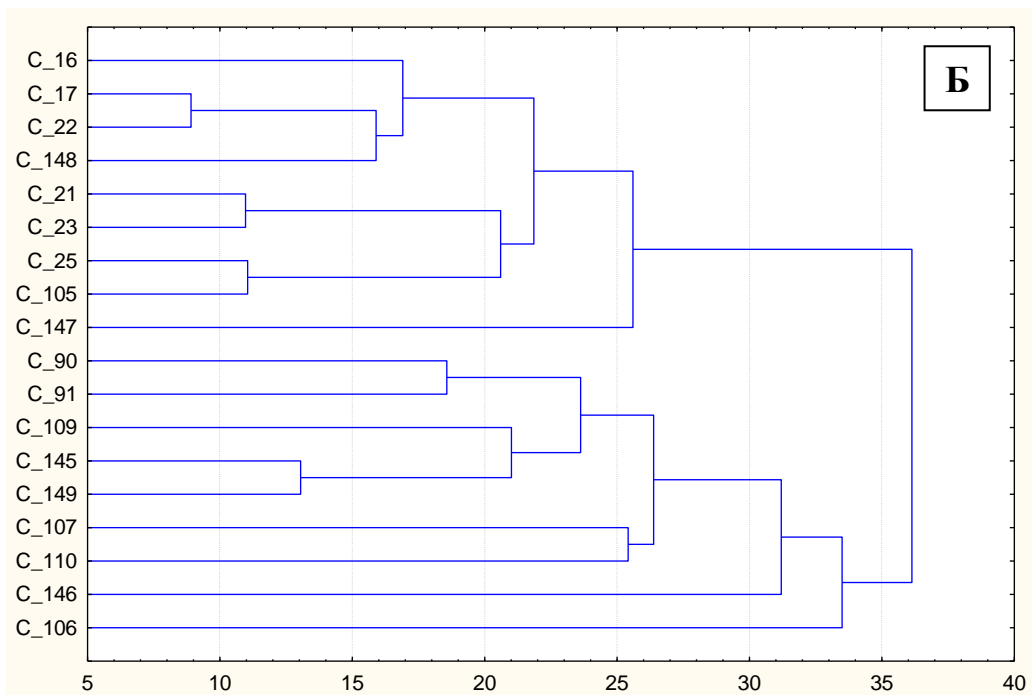


Рис. 26. Дендрограмма кластеризации больных ишемической болезнью сердца в зависимости от концентрации фактора некроза опухолей α в крови (А), индекса ригидности эритроцитов (Б) до операции и выраженности внутрисосудистого гемолиза после операции в условиях искусственного кровообращения.

(в среднем за операцию, табл. 4) нельзя исключить дисфункцию кислородного сенсора юктагломерулярного аппарата почек или процессов биосинтеза гормона в интерстициальных клетках. Так, эксперименты на клеточных линиях показали возможность эпигеномной регуляции экспрессии гена EPO, которая угнетается при гиперметиловании HIF-связывающего сайта в структуре гена, к тому же феномен гиперметилирования некоторых генов подтверждается клиническими исследованиями при различных патологиях [Chang Y.T. et al., 2013]. Кроме того, механизм гипозэргии EPO-ответа на гипоксию может быть следствием наследственно обусловленной аномалии регуляции синтеза или экскреции EPO почками у больных ИБС.

Среди генетически детерминированных свойств клеток красной крови у кардиохирургических больных в настоящем исследовании был определен фенотип эритроцитов по системам групп крови АВ0 и Резус. Статистически значимых различий по частоте встречаемости антигенов и фенотипов системы АВ0 между пациентами с умеренным и выраженным гемолизом получено не было, однако обращало на себя внимание отчетливое преобладание 0-фенотипа эритроцитов в группе больных с умеренным гемолизом и более частая встречаемость экспрессии В-антигена на клетках у лиц с выраженной гемоглобинемией (табл. 17).

По данным литературы, среди больных атеросклерозом и другой сосудистой патологией группа крови АВ (IV) обнаруживается чаще, а группа 0 (I) – реже, чем у здоровых доноров [Турбасова Н.В. и соавт., 2009]. При этом если у пациентов присутствует хотя бы один 0-аллель, то риск развития инфаркта миокарда снижается на 39%, но увеличивается втрое при наличии В-аллеля [von Beckerath N. et al., 2004]. Данное обстоятельство (наряду с полученными результатами) позволяет рассматривать пациентов с выраженным гемолизом как лиц генетически более подверженных развитию ИБС по сравнению с больными с умеренной гемоглобинемией. Возможно, эритроциты этих пациентов обладают более низкой газотранспортной функцией и гемолитической стойкостью, ассоциированными с АВ0-фенотипом клеток.

Известно, что полисахаридные антигены, которыми являются в том числе А-, В- и Н-молекулы, участвуют в образовании гликокаликса, препятствующего агглютинации эритроцитов за счет формирования отрицательного заряда на их

поверхности [Daniels G., 1999]. При этом количество Н-молекул на эритроцитах зависит от экспрессии А- и В-антигенов и убывает в последовательности $0 >> A_2 >> B >> A_2B >> A_1 >> A_1B$ [Токарев Ю.Н., 2000]. Вероятно, именно Н-антиген придает эритроцитам максимальный поверхностный отрицательный заряд, благотворно влияющий на реологические характеристики крови. Показано, что эритроциты с 0-фенотипом характеризуются низкой агрегируемостью и малым средним объемом, клетки В-фенотипа имеют обратные характеристики, в то время как АВ-эритроциты быстро разрушаются при хранении [Селезнев А.В., 2007]. К тому же у лиц с ненулевыми группами крови интенсивность ПОЛ в клеточных мембранах выше, а электрофоретическая подвижность эритроцитов ниже, чем у доноров 0-группы [Кузник Б.И., 2010]. Поэтому вполне возможно, что отсутствие Н-антигена (или наличие В-антигена) снижает резистентность эритроцитов к ИК.

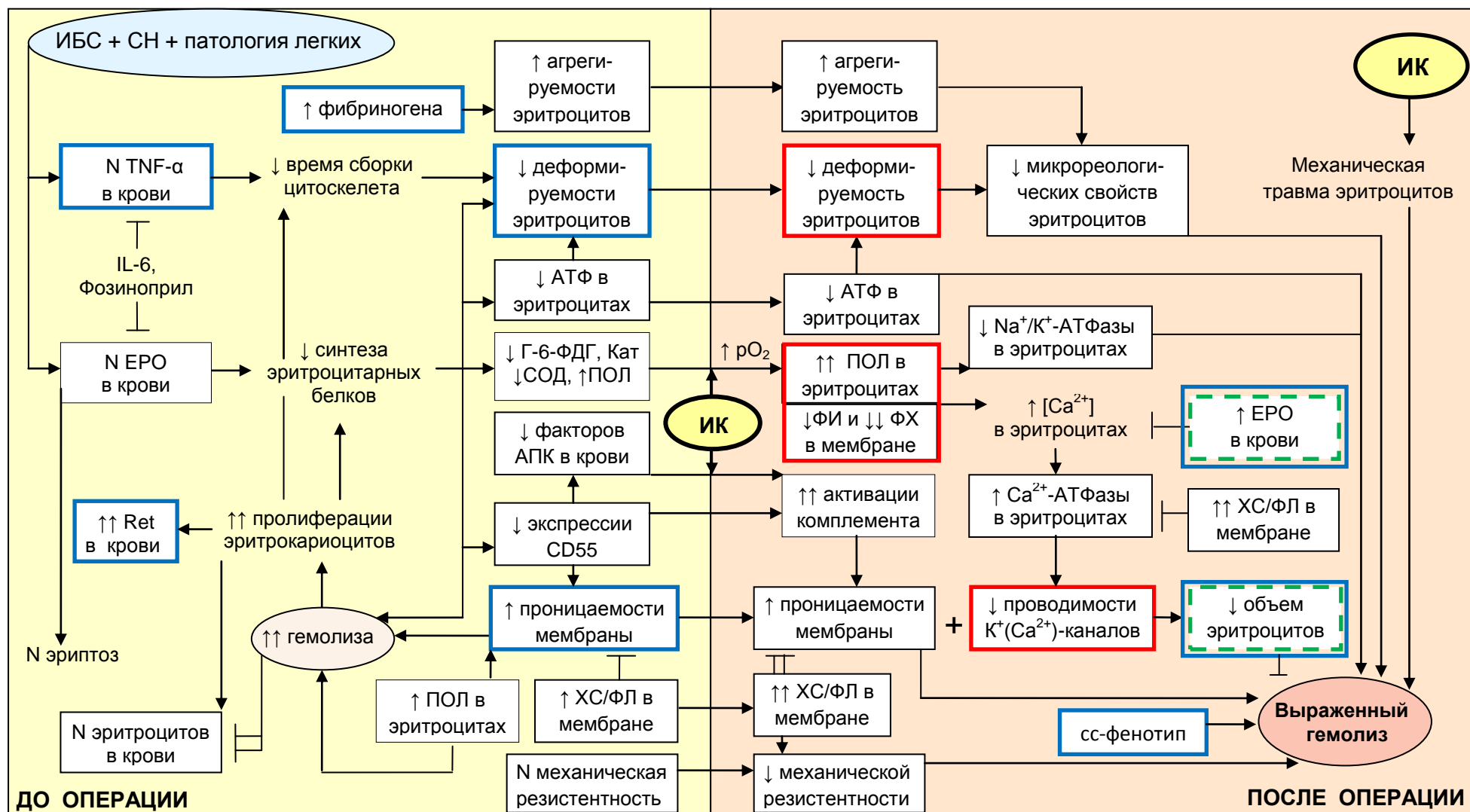
Анализ частоты встречаемости антигенов и неполных фенотипов эритроцитов системы Резус обнаружил у больных с выраженным гемолизом превалирование *сс*-фенотипа при более редкой встречаемости С-антигена по сравнению с пациентами с умеренным постперфузионным гемолизом (табл. 18, 19). Это означает, что С-антиген обладает протективным влиянием на гемолитическую стойкость эритроцитов и его отсутствие на мембране (*сс*-фенотип) предрасполагает к постперфузионному гемолизу. Последнее подтверждается статистически значимым коэффициентом ассоциации данного признака с высокой интенсивностью гемолитических реакций после ИК ($r_a = 0,44$; $p < 0,05$; табл. 29).

В крупном популяционном исследовании с участием более чем 8000 доноров и около 700 больных атеросклерозом было показано, что при данной патологии *ссDee* и *ссDEe* Резус-фенотипы эритроцитов обнаруживаются чаще, чем в норме [Турбасова Н.В. и соавт., 2009]. Частая встречаемость *сс*-фенотипа эритроцитов при атеросклерозе в целом, и в частности у больных ИБС с выраженным гемолизом (табл. 19), может быть связана с потенцирующими гипоксию свойствами этих клеток, поскольку обнаружено, что эритроциты доноров с Резус-фенотипом *ссDee* характеризуются пониженной вязкостью гликокаликса и большим объемом эритроцитов относительно носителей С-антигена [Веснина Н.В., 2008]. Видимо, данное обстоятельство ухудшает микрореологические свойства этих клеток, а низкая плотность гликокаликса делает мембрану эритроцитов более доступной для

влияния агрессивных факторов (протеиназ и антител). Протеиназы, в свою очередь, могут изменять прочность связи компонентов мембраны с цитоскелетом и, тем самым, влиять на деформируемость клеток [Daniels G., 1999]. В условиях ИК, когда ламинарный ток крови часто переходит в турбулентный, обогащаясь большим количеством продуктов распада и секреции клеток [Paparella D. et al., 2002; Vercaemst L., 2008], вышеназванные особенности эритроцитов с ss-фенотипом, вероятно, оказываются значимыми и реализуются в усиленную деструкцию клеток.

Подводя итог выполненным исследованиям, которые благодаря использованию корреляционного, дисперсионного и кластерного анализа данных позволили выделить основополагающие факторы в формировании постперфузионной гемолемии, можно сформировать 2 схемы ее патогенеза (рис. 27, 28). 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. 27). Первый цитокин удлиняет клеточный цикл эритрокариоцитов и способствует сборке цитоскелета, второй – обеспечивает активный синтез эритроцитарных белков, в результате чего образуются полноценные эритроциты с нормальной деформируемостью, содержанием АТФ, активностью Г-6-ФДГ, каталазы и экспрессией CD55, обуславливающей нормальную проницаемость мембраны при повышенной активности ПОЛ и резко увеличенном ХС/ФЛ-соотношении в мембране клеток красной крови. Последнее, снижая механическую резистентность эритроцитов, вероятно, является основной причиной деструкции клеток в крупных сосудах кровеносного русла и причиной несколько повышенного гемолиза у больных ИБС до операции. Однако усиленный эритродиализ, 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 эритроцитоз, что, в итоге, определяет поддержание числа эритроцитов в пределах несколько повышенных значений (превышают таковые у больных с выраженным гемолизом) (рис. 27).

Проведение ИК, как известно, сопровождается артериальной гипероксией и контактом крови с чужеродными поверхностями, что у больных с умеренным



гемолизом не приводит к интраоперационной интенсификации ПОЛ в эритроцитах ввиду исходно нормальной активности Г-6-ФДГ и каталазы в клетках, но вызывает мощную активацию системы комплемента, очевидно, вследствие избыточного предсуществующего содержания в крови факторов классического пути (активируется при нейтрализации гепарина протамином сульфата) (рис. 27). 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 ЕРО в плазме крови, блокирующего неселективные катионные каналы эритроцитов. К тому же протективное действие на величину объема клетки оказывает С-антиген системы Резус. При этом микрореологические свойства красных клеток крови не нарушены, но нефизиологические сдвиговые нагрузки в пределах аппарата ИК индуцируют механическую травму эритроцитов с низкой механической резистентностью (рис. 27).

Формированию выраженного постперфузионного гемолиза у больных ИБС предшествует сопутствующая патология легких, назначение фозиноприла (обладает противовоспалительным и ЕРО-ингибирующим эффектом) и, возможно, избыток IL-6, что на фоне атеросклероза и СН сочетается с нормальным содержанием TNF- α и ЕРО в плазме крови до операции (рис. 28). В этом случае усиление гемолитических процессов при патологии компенсируется интенсивной пролиферацией эритрокариоцитов под влиянием продуктов распада клеток, однако это 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, Г-6-ФДГ, каталазы и CD55-молкул. Последнее становится причиной гиперактивации системы комплемента

преимущественно по альтернативному пути уже в дооперационном периоде, что при не слишком высоком ХС/ФЛ-соотношении 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 на фоне активации эритропоэза нормальным содержанием таковых в крови (но менее аналогичной величины у больных с умеренным гемолизом) (рис. 28).

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. 28). При этом на первый план в патогенезе выраженного гемолиза выступает интраоперационная активация ПОЛ в эритроцитах, в которых при ятрогенной гипероксемии усугубляется недостаточность Г-6-ФДГ и каталазы. 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 чрезмерный избыток внутриклеточного Ca^{2+} , усиливает исходно нормальную (из-за ретикулоцитоза) активность Ca^{2+} -АТФазы, которая быстро элиминирует Ca^{2+} из клетки и способствует преждевременному закрыванию $K^+(Ca^{2+})$ -каналов. При этом ингибирующее влияние ЕРО на уровень внутриклеточного Ca^{2+} практически отсутствует вследствие слабовыраженного увеличения содержания цитокина в крови после операции. В результате объем клетки уменьшается незначительно, что отягощается редокс-опосредованным ингибированием Na^+/K^+ -АТФазы в присутствие 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. 28).

Из вышеизложенного следует, что степень выраженности постперфузионного гемолиза во многом определяется исходным структурно-метаболическим статусом эритроцитов до операции у больных ИБС. Данное обстоятельство позволило разработать несколько формул множественной регрессии для количественного прогноза величины концентрации свободного гемоглобина в плазме крови у кардиохирургических пациентов после ИК на основе характеристик клеток красной крови в дооперационном периоде (табл. 23). Согласно результатам регрессионного анализа статистически значимыми оказались только 2 закономерности. При этом первая из них использует только показатели перфузиологического обеспечения операции: продолжительность ИК и максимальное значения pO_2 в крови во время операции (формула №1, табл. 23). Подобный подход не очень точно описывает зависимость гемоглобинемии от данных переменных (низкий коэффициент множественной регрессии, табл. 23) и позволяет прогнозировать только 20% фактической вариабельности этого признака (согласно коэффициенту детерминации, табл. 23). Более того, использование этой формулы в дооперационном периоде практически невозможно, так как на дооперационном этапе трудно однозначно предположить длительность ИК, а тем более величину максимального значения pO_2 в крови, которое достаточно лабильно и определяется газовым составом артериальной крови пациента в каждый момент времени.

В связи с этим, для прогнозирования уровня гемоглобинемии предпочтительнее использовать вторую статистически значимую формулу регрессии (формула №6, табл. 23), включающую в себя исключительно дооперационные показатели крови больных ИБС: концентрацию $EP0$ и $TNF-\alpha$ в крови, а также амплитуду, время развития максимальной гиперполяризации и скорость восстановления мембранного потенциала при Ca^{2+} -индуцированном ГПО эритроцитов. Данная закономерность достаточно точно описывает зависимость гемоглобинемии от вышеназванных переменных (высокий коэффициент множественной регрессии, табл. 23) и позволяет прогнозировать 96% фактической вариабельности этого признака (согласно коэффициенту детерминации, табл. 23).

При сравнении реальных значений гемоглобинемии у кардиохирургических больных после операции с рассчитанными ее значениями по данной формуле видно, что цифры очень близки по величине (табл. 24). Между тем, важно отметить, что ввиду сильно выраженной вариативности концентраций EPO и TNF- α в крови даже у здоровых доноров и требований нормальности распределения для применимости регрессионного анализа, разработанная формула справедлива только в том случае, если значения ее переменных принадлежат строго определенным соответствующим доверительным интервалам (п. 3.14). При использовании величин факторных переменных, выходящих за пределы доверительного интервала, прогностическая значимость формулы может снижаться.

При всех достоинствах количественного прогноза уровня постперфузионной гемоглобинемии у кардиохирургических больных на основе дооперационных лабораторных показателей крови приходится констатировать, что методика оценки Ca^{2+} -индуцированного ГПО эритроцитов недоступна для клинического использования, а определение содержания EPO и TNF- α в крови требует много времени для проведения анализа (учитывая прагматичный подход лабораторий к накоплению образцов). В связи с этим возникла необходимость создания методики прогнозирования выраженности постперфузионного гемолиза, основанной на использовании показателей клинического статуса пациента, входящих в стандартную процедуру верификации диагноза. Среди таковых в дооперационном периоде, как показано выше, развитию выраженного гемолиза способствуют наличие заболеваний легких, низкое содержание эритроцитов в крови, гиперфибриногенемия, а препятствуют – наличие патологии почек и экспрессия на эритроцитах С-антигена системы Резус. Последний подход, хотя и не применяется в повседневной клинической практике, но характеризуется простотой выполнения и низкой стоимостью, поэтому с легкостью может быть внедрен в практическое здравоохранение.

Большая часть вышеназванных параметров являются качественными и не могут быть подвергнуты регрессионному анализу, в связи с чем, возможно прогнозирование только на качественном уровне (выраженная/умеренная гемоглобинемия после ИК), т.е. определение принадлежности конкретного

пациента к группе риска. В этом случае может быть разработана лишь эмпирическая формула, основанная на клинических наблюдениях, для создания которой мы использовали величину отношения шансов развития выраженного гемолиза по указанным факторным признакам, которая была дополнена данными о степени влияния качественного признака на выраженность постперфузионной гемоглобинемии. Последовательность математических операций (п. 3.17) позволила разработать формулу расчета величины балла, по значению которого определяется риск выраженного гемолиза после ИК, и так как его значения строго дискретны, то методика была названа «шкала гемолитического риска перфузии (ГРП) для клинического использования».

В основу создания шкалы ГРП были положены результаты обследования всех 150 больных ИБС, вошедших в исследование, и применимость ее затем была апробирована на 46 пациентах (25 больных с умеренным и 21 с выраженным гемолизом), у которых одновременно определяли все показатели, используемые в уравнении (№ 19, п. 3.17). Полученные результаты расчета балла ГРП при графическом представлении демонстрируют достаточно четкое распределение больных ИБС на 2 групп с различным риском гемолиза (рис. 7). При этом расчет параметров диагностической чувствительности, специфичности и эффективности, а так же предсказательной значимости положительного и отрицательного результатов прогноза выраженной гемоглобинемии по шкале ГРП позволяет получить значения этих параметров, превышающие уровень 80% (табл. 31), что считается достаточным для признания диагностической надежности использованной системы [Камышников В.С., 2000].

Кроме того, в поддержку разработанной методики свидетельствует тот факт, что при анализе характеристик 4 пациентов, вошедших в группу «ложно положительные результаты» выяснилось, что 2 из них имели самую низкую продолжительность ИК (70 и 72 мин) и, если бы время перфузии у них было близким к среднему по группе (100-120 мин), то эти пациенты вошли бы в категорию «истинно положительные». В связи с этим убедительные данные исследования, подтвержденные математически, позволяют рекомендовать разработанную шкалу ГРП к применению в клинической практике, что имеет

важное значение для профилактики гемолиз-опосредованных расстройств в раннем послеоперационном периоде.

Как известно, последствия внутрисосудистого гемолиза обусловлены проагрегантным и прокоагулянтным влиянием компонентов мембраны разрушенных эритроцитов, их внутриклеточного содержимого, а также плеотропными эффектами свободного гемоглобина. Основными органами-мишенями при массивной гемоглобинемии являются почки, между тем значительной дисфункции подвержены и многие другие органы (легкие, кишечник, головной мозг и т.д.) в виду способности свободного гемоглобина повышать сосудистый тонус и вызывать расстройства микроциркуляции, потенцируя нарушение реологических свойств крови [Rother R.P. et al., 2005; Дуткевич И.Г., 2007; Морозов Ю.А. и соавт., 2007, 2008; Vercaemst L., 2008; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011].

С целью интерпретации полученных результатов и выяснения влияния выраженной гемоглобинемии на течение послеоперационного периода у кардиохирургических пациентов, была проведена оценка клинического статуса таковых в группах с умеренным и выраженным гемолизом при учете особенностей терапевтической тактики во время и после ИК. Оказалось, что длительность нахождения пациентов в палате интенсивной терапии не отличалась между группами оперированных лиц, но общая продолжительность госпитализации была несколько большей у больных с выраженной гемоглобинемией (табл. 5), что в целом может быть проявлением негативного влияния гемолиза высокой интенсивности на сроки реабилитации кардиохирургических больных.

Среди применяемых препаратов в интра- и послеоперационном периодах пентамин в большей дозе использовался у лиц с умеренной гемоглобинемией, а нитроглицерин несколько чаще у больных с выраженным гемолизом (табл. 3). Такое различие в тактике коррекции периферического кровотока, по-видимому, связано с исходной неоднородностью больных ИБС и особенностями препаратов. Пентамин, как ганглиоблокатор, обладает долгосрочным гипотензивным эффектом, нитроглицерин – кратковременным, и поэтому, очевидно, более предпочтителен у пациентов с выраженным гемолизом, имеющих до операции

несколько меньшую фракцию выброса левого желудочка, чем у больных с умеренной гемоглобинемией (табл. 1).

Важно отметить, что различия в медикаментозной поддержке пациентов двух групп исследования во время операции были зарегистрированы только в отношении пентамина, этамзилата и суксаметония. Однако, согласно результатам дисперсионного анализа, препараты не оказывали достоверного влияния на степень выраженности постперфузионной гемоглобинемии (табл. 27). В связи с этим более частое применение миорелаксантов суксаметония во время операции и пипекурония после хирургического вмешательства у больных с выраженным гемолизом (в отличие от пациентов другой группы) можно рассматривать как следствие высокой гемоглобинемии. Известно, что свободный гемоглобин способен связывать молекулы монооксида азота (NO), опосредующие миорелаксацию, что при массивной деструкции эритроцитов может приводить к гипертензии по большому и малому кругу кровообращения [Reiter C.D. et al., 2002; Jeffers A. et al., 2006; Vermeulen-Windsant I.C. et al., 2011], а так же вовлекать другие системы органов в патогенез гемолитических расстройств [Rother R.P. et al., 2005]. Последнее, возможно, обуславливало более частое использование наркотических анальгетиков после операции у больных с выраженным гемолизом в отличие от альтернативной группы пациентов (табл. 5). Не исключено, что сложные механизмы формирования боли потенцировались спастическим компонентом и требовали эффективной обезболивающей терапии.

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

Степень тяжести анемии у больных с умеренным гемолизом после операции классифицировалась как легкая, а при выраженной гемоглобинемии – как средняя (табл. 6). Препараты донорской эритроцитарной массы в послеоперационном периоде использовались чаще у больных с выраженной гемоглобинемией (табл. 5). Это вполне может быть связано с интраоперационным гемолизом, так как увеличение концентрации свободного гемоглобина в крови до 25 мг/дл

соответствует разрушению 5 мл эритроцитов [Дуткевич И.Г., 2007]. Учитывая зафиксированный средний уровень гемоглобинемии у больных с выраженным гемолизом (около 56 мг/дл, табл. 7) это соответствует лизису примерно 10 мл эритроцитов, т.е. 30 мл крови (принимая во внимание степень гемодилюции, табл. 7). При этом фактическая утрата эритроцитов, очевидно, была больше, так как в исследовании регистрировали величину постперфузионной гемоглобинемии, а гемолиз продолжался в течение всего периода ИК при параллельном участии механизмов утилизации свободного гемоглобина. При этом значимость процессов деструкции эритроцитов в развитии послеоперационной анемии подтверждается отрицательной корреляцией ($r = -0,47$; $p < 0,05$) их количества в крови после операции с уровнем свободного гемоглобина в этот период (табл. 22). Показано, что 25% эритроцитов, получивших во время ИК сублетальные повреждения, разрушаются в течение первых суток после операции [Vercaemst L., 2008].

Тем не менее, маловероятно, что гемолиз мог оказать самостоятельное влияние на тактику трансфузионной терапии, которая, скорее всего, была обусловлена большей интраоперационной кровопотерей (табл. 4) из-за длительного ИК (табл. 4) и меньшим содержанием эритроцитов в крови до операции (табл. 6) у больных с выраженным гемолизом по сравнению с другой группой больных. Следовательно, не собственно гемолиз, а совокупность всех трех факторов (гемолиз, кровопотеря, и предсуществующее невысокое содержание эритроцитов в крови) обуславливают высокую потребность в донорской крови у пациентов с выраженной гемоглобинемией, при этом два из трех факторов определяются исходной дисфункцией периферического звена эритрона до операции.

В ходе оценки показателей функционального состояния почек было отмечено, что у больных с выраженным гемолизом суточный диурез на 2 сутки после операции (когда отменяются диуретики) оказался несколько меньше, такового в альтернативной группе пациентов (табл. 5), а в общей популяции больных он отрицательно коррелировал ($r = -0,34$; $p < 0,05$) с концентрацией свободного гемоглобина в крови после ИК (табл. 22). Кроме того, протеинурия у этой категории больных встречалась достоверно чаще (и в несколько большей степени) при равном содержании лейкоцитов в моче (табл. 5), что исключает

фактор воспаления мочевыводящих путей и свидетельствует в пользу повреждения структур нефронов, очевидно, продуктами распада свободного гемоглобина.

Фильтрация последнего в почках предотвращается взаимодействием его с гаптоглобином, концентрация которого в плазме крови после ИК у больных с выраженным гемолизом соответствовала таковой при умеренной гемоглобинемии на фоне более чем двукратного превышения уровня гемоглобинемии. Факт равного содержания фракций прямого и непрямого билирубина в плазме крови после операции у больных обеих групп исследования (табл. 5) также указывает на элиминацию свободного гемоглобина из организма, которая, очевидно, имеет ятрогенное происхождение и осуществляется во время перфузии. Тактика форсированного диуреза традиционно применяется для вторичной профилактики гемоглобинемии [Davis C. et al., 1999; Дуткевич И.Г., 2007], что подтверждалось несколько большим диурезом во время операции у больных с выраженной гемоглобинемией (табл. 4). Следовательно, активная элиминация свободного гемоглобина из крови способствует его накоплению в эпителиоцитах канальцев, где Fe^{2+} гема индуцирует генерацию АФК и альтерацию канальцевого эпителия за счет отека которого, видимо, объем суточного диуреза несколько снижается.

Индукцированное гемоглобинемией свободнорадикальное повреждение тканей в сочетании с аккумуляцией жидкости в организме, по всей видимости, также лежит в основе избыточного накопления плеврального экссудата, количество которого после операции у больных с выраженным гемолизом почти в 2 раза превышало таковое у лиц с умеренной гемоглобинемией (табл. 5). Убедительным доказательством причастности постперфузионного гемолиза к этим процессам служит высокодостоверная положительная корреляция ($r = -0,45$; $p < 0,01$) объема плеврального экссудата с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови после операции (табл. 22). Образование экссудата в плевральной полости ограничивает экскурсию легких и при чрезмерном накоплении (более 500 мл) может привести к острой дыхательной недостаточности, что особенно важно для больных с выраженным гемолизом, третья часть из которых еще в дооперационном периоде страдали заболеваниями легких (табл. 1).

Таким образом, результаты настоящего исследования подтверждают высокую значимость постперфузионной гемоглобинемии в процессах

послеоперационного восстановления кардиохирургических пациентов, степень выраженности которой во многом определяется исходным состоянием периферического звена эритрона в дооперационном периоде. При этом характер сопутствующей патологии, спектр применяемых препаратов, и, возможно, генетически детерминированные особенности больных ИБС определяют дисрегуляцию эритропоэза накануне хирургического вмешательства, лежащую в основе неэффективной регенерации красного ростка на фоне атеросклероза с формированием неполноценных клеток красной крови. Дооперационная оценка структурно-метаболических свойства эритроцитов, позволяет не только предвидеть развитие выраженной постперфузионной гемоглобинемии, но и задает направления для таргетной терапии и первичной профилактики данных расстройств как потенциально опасных для жизни пациента.

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 A⁺ и B⁺ 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 $\text{TNF-}\alpha$ в крови.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверина, Т.Б. Что необходимо знать кардиологу об искусственном кровообращении / Т.Б. Аверина, Д.Ш. Самуилова // Креативная кардиология. – 2007. – № 1-2. – С. 102–117.
2. Алекперов, Э.З. Современные концепции о роли воспаления при атеросклерозе / Э.З. Алекперов, Р.Н. Наджафов // Кардиология. – 2010. – Т. 50, № 6. – С. 88–91.
3. Антонов, В.Ф. Липидные поры: Стабильность и проницаемость мембран / В.Ф. Антонов // Соросовский образовательный журнал. – 1998. – № 10. – С. 10–16.
4. Аутоиммунная теория патогенеза атеросклероза и новые пути его лечения / А.Н. Климов, В.А. Нагорнев, А.Д. Денисенко, В.О. Константинов // Вестник РАМН. – 2003. – № 12. – С. 29–35.
5. Барбараш, Л.С. Активность гемолиза у больных с нормально функционирующими искусственными шаровыми и ксенобиологическими протезами митрального клапана сердца : метод. рекомендации / Л.С. Барбараш, Н.А. Барбараш, Г.И. Тимощук. – Кемерово, 1991. – 15с.
6. Белов, Ю.В. Показания к реваскуляции миокарда с позиций кардиохирурга и терапевта – кардиолога / Ю.В. Белов, О.М. Богопольская // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2000. – Т. 6, №4. – С. 119–121.
7. Бимаммарокоронарное шунтирование у больных ишемической болезнью сердца и сахарным диабетом / А.В. Чвоков, П.А. Шиленко, И.В. Жбанов и др. // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 16–18.
8. Биоэнергетика клетки. Химия патологических процессов: учебное пособие / Д.И. Кузьменко, Т.В. Жаваронок, И.П. Мамонтова и др. / под ред. В.Ю. Сереброва, Г.А. Сухановой. – Томск, 2008. – 180 с.
9. Ближайшие и отдаленные результаты прямой реваскуляризации миокарда на работающем сердце / П.О. Казанчян, В.А. Попов, П.Г. Сотников и др. // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 4, № 5. – С. 27–33.
10. Богопольская, О.М. Вторичная профилактика сердечно-сосудистых осложнений после аортокоронарного шунтирования / О.М. Богопольская // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2007. – № 1. – С. 52–56.

11. Бокерия, Л.А. Ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром и осложненные формы инфаркта миокарда. Алгоритм решения проблемы / Л.А. Бокерия // Российские медицинские вести. – 2003. – Т. 8, № 2. – С. 66–67.
12. Бокерия, Л.А. Кардиология и кардиохирургия – инновационное развитие / Л.А. Бокерия // Вестник РАМН. – 2012. – № 5. – С. 4–5.
13. Бокерия, Л.А. Нормотермическая кардиохирургия: история, достижения, перспективы / Л.А. Бокерия, В.Е. Вольгушев // Аналы хирургии. – 2005. – № 6. – С. 11–16.
14. Бокерия, Л.А. Сравнительный анализ применения коронарной ангиопластики и операции аортокоронарного шунтирования у пациентов со стабильной стенокардией: история вопроса и современное состояние проблемы / Л.А. Бокерия, О.Л. Бокерия, З.Ф. Кудзоева // Анналы хирургии. – 2009. – № 6. – С. 10–23.
15. Бокерия, Л.А. Трансмиокардиальная реваскуляризация: клинические результаты и роль в современной тактике ведения больного ишемической болезнью сердца / Л.А. Бокерия, Э.Ю. Темирова // Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН. – 2011. – Т. 12, № 4. – С. 37–45.
16. Бранд, Я.Б. Малоинвазивная коронарная хирургия / Я.Б. Бранд, О.В. Сапельников, М.А. Сагиров // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 2002. – № 4. – С. 61–66.
17. Васильева, Е.М. Биохимические особенности эритроцита. Влияние патологии (обзор литературы) / Е.М. Васильева // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 51, № 2. – С. 118–126.
18. Вельков, В.В. С-реактивный белок – в лабораторной диагностике острых воспалений и в оценке рисков сосудистых патологий / В.В. Вельков // Клинико-лабораторный консилиум. – 2008. – Т. 2, № 21. – С. 37–48.
19. Веснина, Н.В. Rh-антигены эритроцитов: аллоиммунизация и влияние на состояние периферического звена эритрона при гемотрансфузии: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н.В. Веснина. – Томск, 2008. – 23 с.
20. Взаимосвязь реологических свойств крови с эритроцитарным метаболизмом и фактором Виллебранда у спортсменов и больных периферическим

- атеросклерозом / И.И. Осетров, А.Д. Викулов, А.А. Баранов и др. // Физиология человека. – 2006. – Т. 32, №6. – С. 80–86.
21. Взаимосвязь цитокинов и факторов бактерицидности нейтрофилов у кардиохирургических больных, оперированных в условиях искусственного кровообращения / В.В. Новицкий, С.П. Чумакова, В.М. Шипулин и др. // Вестник РАМН. – 2006. – № 6. – С. 13–18.
 22. Визир, В.А. Иммуновоспалительная активация как концептуальная модель формирования и прогрессирования сердечной недостаточности / В.А. Визир, А.Е. Березин // Терапевтический архив. – 2004. – Т. 72, № 4. – С. 77–80.
 23. Винницкий, Л.И. Иммунная терапия сепсиса – миф или реальность / Л.И. Винницкий, И.М. Витвицкая, О.Ю. Попов // Анестезиология и реаниматология. – 1997. – № 3. – С. 89–97.
 24. Владимиров, Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах / Ю.А. Владимиров // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – № 6. – С. 13–19.
 25. Влияние агрегации эритроцитов на выраженность внутрисосудистого гемолиза при операциях в условиях искусственного кровообращения / И.В. Мальцева, О.И. Уразова, В.В. Новицкий. и др. // Гематология и трансфузиология. – 2011. – № 6. – С. 28–32.
 26. Влияние адреналина на репарационные процессы в эритроцитах / В.И. Циркин, А.В. Крысова, А.А. Куншин и др. // Материалы IV Всероссийской конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» (с международным участием). – М., 2009. – С. 568.
 27. Влияние инфузионных сред на морфологию эритроцитов человека / О.О. Бурова, А.А. Гусев, С.С. Петриков и др. // Анестезиология и реаниматология. – 2006. – № 4. – С. 85–88.
 28. Влияние повышенной Ca^{2+} -зависимой калиевой проницаемости на деформируемость эритроцитов / О.А. Трубачева, Е.В. Шахристова, А.И. Галич, И.В. Петрова // Вестник Томского государственного педагогического университета. – 2011. – № 5. – С. 69–72.
 29. Влияние полиморфизмов генов эндотелиальной NO-синтазы и NADPH-оксидазы на развитие осложнений артериальной гипертензии / Т.Ю. Кузнецова,

- Д.В. Гаврилов, И.П. Дуданов и др. // Кардиология. – 2008. – Т. 48, № 3. – С. 27–43.
30. Влияние различных коллоидных плазмазаменителей на микрореологические свойства крови / Л.В. Герасимов, В.В. Мороз, А.А. Исакова, Ю.В. Марченков // Материалы 11 Съезда Федерации анестезиологов-реаниматологов России. – СПб., 2008. – С. 511–512.
31. Волков, А.М. Морфофункциональная характеристика специфических гранул сосудистого эндотелия в норме и в аспекте ишемического и реперфузионного повреждения миокарда / А.М. Волков, Г.М. Казанская, Т.М. Дьяконца и др. // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2002. – № 3. – С. 51–57.
32. Волков, В.И. Провоспалительные цитокины и растворимые внутриклеточные молекулы адгезии в ишемической болезни сердца / В.И. Волков // Кардиология. – 2002. – Т. 42, № 9. – С. 12–16.
33. Воробьев, А.И. Руководство по гематологии: в 3 т. Т. 1 / под ред. А.И. Воробьева. – М.: Ньюдиамед, 2002. – 280 с.
34. Вторичная профилактика ССЗ: кардиопротективная медикаментозная терапия // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2011. – Т. 10, N 6. – Прил. 2. Кардиоваскулярная терапия и профилактика: национальные рекомендации. – С. 54–58.
35. Ганиткевич, Я.В. Методика определения механической резистентности эритроцитов / Я.В. Ганиткевич, Л.И. Черненко // Лабораторное дело. – 1978. – № 2. – С. 116–117.
36. Гемореологические расстройства после операций на аорте и способы их коррекции / Ю.А. Морозов, А.В. Гончарова, Ю.В. Белов и др. // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2007. – № 4. – С. 25–30.
37. Гемореологический профиль больных раком желудка и его изменение под влиянием химиотерапии / А.В. Муравьев, С.В. Чопорв, Е.В. Ройтман, Л.А. Маймистова // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2006. – № 1. – С. 50–55.
38. Генетический полиморфизм при ишемической болезни сердца / А.А. Зайкина, Г.А. Савинецкая, Д.В. Герок и др. // Кардиология. – 2008. – Т. 48, № 1. – С. 62–65.

39. Геннис, Р. Биомембраны: Молекулярная структура и функции / Р.М. Геннис. – Мир, 1997. – 624 с.
40. Геометрия прегемолитических пойкилоцитов в стандартных центрифугатах крови на предметных стеклах / В.М. Погорелов, Л.С. Краснова, М.И. Чаниева и др. // Гематология и трансфузиология. – 2008. – Т. 53, № 6. – С. 22–26.
41. Гильдебрант, Е. Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов / под ред. Е. Гильдебрант. – Красноярск: Красноярский рабочий, 1961. – 314 с.
42. Глушков, В.С. Запрограммированная гибель эритроцитов (эриптоз) / В.С. Глушков, С.А. Сторожок // Вестник Уральской медицинской академии наук. – 2009. – № 2. – С. 99.
43. Гольдберг, Е.Д. Механизмы локальной регуляции кроветворения / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, Е.Ю. Шерстобоев. – Томск: STT, 2000. – 148 с.
44. Давыдкин, И.Л. Коррекция триметазидином окислительного стресса в крови больных постинфарктным кардиосклерозом / И.Л. Давыдкин, В.Н. Фаттенков // Казанский медицинский журнал. – 2001. – Т. 82, № 5. – С. 344–347.
45. Данные коронароангиографии и реологические свойства эритроцитов при остром коронарном синдроме без подъема сегмента ST / И.Е. Ганелина, В.И. Родионова, Л.Н. Катюхин, Д.В. Тепляков // Кардиология. – 2011. – Т. 51, № 4. – С. 4–9.
46. Дементьева, И.И. Интраоперационное повышение концентрации свободного гемоглобина в плазме крови (гемолиз) в кардиохирургии / И.И. Дементьева, Ю.А. Морозов, М.А. Чарная // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2008. – № 6. – С. 60–63.
47. Дементьева, И.И. Патофизиологические аспекты развития циркуляторной гипоксии при искусственном кровообращении / И.И. Дементьева // Анестезиология и реаниматология. – 1995. – №2. – С. 19–23.
48. Драбкина, Т.М. Никотиновый холинорецептор, ацетилхолинэстераза и Na^+, K^+ -АТФаза / Т.М. Драбкина, И.И. Кривой // Цитология. 2004. – Т. 46. № 2. – С. 89–105.
49. Дубинина, Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состоянии окислительного стресса / Е.Е. Дубинина // Вопросы современной химии. – 2001. – Т. 47, № 6. – С. 561–581.

50. Дуткевич, И.Г. Тактика экстренной диагностики и лечения гемолитических гемотрансфузионных осложнений / И.Г. Дуткевич // Вестник хирургии. – 2007. – Т. 166, № 6. – С. 77-80.
51. Дыгай, А.М. Теория регуляции кроветворения / А.М. Дыгай, В.В. Жданов. – М.: изд-во РАМН. – 2012. – 140 с.
52. Егорова, Е.Н. Активность факторов системного воспаления на разных стадиях хронической сердечной недостаточности / Е.Н. Егорова // Цитокины и воспаление. – 2012. – Т. 11. №1. – С. 70-72.
53. Ермоленко, В.М. Уремия и эритропоэтин / В.М. Ермоленко, М.А. Иващенко. – М., 2000. – 104 с.
54. Захарова, Н.Б. Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках Силуфол / Н.Б. Захарова, В.И. Рубин // Лабораторное дело. – 1980. – № 12. – С. 735–738.
55. Зенков, Н.К. Окислительный стресс: биологические и патофизиологические аспекты / Н.К. Зенков, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньшиков. – М: Маик «Наука/Интерпериодика», 2001. – 343 с.
56. Значение активации тромбоцитов и изменений эритроцитов в возникновении тромботических и реологических нарушений / Т.Е. Широкова, Л.И. Бурачковская, А.Б. Сумароков и др. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2007. – № 5. – С. 18–24.
57. Изменение реологических свойств крови и осмотической резистентности эритроцитов при активации свободнорадикальных процессов / Е.В. Ройтман, И.И. Дементьева, О.А. Азизова и др. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 3. – С. 42–43.
58. Исследование влияния на кровь *in vitro* образцов модифицированного полотна для имплантатов / Н.Н. Самсонова, Д.Ш. Самуилова, Л.Г. Климович и др. // Материалы III Всероссийской конференции «Клиническая гемостазиология и гемореология в сердечно-сосудистой хирургии» (с международным участием). М., 2007. – С. 215.
59. Казеннов, А.М. Исследование активности Na^+/K^+ -АТФазы в эритроцитах млекопитающих / Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. // Биохимия. – 1984. – Т. 49. № 7. – С. 1089–1094.

60. Как регулируется объём эритроцита, или что могут и чего не могут математические модели в биологии / Ф.И. Атауллаханов, Н.О. Корунова, И.С. Спиридонова и др. // Биологические мембраны. – 2009. – Т. 26, № 3. – Р. 163–179.
61. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике / В.С. Камышников. – Минск: Беларусь, 2000. – Т. 2. – 496 с.
62. Кармен, Н.Б. Влияние клонидина на структурное состояние мембран эритроцитов / Н.Б. Кармен // Вестник интенсивной терапии. – 2004. – № 3. – С. 31–35.
63. Карпов, Ю.А. Атеросклероз и факторы воспаления: нелипидные механизмы действия статинов / Ю.А. Карпов, Е.В. Сорокин // Российский медицинский журнал. – 2001. – Т. 9, № 10. – С. 396–400.
64. Кленова, Н.А. Биохимические механизмы дезинтеграции эритроцитов человека в различных условиях функционирования: автореф. дис. ...канд. мед. наук / Н.А. Кленова. – Тюмень, 2003. – 36 с.
65. Кленова, Н.А. Дезинтеграционные процессы в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца до и после аортокоронарного шунтирования и возможности их коррекции триметазидином / Н.А. Кленова, О.В. Фатенков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 6. – С. 32–34.
66. Климов, А.Н. К 100-летию создания холестериновой модели атеросклероза / А.Н. Климов, Н.С. Парфенова, Ю.П. Голиков // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 58, № 1. – С. 5–11.
67. Климов, А.Н. Кажущаяся и действительная атерогенность иммунных комплексов ЛПНП-IGG в плазме крови и артериальной стенке / А.Н. Климов, А.Д. Денисенко // Вестник РАМН. – 2007. – № 7. – С. 3–6.
68. Клиническая диагностика ишемической дисфункции при минимально инвазивной реваскуляризации миокарда / А.Т. Тепляков, С.Е. Мамчур, Ю.Ю. Вечерский, Ш.Д. Ахмедов. – Томск : Изд-во Том. ун-та, 2003. – 236 с.
69. Клинический патоморфоз эритроцита: атлас / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая и др. – Томск; М.: Изд-во Том. ун-та; ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 208 с.

70. Коваленко, О.А. Современные тенденции артериальной реваскуляризации миокарда / О.А. Коваленко, А.К. Ирасханов // Бюллетень НЦССХ им. Бакулева РАМН. – 2012. – Т. 13, № 2. – С. 18–26.
71. Коваль, Г.С. Морфофункциональная характеристика распределения эритроцитов на различных уровнях артериального русла / Г.С. Коваль, М.А. Медведев, Н.В. Рзануева // VI Сибирский физиологический съезд: тезисы докладов. – Барнаул, 2008. – С. 94–95.
72. Коновалова, Т.Т. Роль липидов в структурно-функциональной организации клеточных мембран при атерогенезе и их коррекция у больных ишемической болезнью сердца (сообщение 2) / Т.Т. Коновалова, И.П. Смирнова // Сибирский медицинский журнал. – Иркутск, 2005. – Т. 55, № 6. – С. 8–14.
73. Кононенко, В.А. Фликкер эритроцитов. Результаты экспериментальных исследований / В.А. Кононенко // Биологические мембраны. – 2009. – Т. 26, № 5. – С. 352–369.
74. Крабач, Т. Основы кардиохирургии: проект в рамках сотрудничества ВГМА им. Н.Н. Бурденко и Н.Н. Бурденко / Т. Крабач, Р. Хетцер. – 2005. – <http://www.dhzb.ru/lecture/finalVorlesung1-GrundlagenUndKoronarchirurgierus.pdf>
75. Крылов, В.Н. Изменение электрофоретической подвижности эритроцитов и липидного спектра их мембран при различных стрессовых воздействиях / В.Н. Крылов, А.В. Дерюгина, А.А. Гришина // Гематология и трансфузиология. – 2010. – Т. 55, № 3. – С. 40–43.
76. Кублинская, М.М. Изменения структуры мембран эритроцитов при физиологическом старении и болезни Альцгеймера: автореф. дис. ...канд. мед. наук / М.М. Кублинская. – Томск, 2002. – 30 с.
77. Кузник, Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии: монография / Б.И. Кузник. – Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 832 с.
78. Кузьменко, Д.И. Свободнорадикальное окисление липидов, активные формы кислорода и антиоксиданты: роль в физиологии и патологии клетки / Д.И. Кузьменко, В.Ю. Серебров, С.Н. Удинцев. – Томск: Изд-во Томского политехнического университета, 2007. – 214 с.

79. Кутько, И.И. Показатели энергетического метаболизма и уровень «средних молекул» у больных параноидальной шизофренией с наличием терапевтической резистентности при лечении rispипептом и галавитом / И.И. Кутько, В.М. Фролов, Г.С. Рачкаускас // Журнал психиатрии и медицинской психологии. – 2008. – Т. 18, № 1. – С. 3–9.
80. Лабораторная диагностика анемий / В.В. Долгов, С.А. Луговская, В.Т. Морозова и др. – Тверь: Губернская медицина, 2001. – 88 с.
81. Лабораторная диагностика анемий. Эритроцитозы // Современные технологии лабораторной медицины / Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.Б. Жукова и др. – Томск : Печатная мануфактура, 2008. – С. 38–114.
82. Лагутина, А.А. Состояние клеточных мембран при сахарном диабете и его изменение под воздействием гипербарического кислорода / А. А. Лагутина, А. А. Беляевский, С. А. Беляевский // Анестезиология и реаниматология. – 2004. – № 3. – С. 57–58.
83. Лакомая, Ю.А. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа при старении эритроцитов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Ю.А. Лакомая. – Тюмень, 2006 – 25 с.
84. Ланкин, В.З. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: pro et contra / В.З. Ланкин, А.К. Тихадзе, Ю.Н. Беленков // Кардиология. – 2004. – № 2. – С. 72–81.
85. Левтов, В.А. Реология крови / В.А. Левтов, С.А. Регирер, Н.Х. Шадрина. – М.: Медицина, 1982. – 272 с.
86. Липидный состав и активность Na^+, K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов у пациентов с сахарным диабетом 2 типа при дислипотеинемиях / Е.Б. Кравец, Е.А. Степовая, Т.Ю. Кошевец и др. // Сахарный диабет. – 2010. – № 1. – С. 41–44.
87. Лутай, М.И. Атеросклероз: современный взгляд на патогенез / М.И. Лутай // Украинский кардиологический журнал. – 2004. – № 1. – С. 22–34.
88. Льюис, С.М. Практическая и лабораторная гематология / С.М. Льюис, Б. Бэйн, И. Быйтс – ГОЭТАР-Медиа, 2009. – 670 с.
89. Лякишев, А.А. Оптимальная медикаментозная терапия в сочетании с чрескожным коронарным вмешательством или без него у больных со стабильной ишемической болезнью сердца / А.А. Лякишев // Кардиология. –

2007. – Т. 47, № 5. – С. 91–92.

90. Малоинвазивное коронарное шунтирование без применения искусственного кровообращения / Т.С. Арзикулов, И.В. Жбанов, А.Г. Кротовский и др. // Вестник РАМН. – 2003. – № 3. – С. 24–27.
91. Марков, Х.М. Оксид азота и атеросклероз. Оксид азота, дисфункция сосудистого эндотелия и патогенез атеросклероза / Х.М. Марков // Кардиология. – 2009. – Т. 49, № 11. – С. 64–74.
92. Мартинович, Г.Г. Количественная характеристика окислительно-восстановительного статуса эритроцитов / Г.Г. Мартинович, И.В. Мартинович, С.Н. Черенкевич // Биофизика. – 2008. – Т. 53, № 4. – С. 618–623.
93. Маслов, Л.Н. Реваскуляризация миокарда у больных ишемической болезнью сердца. Опыт применения стентов, содержащих Сиролимус / Л.Н. Маслов // Кардиология. – 2007. – Т. 47, № 4. – С. 83–89.
94. Медведева, И.В. Анализ липидного спектра плазмы и основных параметров клеточных мембран эритроцитов у больных с метаболическим синдромом и ишемической болезнью сердца / И.В. Медведева, Е.Ф. Дороднева, Т.А. Пугачева // Клиническая медицина. – 2002. – № 5. – С. 27–30.
95. Меньшиков, В.В. Справочник Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков. – М.: Медицина, 1987. – 241 с.
96. Меньшугин, И.Н. Искусственное кровообращение у детей в условиях ганглионарной блокады и пульсирующего потока / И.Н. Меньшугин. – СПб.: Специальная медицина, 1998. – 304 с.
97. Метаболические эффекты мексидола при кардиохирургических операциях с искусственным кровообращением / Р.Н. Короткина, А.Н. Коростелев, А.В. Ситников и др. // Анестезиология и реаниматология. – 2005. – № 3. – С. 21–23.
98. Метаболический синдром / А.М. Шилов, А.Ш. Авшалумов, Е.Н. Синицина и др. // Русский медицинский журнал. – 2008. – Т. 16, № 4. – С. 200–204.
99. Метелица, В.И. Реваскуляризация миокарда и медикаментозное лечение ишемической болезни сердца / В.И. Метелица, Р.Г. Оганов // Терапевтический архив. – 2000. – № 3. – С. 41–46.
100. Метод определения активности каталазы / М.А. Королук, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова, В.Е. Токарев // Лабораторное дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.

101. Механизмы регуляции эритропоэза при гемолитической анемии / Г.Н. Зюзьков, Е.В. Абрамова, А.М. Дыгай, Е.Д. Гольдберг // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. – Т. 138, № 10. – С. 378–381.
102. Михайлович, В.А. Проницаемость эритроцитарных мембран и сорбционная способность эритроцитов – оптимальные критерии тяжести эндогенной интоксикации / В.А. Михайлович, В.Е. Марусанов, А.Б. Бичун // Анестезиология и реаниматология. – 1993. – № 5. – С. 66–69.
103. Молекулярные нарушения мембраны эритроцитов при патологии разного генеза являются типовой реакцией организма: контуры проблемы / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2006. – № 2. – С. 62–70.
104. Морозова, В.Т. Эритроциты: структура, функции, клинко-диагностическое значение (лекция) / В.Т. Морозова, С.А. Луговская, М.Е. Почтарь // Клиническая лабораторная диагностика. – 2007. – №10. – С. 21–35.
105. Нагорнев, В.А. Клеточно-молекулярные механизмы развития атеросклероза / В.А. Нагорнев, П.В. Пигаревский // Медицинский академический журнал. – 2009. – Т. 9, № 4. – С. 9–14.
106. Науменко, В.Г. Клинический опыт применения пиоглитазона в лечении больных сахарным диабетом II типа / В.Г. Науменко // Новая медицина тысячелетия. – 2007. – № 2/3. – С. 21–24.
107. Неверов, И.В. Место антиоксидантов в комплексной терапии пожилых больных ИБС / И.В. Неверов // Русский медицинский журнал. – 2001. – Т. 9, № 18. – С. 12–16.
108. Никитин, К.Б. Температурный режим искусственного кровообращения: гипотермия или нормотермия? / К.Б. Никитин // Анестезиология и реаниматология. – 2003. – № 2. – С. 76–80.
109. Новиков, Н.М. Механизмы участия продуктов деструкции эритроцитов в регуляции эритропоэза при воздействии на организм экстремальных факторов: дис. ... д-ра мед. наук / Н.М. Новиков. – Барнаул, 1986. – 281 с.
110. Новицкий, В.В. Физиология и патофизиология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2004. – 202 с.

111. Оганов, Р.Г. Демографические тенденции в Российской Федерации: вклад болезней системы кровообращения / Р.Г. Оганов, Г.Я. Масленникова // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2012. – Т. 11, № 1. – С. 5–10.
112. Оганов, Р.Г. Современные стратегии профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний / Р.Г. Оганов, Г.В. Погосова // Кардиология. – 2007. – Т. 47, № 12. – С. 4–9.
113. Одинцов, Ю.Н. Биологические функции комплемента / Ю.Н. Одинцов, В.М. Перельмутер // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – № 2. – С. 72–82.
114. Оловникова, Н.И. Антигены эритроцитов человека / Н.И. Оловникова, Т.Л. Николаева // Гематология и трансфузиология. – 2001. – Т. 46, № 5. – С. 37–45.
115. Олофинская, И.Е. Операции на сердце с искусственным кровообращением у больных пожилого возраста: факторы риска, прогноз / И.Е. Олофинская // Кардиология. – 2008. – Т. 48, № 8. – С. 76–81.
116. Ольбинская, Л.И. Современные аспекты фармакотерапии ишемической болезни сердца / Л.И. Ольбинская, Т.Е. Морозова // Лечащий врач. – 2003. – № 6. – С. 14–19.
117. Ослякова, А.О. Состояние микроциркуляторного русла и гемореологический статус в норме и при нарушениях коронарного кровообращения / А.О. Ослякова, И.А. Тихомирова // Ярославский педагогический вестник. Естественные науки. – 2012 – Т. 3, № 2. – С. 103–108.
118. Основы клинической гематологии: справочное пособие / С.Ю. Ермолов, Ф.В. Курдыбайло, В.Г. Радченко, О.А. Рукавицын; под ред. В.Г. Радченко. – СПб.: Диалект, 2003. – 301 с.
119. Особенности структурных параметров эритроцитов при атомно-силовой микроскопии у пациентов с механической желтухой / Н.В. Завада, В.Е. Борисенко, В.В. Груша, А.Л. Соловей // Медицина. – 2008. – Т. 61, № 2. – С. 35–43.
120. Особенности формирования окислительного стресса в крови больных постинфарктным кардиосклерозом при операциях аортокоронарного шунтирования / И.Л. Давыдкин, В.Н. Фатенков, С.М. Хохлунов и др. // Вестник хирургии. – 2002. – Т. 161, № 1. – С. 16–18.

121. Оценка цитокинового ответа у пациентов с ИБС, псориазом и их сочетанием / Л.В. Егоренкова, А.П. Баранов, А.Г. Бузин, И.М. Корсунская // Российский кардиологический журнал. – 2005. – № 2. – С. 83–84.
122. Партигулова, А.С. Воспаление при атеросклерозе: роль ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и ее блокады / А.С. Партигулова, В.Г. Наумов // Кардиология. – 2010. – Т. 50, № 10. – С. 50–55.
123. Пасечник, И.Н. Механизмы повреждающего действия активированных форм кислорода на биологические структуры у больных в критических состояниях / И.Н. Пасечник // Вестник интенсивной терапии. – 2004. – № 3. – С. 27–31.
124. Патогенез, клиника и диагностика коронарного синдрома / Я.К. Рустамова, М.Н. Алехин, Б.А. Сидоренко и др. // Кардиология. – 2008. – Т. 48, № 11. – С. 73–75.
125. Патология эритроцита при экзогенной интоксикации / И.А. Шперлинг, Н.В. Рязанцева, В.В. Новицкий, О.А. Жаткин. – Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. – 122 с.
126. Первый опыт использования ротационной коронарной атерэктомии у пациентов, перенесших инфаркт миокарда / А.В. Ардашев, А.А. Шаваров, М.С. Рыбаченко, А.В. Конев // Кардиология. – 2008. – Т. 48, № 8. – С. 16–19.
127. Перспективы использования в клинической практике бензидинового метода определения свободного гемоглобина в крови / В.И. Козловский, А.В. Акуленок, П.П. Быковский, С.В. Николайкин // Вестник ВГМУ. – 2009. – Т. 8, № 3. – С. 1–14.
128. Пестун, А.Ф. Микрофльтрация крови / А.Ф. Пестун, Н.А. Русанова, Ю.С. Суханов // Вестник службы крови России. – 2001. – № 4. – С. 43–46.
129. Петрова, И.В. Роль оксида азота в регуляции Ca^{2+} -зависимой K^{+} -проницаемости мембраны эритроцитов человека / И.В. Петрова, О.А. Трубачева, С.В. Гусакова // Вестник Томского государственного университета. – 2011. – № 346. – С. 165–168.
130. Петрова, И.В. Функционирование и регуляция Ca^{2+} -активируемых калиевых каналов эритроцитов: дис. ... д-ра биол. наук / И.В. Петрова – Томск, 1999. – 181 с.

131. Пигаревский, П.В. Иммунокомпетентная система, атеросклероз и персистирующая инфекция (обзор) / П.В. Пигаревский, С.В. Мальцева, В.Г. Селиверстова // Вестник РАМН. – 2005. – № 2. – С. 17-22.
132. Подкаменный, В.А. Коронарное шунтирование на работающем сердце из минидоступа (Medcab) в лечении больных ишемической болезнью сердца / В.А. Подкаменный. – Иркутск, 2006. – 200 с.
133. Полиорганная недостаточность как проявление иммунной дисрегуляции репаративных процессов в органах при критических состояниях / Н.А. Онищенко, В.С. Сускова, А.Б. Цыпин и др. // Анестезиология и реаниматология. – 2001. – № 3. – С. 54–58.
134. Послеоперационные неврологические нарушения I типа у пациентов после коронарного шунтирования / Л.С. Барбараш, О.Л. Барбараш, Е.С. Малышенко и др. // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 4, № 5. – С. 14–17.
135. Применение лазерной интерференционной микроскопии для оценки формы и состояния эритроцитов / А.И. Юсипович, Н.Ю. Брызгалова, Е.Ю. Паршина и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 3. – С. 357–360.
136. Применение лазерной интерференционной микроскопии для оценки формы и состояния эритроцитов / А.И. Юсипович, Н.Ю. Брызгалова, Е.Ю. Паршина и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145, № 3. – С. 357–360.)
137. Прокопчук, В.С. Унитарная теория атеросклероза / В.С. Прокопчук // Украинский медицинский журнал. – 2002. – № 3. – С. 84–88.
138. Прохорова, М.И. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. М.И. Прохоровой. – Л.: Изд-во ЛГУ. – 1982. – 272 с.
139. Разработка и внедрение новых технологий в кардиологическую и кардиохирургическую практику / Р.С. Карпов, С.В. Попов, В.М. Шипулин, Ю.Б. Лишманов // Вестник РАМН. – 2003. – № 11. – С. 31–34.
140. Ранняя реакция эритроцита на экстремальные воздействия – образование условно-полиморфных форм и изменение их флуоресценции / В.Н. Кидалов,

- Н.А. Красильникова, Н.И. Сясин и др. // Вестник новых медицинских технологий. – 2002. – Т. 9, № 3. – С. 19.
141. Реваскуляризация миокарда без искусственного кровообращения / Б.В. Шабалкин, И.Б. Жбанов, Т.С. Арзикулов и др. // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 2001. – № 6. – С. 35–40.
142. Редчиц, Е.Г. Участие полиморфноядерных лейкоцитов в патогенезе ишемической болезни сердца / Е.Г. Редчиц // Кардиология. – 1989. – Т. 29, № 11. – С. 115–120.
143. Ройт, А. Иммунология: пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
144. Ройтман, Е.В. Биореология. Клиническая гемореология. Основные понятия, Показатели, оборудование (лекция) / Е.В. Ройтман // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 5. – С. 25–32.
145. Ройтман, Е.В. Клиническая гемореология / Е.В. Ройтман // Тромбоз, гемостаз, реология. – 2003. – №3. – С. 13–27.
146. Роль дисфункции эндотелия в патогенезе атеросклероза / Е.Н. Воробьева, Г.И. Шумахер, И.В. Осипова и др. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2006. – Т. 5, № 6. – С. 129–136.
147. Роль ожирения в развитии осложнений ближайшего послеоперационного периода у больных ишемической болезнью сердца, направляемых на коронарное шунтирование / И.Ю. Сигаев, М.А. Какителашвили, В.Ю. Мерзляков, И.В. Ключников // Анналы хирургии. – 2008. – № 5. – С. 14–18.
148. Роль оксидантного стресса в развитии и прогрессировании коронарного атеросклероза / О.А. Азизова, Л. Гао, А.Ш. Думикян, А.Л. Сыркин // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 4, № 4. – С. 19–25.
149. Роль протеинкиназ мембраны эритроцитов в изменениях их деформируемости и агрегации / А.В. Муравьев, А.А. Маймистова, И.А. Тихомирова и др. // Физиология человека. – 2012. – Т. 38, № 2. – С. 94.
150. Руководство по гематологии: в 3 т. Т. 3 / под ред. А.И. Воробьева – 3-е изд., перераб. и дополн. – М.: Ньюдиамед, 2005. – 416 с.
151. Руководство по кардиологии / Н.А. Манак, В.М. Альхимович, В.Н. Гайдук и др. – Мн.: Беларусь, 2003. – 624 с.

152. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca^{2+} -индуцированных изменений мембранного потенциала / С.Н. Орлов, И.В. Петрова, Н.И. Покудин и др. // Биологические мембраны. – 1992. – Т. 9, № 9. – С. 885–903.
153. Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации Ca^{2+} -индуцированных изменений мембранного потенциала / Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И. и др. // Биологические мембраны. – 1992. – Т. 9, № 9. – С. 885–903.
154. Санников, А.Г. Закономерности изменения уровня аденозинтрифосфата в эритроцитах в процессе их упругой деформации: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.Г. Санников. – Тюмень, 1999. – 24 с.
155. Свирко, Ю.С. Патофизиологические аспекты применения кровесберегающих методик у кардиохирургических пациентов с ишемической болезнью сердца: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / Ю.С. Свирко. – 2008 – 43 с.
156. Северин, С.Е. Практикум по биохимии / С.Е. Северин, Г.А. Соловьева. – М.: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
157. Секреты кардиохирургии: пер. с англ. / П.Р. Солтоски, Х.Л. Караманукян, Т.А. Салерно; под общ. ред. Р.С. Акчурина, В.Н. Хирманова. – М.: МЕДпресс-информ, 2005. – 328 с.
158. Селезнев, А.В. Взаимосвязь антигенах, биомеханических и реологических свойств эритроцитов / А.В. Селезнев // Проблемы патологии системы гемостаза: сб. науч. тр. – Барнаул, 2007. – С. 196–198.
159. Семенов, В.Л. Метод определения антиокислительной активности биологического материала / В.Л. Семенов, А.М. Ярош // Украинский биохимический журнал. – 1985. – Т. 57, № 3. – С. 50–52.
160. Сирота, Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутаза / Т.В. Сирота // Вопросы медицинской химии. – 1999. – Т. 45, вып. 3. – С. 263–272.
161. Снегирева, Л.В. Реологические свойства эритроцитов в их онтогенезе / Л.В. Снегирева, В.П. Иванов // Курский научно-практический вестник “Человек и здоровье”. – 2007. – № 1. – С. 35–44.

162. Солоха, Л.Н. Характеристика мембранных изменений в эритроцитах у лиц с высоким риском ишемической болезни сердца / Л.Н. Солоха, А.А. Пушников // Медицинская наука и образование Урала. – 2007. – № 6. – С. 47–52.
163. Соляник, Е.В. Современные технологии оценки качества терапии сердечно-сосудистых заболеваний (обзор литературы) / Е.В. Соляник // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2011. – Т. 4, № 6. – С. 26–30.
164. Состояние иммунной системы у кардиохирургических больных при искусственном кровообращении / В.И. Шумаков, В.С. Сускова, Л.П. Ермакова и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2003. – № 3. – С. 41–45.
165. Состояние эритронов у больных хронической почечной недостаточностью / О.Н. Ветчинникова, И.А. Василенко, Л.И. Юновидова и др. // Нефрология и диализ. – 2005. – Т. 7, № 4. – С. 448–453.
166. Сравнение отдаленных результатов эндоваскулярного лечения и коронарного шунтирования в течение 5 лет наблюдения / В.Г. Сейидов, А.Я. Фисун, В.В. Евсюков и др. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2006. – Т. 6, № 3. – С. 44–49.
167. Стандартизация оценки интраоперационного гемолиза при кардиохирургических вмешательствах в условиях искусственного кровообращения / И.И. Дементьева, Ю.А. Морозов, М.А. Чарная и др. // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2010. – № 4. – С. 75–78.
168. Сторожок, С.А. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства / С.А. Сторожок, А.Г. Санников, Ю.М. Захаров. – Тюмень: Изд-во Тюменского ун-та, 1997. – 140 с.
169. Структурно-функциональная характеристика эритроцитов у больных стенокардией на фоне различных схем медикаментозной терапии стенокардии / М.В. Березин, А. В. Козин, Ю.В. Довгалюк и др. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2006. – Т. 5, № 6. – Прил. – С. 45.
170. Структурные свойства эритроцитов и функциональная активность / С.Г. Резван, В.В. Гусинская, В.Г. Артюхов и др. // Вестник ВГУ. – 2000. – Т. 2, № 4. – С. 130–135.

171. Стрюк, Р.И. Адренореактивность и сердечно-сосудистая система / Р.И. Стрюк, И.Г. Длусская. – М.: Медицина, 2004. – 160 с.
172. Суханова, Г.А. Биохимия клетки / Г.А. Суханова, В.Ю. Серебров. – Томск: Чародей, 2000. – 184 с.
173. Сцинтиграфическая оценка изменений миокардиального и церебрального кровотока у пациентов, перенесших операцию коронарного шунтирования / Ж.В. Веснина, Н.Ю. Ефимова, Б.Н. Козлов и др. // Ангиология и сосудистая хирургия. – 2004. – Т. 10, № 1. – С. 35–43.)
174. Титов, В.Н. Регуляция перекисного окисления *in vivo* как этап воспаления. Олеиновая кислота, захватчики активных форм кислорода и антиоксиданты / В.Н. Титов, Д.М. Лисицын // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 3–12.
175. Титов, В.Н. Атеросклероз – проблема общей биологии: нарушение биологических функций питания и эндоэкологии / В.Н. Титов // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 129, № 2. – С. 124–143.
176. Титов, В.Н. Синдром транслокации, липополисахариды бактерий, нарушение биологических реакций воспаления и артериального давления (лекция) / В.Н. Титов, С.Ф. Дугин // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 4. – С. 21–37.
177. Тихомирова, И.А. Роль экстрацеллюлярных, мембранных и внутриклеточных факторов в процессе агрегации эритроцитов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук / И.А. Тихомирова. – Ярославль, 2006. – 49 с.
178. Токарев, Ю.Н. Техническое руководство американской ассоциации банков крови: пер. с англ. / Ю.Н. Токарев. – Милан: Европейская школа трансфузионной медицины, 2000. – 1056 с.
179. Толстоухова, Н.В. Клинико-патогенетические аспекты нарушения реологических параметров эритроцитов у больных с хронической почечной недостаточностью: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н.В. Толстоухова. – Тюмень. – 2009 – 24 с.
180. Турбасова, Н.В. Частота фенотипов групп крови системы АВ0 и RHESUS среди больных, имеющих некоторые патологии сосудистой системы / Н.В.

- Турбасова, М.В. Плотникова, С.А. Ильдебенева // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2009. – № 2. – С. 108–109.
181. Улитко, М.В. Роль моноцитов-макрофагов в адаптивных реакциях кроветворной ткани при действии на организм экстремальных факторов: автореф.... канд. биол. наук. / М.В. Улитко. – Екатеринбург, 2008. – 24 с.
182. Уразова, О.И. Лабораторная диагностика гематологических синдромов и болезней / О.И. Уразова, В.В. Новицкий. – Томск: Изд-во «Печатная мануфактура», 2008. – 98 с.
183. Уранов, В.Н. Вчера и сегодня ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента: эналаприл остается в ряду препаратов сравнения и выбора / В.Н. Уранов // Справочник поликлинического врача. – 2010. – № 3. – С. 17–24.
184. Фильтрационное исследование деформируемости эритроцитов / И.Л. Лисовская, В.М. Витвицкий, Ф.И. Атауллаханов и др. // Гематология и трансфузиология. – 1993. – Т. 38, № 2. – С. 12–15.
185. Финдлей, Дж.Б. Биологические мембраны. Методы: пер. с англ. / Дж.Б. Финдлей, У.Г. Эванз / под ред. Дж.Б. Финдлей, У.Г. Эванз. – М.: Мир, 1990. – 424 с.
186. Харченко, Е.П. Сердечная недостаточность: патогенетический континуум и биомаркеры / Е.П. Харченко // Кардиология. – 2012. – № 3. – С. 53–64.
187. Хирургическое лечение ишемической болезни сердца: современное состояние проблемы / Ю.Л. Шевченко, И.А. Борисов, Л.В. Попов и др. // Качество жизни. Медицина. – 2003. – № 2. – С. 25–27.
188. Хрипун, А.В. Особенности течения послеоперационного периода у больных ишемической болезнью сердца, перенесших различные операции по восстановлению коронарного кровотока / А.В. Хрипун, А.А. Дюжиков, С.В. Шлык // Российский кардиологический журнал. – 2004. – Т. 45, № 1. – С. 5–7.
189. Чанг, Н.Т. Исследование структурного состояния мембран эритроцитов больных ишемической болезнью сердца старших возрастов / Н.Т. Чанг // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2. – С. 97–103.
190. Чарная, М.А. Искусственная гипокоагуляция при кардиохирургических операциях и ее мониторинг / М.А. Чарная, Ю.А. Морозов, В.Г. Гладышева // Анестезиология и реаниматология. – 2006. – № 6. – С. 76–79.

191. Чумакова, С.П. Реактивность нейтрофильных гранулоцитов при искусственном кровообращении: дис. ... канд. мед. наук / С.П. Чумакова. – Томск, 2006. – 198 с.
192. Шаталов, А.Е. Кардиоплегия на основе крови. Современное состояние и перспективы развития / А.Е. Шаталов, Ю.А. Шнайдер // Вестник хирургии. – 2004. – Т. 163, № 5. – С. 128–131.
193. Шевченко, Н.М. Кардиология / Н.М. Шевченко. – М.: МИА, 2004. – 540 с.
194. Шевченко, О.Г. Роль холестерина в структурной организации мембраны эритроцитов / О.Г. Шевченко // Вестник института биологии Научного центра Уральского отделения РАН. – 2010. – № 6. – С. 10–14.
195. Шилов, А.М. Артериальная гипертензия и реологические свойства крови / А.М. Шилов, М.В. Мельник. – Москва: БАРС, 2005. – 514 с.
196. Шипулин, В.М. Фундаментальные аспекты лечения сердечной недостаточности в кардиохирургии / под ред. В.М. Шипулина, Р.С. Карпова. – Томск: STT, 2009. – 262 с.
197. Шиффман, Ф.Дж. Патология крови: пер. с англ. / Ф.Дж. Шиффман. – М.; СПб.: БИНОМ; Невский Диалект, 2000. – 448 с.
198. Шляхто, Е.В. Клеточные и молекулярно-генетические аспекты эндотелиальной дисфункции / Е.В. Шляхто, О.А. Беркович, О.М. Моисеева // Вестник РАМН. – 2004. – № 10. – С. 50–52.
199. Шнайдер, Ю.А. Свободные артериальные трансплантаты в хирургии коронарных сосудов / Ю.А. Шнайдер, А.В. Красиков, Е.В. Немченко // Вестник хирургии. – 2004. – Т. 163, № 2. – С. 107–112.
200. Электрофоретическая подвижность эритроцитов как показатель оценки функциональной полноценности мембраны эритроцитов / Н.Ф. Пурло, О.В. Попова, Л.С. Бирюкова, А.Г. Козинец // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 1. – С. 40–44.
201. Энзиматическая активность эритроцитов человека при ишемической болезни сердца в условиях развития окислительного стресса / Н.М. Елкина, С.В. Коношенко, И. Шашуа, О.В. Жугина // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24, № 2. – С. 124–128.

202. Эритроциты и злокачественные новообразования / В.В. Новицкий, Е.А. Степовая, В.Е. Гольдберг и др. – Томск: Изд-во SST, 2000. – 288 с.
203. Юшков, Б.Г. Сосуды костного мозга и регуляция кроветворения / Б.Г. Юшков, В.Г. Климин, А.И. Кузьмин. – Екатеринбург: УрО РАН, 2004. – 149 с.
204. Яхно, Т.А. Агрегантное состояние и кооперативные реакции компонентов цельной крови в норме и патологии: автореф. дис. ...д-ра биол. наук / Т.А. Яхно. – Н. Новгород, 2011. – 317 с.
205. A closed perfusion system with heparin coating and centrifugal pump improves cardiopulmonary bypass biocompatibility in elderly patients / L. Lindholm, M. Westerberg, A. Bengtsson et al. // *Ann. Thorac. Surg.* – 2004. – Vol. 78, N 6. – P. 2131–2138.
206. A comparative study by a single chromatographic procedure of glycolytic regulatory kinase isozymes in rat erythroid cells as a function of differentiation-maturation process / P. Jimeno, J. Luque, A.I. García-Pérez, M. Pinilla // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1998. – Vol. 45, N. 6. – P. 1211–1225.
207. A comparison of hemolysis and red cell mechanical fragility in blood collected with different cell salvage suction devices / M.H. Yazer, J.H. Waters, K.R. Elkin et al. // *Transfusion.* – 2008. – Vol. 48. – P. 1188–1191.
208. A new extracorporeal vacuum-assisted device to optimize cardiopulmonary bypass. Comparison with the conventional system / G. Nasso, C. Costantini, A. Petralia et al. // *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.* – 2011. – Vol. 12, N 4. – P. 591–595.
209. A new sensitive assay reveals that hemoglobin is oxidatively modified in vivo / N.B. Vollaard, B.J. Reeder, J.P. hearman et al. // *Free Radic Biol. Med.* – 2005. – Vol. 39. – P. 1216–1228.
210. A role of EphB4 receptor and its ligand, ephrin-B2, in erythropoiesis / S. Suenobu, N. Takakura, T. Inada et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2002. – Vol. 293. – P. 1124–1131.
211. A synergistic effect of albumin and fibrinogen on immunoglobulin-induced red blood cell aggregation / R. Ben-Ami, G. Barhstein, T. Mardi et al. // *Am. J. Physiol.* – 2003. – Vol. 285. – P. 2663–2669.

212. ABO locus O1 allele and risk of myocardial infarction / N. von Beckerath, W. Koch, J. Mehilli et al. // *Blood Coagul. Fibrinolysis*. – 2004. – Vol. 15, N 1. – P. 61–67.
213. Activation of complement and leukocyte receptors during on- and off pump coronary artery bypass surgery / L. Wehlin, J. Vedin, J. Vaage, J. Lundahl // *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* – 2004. – Vol. 25. – P. 35–42.
214. Active or passive bio-coating: does it matters in extracorporeal circulation? / S. Jacobs, F. de Somer, G. Vandenplas et al. // *Perfusion*. – 2011. – Vol. 26, N 6. – P. 496–502.
215. Acute isovolemic hemodilution triggers proinflammatory and procoagulatory endothelial activation in vital organs: role of erythrocyte aggregation / A.M. Morariu, M.H. Maathuis, S.A. Asgeirsdottir et al. // *Microcirculation*. – 2006. – Vol. 13, N 5. – P. 397–409.
216. Acute kidney injury: a relevant complication after cardiac surgery / G. Mariscalco, R. Lorusso, C. Dominici et al. // *Ann. Thorac. Surg.* – 2011. – Vol. 92, N 4. – P. 1539–1547.
217. Acute renal failure after CPB is related to decreased serum ferritin levels / C. Davis, A. Kausz, R. Zager et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 1999. – Vol. 10, N 11. – P. 2396–2402.
218. Adherence to macrophages in erythroblastic islands enhances erythroblast proliferation and increases erythrocyte production by a different mechanism than erythropoietin / M.M. Rhodes, P. Kopsombut, M.C. Bondurant et al. // *Blood*. – 2008. – Vol. 111, N 3. – P. 1700–1708.
219. Age decline in the activity of the Ca^{2+} -sensitive K^{+} channel of human red blood cells / T. Tiffert, N. Daw, Z. Etzion et al. // *J. Gen. Physiol.* – 2007. – Vol. 129, N 5. – P. 429–436.
220. Alkhalil, A. Babesia and plasmodia increase host erythrocyte permeability through distinct mechanisms / A. Alkhalil, D.A. Hill, S.A. Desai // *Cell Microbiol.* – 2007. – Vol. 9, N 4. – P. 851–860.
221. All-trans Arachidonic acid generates reactive oxygen species via xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase interconversion in the rat liver cytosol in vitro / S.

- Sakuma, T. Kitamura, C. Kuroda et al. // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2012. – Vol. 51, N 1. – P. 55–60.
222. Alteration of intracellular secretory acute phase response proteins expressed in human hepatocyte induced by exposure with interleukin-6 / K. Nakata, R. Saitoh, J. Amano et al. // *Cytokine.* – 2012. – Vol. 59, N 2. – P. 317–323.
223. Altered phosphorylation of cytoskeleton proteins in sickle red blood cells: the role of protein kinase C, Rac GTPases, and reactive oxygen species / A. George, S. Pushkaran, L. Li et al. // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2010. – Vol. 45, N 1. – P. 41–45.
224. An, X. Disorders of red cell membrane / X. An, N. Mohandas // *Br. J. Haematol.* – 2008. – Vol. 141, N 3. – P. 367–375.
225. Analysis of red blood cell aggregation in cardio-pulmonary bypass (CPB) surgery / R. Graaff, Y.J. Gu, P.W. Boonstra et al. // *Int. J. Artif. Organs.* – 2004. – Vol. 27, N 6. – P. 488–494.
226. Angiogenesis is a link between atherosclerosis and tumorigenesis: role of LOX-1 / J. Jiang, M. Yan, J.L. Mehta, C. Hu // *Cardiovasc. Drugs Ther.* – 2011. – Vol. 25, N 5. – P. 461–468.
227. Anti-C1q autoantibodies specific against the globular domain of the C1qB-chain from patient with lupus nephritis inhibit C1q binding to IgG and CRP / M. Radanova, V. Vasilev, B. Deliyska et al. // *Immunobiology.* – 2012. – Vol. 217, N 7. – P. 684–691.
228. Antioxidants and atherosclerotic heart disease / M.N. Diaz, B. Frei, J.A. Vita et al. // *New Engl. J. Med.* – 1997. – Vol. 337, N 6. – P. 408–416.
229. Araneda, O.F. Lung oxidative damage by hypoxia [Electronic resource] / O.F. Araneda, M. Tuesta // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2012. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966417>
230. Arginine therapy: a new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? / C.R. Morris, S.M. Morris, W. Hagar et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2003. – Vol. 168. – P. 63–69.
231. Arrebola-Moreno, A. Treatment strategies for chronic stable angina / A. Arrebola-Moreno, J. Dangu, J.C. Kaski // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2011. – Vol. 12, N 18. – P. 2833–2844.

232. Asha Devi, S. Peroxyl-induced oxidative stress in aging erythrocytes of rat / S. Asha Devi, C.S. Shiva Shankar Reddy, M.V. Subramanyam // *Biogerontology*. – 2011. – Vol. 12, N 4. – P. 283–292.
233. Association between high-dose erythropoiesis-stimulating agents, inflammatory biomarkers, and soluble erythropoietin receptors / J.K. Inrig, S.K. Bryskin, U.D. Patel et al. // *BMC Nephrol*. – 2011. – Vol. 12. – P. 67.
234. Atherosclerosis and infection: is the jury still not in? / D. Chatzidimitriou, D. Kirmizis, E. Gavrilaki et al. // *Microbiol*. – 2012. – Vol. 7 – P. 1217–1230.
235. Atherosclerosis: immunopathogenesis and immunotherapy / R. Ohashi, H. Mu, Q. Yao, C. Chen // *Med. Sci. Monit*. – 2004. – Vol. 10, N 11. – P. 255–260.
236. ATP-dependent mechanics of red blood cells / T. Betz, M. Lenz, J.F. Joanny, C. Sykes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2009. – Vol. 106, N 36. – P. 15320–15325.
237. Banz, Y. Role of complement and perspectives for intervention in ischemia-reperfusion damage / Y. Banz, R. Rieben // *Ann. Med*. – 2012. – Vol. 44, N 3. – P. 205–217.
238. Barvitenko, N.N. Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance / N.N. Barvitenko, N.C. Adragna, R.E. Weber // *Cell Physiol. Biochem*. – 2005. – Vol. 15, N 1-4. – P. 1–18.
239. Benefits of off-pump coronary artery bypass grafting in high-risk patients / A. Marui, H. Okabayashi, T. Komiya et al. // *Circulation*. – 2012. – Vol. 126, N 11. – P. 151–157.
240. Bhattacharya, A. Red blood cell mechanics / A. Bhattacharya // *J. Indian Med. Assoc*. – 2011. – Vol. 109, N 9. – P. 668–682.
241. Binding sites of leukocyte beta 2 integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein / P. Hermant, M. Huet, I. Callebaut et al. // *J. Biol. Chem*. – 2000. – Vol. 275, N 34. – P. 26002–26010.
242. Biochemical evaluation of vacuum-assisted venous drainage: A randomized, prospective study / S. Bevilacqua, S. Matteucci, M. Ferrarini et al. // *Perfusion*. – 2002. – Vol. 17, N 1. – P. 57–61.
243. Biocompatibility of poly2methoxyethylacrylate coating for cardiopulmonary bypass / M. Noguchi, K. Eishi, S. Tada et al. // *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg*. – 2003. – Vol. 9, N 1. – P. 22–28.

244. Biomolecular transport through hemofiltration membranes / A.T. Conlisk, S. Datta, W.H. Fissell, S. Roy // *Ann. Biomed. Eng.* – 2009. – Vol. 37, N 4. – P.722–736.
245. Blood pump: patent WO2010013355, IPC A61M1/10; F04D13/02; F04D5/00; A61M1/10; F04D13/02;F04D5/00 / IMED JAPAN INC [JP]; NEMOTO ISAO [JP]; ABE YUSUKE [JP]. WO2008JP64313 20080808, publication date 04.02.2010.
246. Bolisetty, S. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology / S. Bolisetty, E.A. Jaimes // *Int. J. Mol. Sci.* – 2013. – Vol. 14, N 3. – P. 6306–6344.
247. Bryan, N.S. Pharmacological therapies, lifestyle choices and nitric oxide deficiency: A perfect storm / N.S. Bryan // *Pharmacol. Res.* – 2012. – Vol. 66, N 6. – P. 448–456.
248. Bunn, H.F. Erythropoietin [Electronic resource] / H.F. Bunn // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2013. – Vol. 3, N 3. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23457296>
249. Burton, N.M. Modelling the structure of the red cell membrane / N.M. Burton, L.J. Bruce // *Biochem. Cell Biol.* – 2011. – Vol. 89, N 2. – P. 200–215.
250. Buttarello, M. Automated blood cell counts: state of the art / M. Buttarello, M. Pleban // *Hematopathology.* – 2008. – Vol. 130, N 1. – P. 104–116.
251. Cai, Z. Protein oxidative modifications: beneficial roles in disease and health / Z. Cai, L.J. Yan // *J. Biochem. Pharmacol. Res.* – 2013. – Vol. 1, N 1. – P. 15–26.
252. Canonne, J. Phospholipases in action during plant defense signaling / J. Canonne, S. Froidure-Nicolas, S. Rivas // *Plant Signal Behav.* – 2011. – Vol. 6, N 1. – P. 13–18.
253. Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction [Electronic resource] / M. Neri, V. Fineschi, M. Di Paolo et al. // *Curr. Vasc. Pharmacol.* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23628007>
254. Cardiopulmonary bypass, hemolysis and nitroprusside-induced cyanide production / A. Cheung, G. Cruz-Schiavone, Q. Meng et al. // *Anesth. Analg.* – 2007. – Vol. 105, N 1. – P. 29–33.
255. Cardiopulmonary bypass-associated acute kidney injury: A pigment nephropathy? / M. Haase, A. Haase-Fielitz, S.M. Bagshaw et al. // *Contrib. Nephrol.* – 2007. – Vol. 156. – P.340–353.

256. Cardiovascular surgery and organ damage: Time to reconsider the role of hemolysis / I.C. Vermeulen-Windsant, J.S. Hanssen, W.A. Buurman, M.J. Jacobs // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 2011. – Vol. 142, N 1. – P. 1–11.
257. Carter, K. Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases / K. Carter, M. Worwood // Intern. J. Labor. Hematol. – 2007. – Vol. 29. – P. 92–110.
258. Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3) / D. Mandal, V. Baudin-Creuzat, A. Bhattacharyya et al. // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278, N 52. – P. 52551–52558.
259. CD163-expressing monocytes constitute an endotoxin-sensitive Hb clearance compartment within the vascular system / C.A. Schaer, F. Valleron, A. Imhof et al. // J. Leukoc. Biol. – 2007. – Vol. 82, N 1. – P. 106–110.
260. CD55 deficiency protects against atherosclerosis in ApoE-deficient mice via C3a modulation of lipid metabolism / R.D. Lewis, M.J. Perry, I.A. Guschina et al. // Am. J. Pathol. – 2011. – Vol. 179, N 4. – P. 1601–1607.
261. CD55 deficiency protects against atherosclerosis in ApoE-deficient mice via C3a modulation of lipid metabolism / R.D. Lewis, M.J. Perry, I.A. Guschina et al. // Am. J. Pathol. – 2011. – Vol. 179, N 4. – P. 1601–1607.
262. Cell respiration and formation of reactive oxygen species: facts and artefacts / H. Nohl, A.V. Kozlov, L. Gille, K. Staniek // Biochem. Soc. Trans. – 2003. – Vol. 31, N 6. – P. 1308–1311.
263. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease / C.D. Reiter, X. Wang, J.E. Tanus-Santos et al. // Nat. Med. – 2002. – Vol. 8. – P. 1383–1389.
264. Ceramide in suicidal death of erythrocytes / F. Lang, E. Gulbins, P.A. Lang et al. // Cell Physiol. Biochem. – 2010. – Vol. 26, N 1. – P. 21–28.
265. C-FLIP is involved in erythropoietin-mediated protection of erythroid-differentiated cells from TNF-alpha-induced apoptosis / D. Vittori, D. Vota, M. Callero et al. // Cell Biol. Int. – 2010. – Vol. 34, N. 6. – P. 621–630.
266. Chakrabarti, A. Spectrin organization and dynamics: new insights / A. Chakrabarti, D.A. Kelkar, A. Chattopadhyay // Biosci. Rep. – 2006. – Vol. 26, N 6. – P. 369–386.

267. Chang, Y.T. Seeking for a way to revive erythropoietin production in chronic kidney disease [Electronic resource] / Y.T. Chang, S.Y. Pan, S.L. Lin // J. Formos. Med. Assoc. – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669141>
268. Changes in red cell deformability associated with anaesthesia and cardiopulmonary bypass in open-heart surgery / T. Hirayama, H. Yamaguchi, M. Allers et al. // Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg. – 1985. – Vol. 19, N 3. – P. 257–262.
269. Changes of antioxidant enzyme activities during cardiopulmonary bypass / M. Inal, O. Alataş, G. Kanbak et al. // Cardiovasc. Surg. (Torino). – 1999. – Vol. 40, N 3. – P. 373–376.
270. Characteristics of the complement system gene expression deficiency in patients with symptomatic pulmonary embolism [Electronic resource] / W. Lv, L. Wang, Q. Duan et al. // Thromb. Res. – 2013. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23726092>
271. Chlamydia pneumoniae induces aponecrosis in human aortic smooth muscle cells / C. Dumrese, C. Maurus, D. Gygi et al. // BMC Microbiology. – 2005. – Vol. 5, N 2. – P. 543–549.
272. Cholesterol interactions with phospholipids in membranes / H. Ohvo-Rekilä, B. Ramstedt, P. Leppimäki, J.P. Slotte // Progress in lipid research. – 2004. – Vol. 41, N 1. – P. 66–97.
273. Chowdhry, V. Perioperative challenges in a patient of severe G6PD deficiency undergoing open heart surgery / V. Chowdhry, S. Bisoyi, B. Mishra // Ann Card Anaesth. – 2012. – Vol. 15, N 1. – P. 50–53.
274. Chu, S.H. Cardiac surgery in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria / S.H. Chu, D. Andrews, Y. Watanabe // Asian Cardiovasc Thorac Ann. – 2011. – Vol. 19, N 1. – P. 61–63.
275. Clinical performance and biocompatibility of hyaluronan-based heparin-bonded extracorporeal circuits in different risk cohorts / S. Gunaydin, K. McCusker, T. Sari et al. // Interact Cardiovasc. Thorac. Surg. – 2010. – Vol. 10, N 3. – P. 371–376.
276. Coating of human decay accelerating factor (hDAF) onto medical devices to improve biocompatibility / N.J. Watkins, P. Braidley, C.J. Bray et al. // Immunopharmacology. – 1997. – Vol. 38, N 1-2. – P. 111–118.

277. Comparison of hydroxyl radical generation in patients undergoing coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass / M. Osaka, K. Aoyagi, A. Hirakawa et al. // *Free Radic. Res.* – 2006. – Vol. 40, N 2. – P. 127–133.
278. Complement factor I is upregulated in rat hepatocytes by interleukin-6 but not by interferon-gamma, interleukin-1beta, or tumor necrosis factor-alpha / G. Schlaf, T. Demberg, M. Koleva et al. // *Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 382, N 7. – P. 1089–1094.
279. Complement receptor 1 inhibitors for prevention of immune-mediated red cell destruction: potential use in transfusion therapy / K. Yazdanbakhsh, S. Kang, D. Tamasauskas et al. // *Blood.* – 2003. – Vol. 101, N 12. – P. 5046–5052.
280. Complement regulator CD59 protects against atherosclerosis by restricting the formation of complement membrane attack complex / G. Wu, W. Hu, A. Shahsafaei et al. // *Circulation research.* – 2009. – Vol. 104, N 4. – P. 550–558.
281. Concentration of interleukins, interferon and C-reactive protein in stabile and unstable angina pectoris / H. Yamashita, K. Shimada, E. Seki et al. // *Am. J. Cardiol.* – 2003. – Vol. 91, N. 2. – P. 133–136.
282. Connolly, M. Key advances in clinical cardiology / M. Connolly, I.B. Menown // *Adv. Ther.* – 2013. – Vol. 30, N 4. – P. 369–386.
283. Constitutive phosphorylation of GATA-1 at Serine(26) attenuates the colony-forming activity of erythrocyte-committed progenitors [Electronic resource] / K.R. Lin, C.L. Li, J.J. Yen, H.F. Yang-Yen // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, N 5. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717580>
284. Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle / M. Cabel, H.J. Meiselman, A.S. Popel, P.C. Johnson // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 272, N 2. – P. 1020–1032.
285. Controlled oxygen reperfusion protects the lung against early ischemia-reperfusion injury in cardiopulmonary bypasses by downregulating high mobility group box 1 / J. Rong, S. Ye, Z.K. Wu et al. // *Exp. Lung. Res.* – 2012. – Vol. 38, N 4. – P. 183–191.
286. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients / J. Kotur-Stevuljevic, L. Memon, A. Stefanovic et al. // *Clin. Biochem.* – 2007. – Vol. 40, N 3-4. – P. 181–187.

287. Curello, S. Oxidative stress during reperfusion of human hearts: potential sources of oxygen free radicals / S. Curello, C. Ceconi, F. de Guili // *Cardiovascular Res.* – 1995. – Vol. 29, N 1. – P. 118–125.
288. Cytokine network and T cell immunity in atherosclerosis / H. Ait-Oufella, S. Taleb, Z. Mallat, A. Tedgui // *Semin. Immunopathol.* – 2009. – Vol. 31, N 1. – P. 23–33.
289. Cytokine-induced oxidative stress in cardiac inflammation and heart failure-how the ubiquitin proteasome system targets this vicious cycle [Electronic resource] / A. Voigt, A. Rahnefeld, P.M. Kloetzel, E. Krüger // *Front Physiol.* – 2013. – Vol. 4. – P. 42. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508734>
290. D609 inhibits progression of preexisting atheroma and promotes lesion stability in apolipoprotein e^{-/-} mice: A role of phosphatidylcholine-specific phospholipase in atherosclerosis / L. Zhang, J. Zhao, L. Su, B. Huang et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2010. – Vol. 30. – P. 411–418.
291. Daniels, G. Functional aspects of red cell antigens / G. Daniels // *Blood Rev.* – 1999. – Vol. 13, N. 1. – P. 14–35.
292. Decay-accelerating factor suppresses complement C3 activation and retards atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice / V.W. Leung, S. Yun, M. Botto et al. // *Am. J. Pathol.* – 2009. – Vol. 175, N 4. – P. 1757–1767.
293. Deformability and electrolyte changes of erythrocytes in connection with open heart surgery / T. Hirayama, H. Herlitz, O. Jonsson, D. Roberts // *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 1986. – Vol. 20, N 3. – P. 253–259.
294. Deformability of red blood cells and its relation to blood trauma in rotary blood pumps / N. Watanabe, D. Sakota, K. Ochuchi, S. Takatani // *Artif. Organs.* – 2007. – Vol. 31, N 5. – P. 352–358.
295. Degn, S.E. Humoral pattern-recognition and the complement system / S.E. Degn, S. Thiel // *Scand. J. Immunol.* – 2013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672641>
296. Deng, Y.K. Erythrocyte protective effects of ginatone in patients undergoing hypothermic cardiopulmonary bypass / Y.K. Deng, F. Wei, D.G. Zhang // *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* – 2010. – Vol. 30, N 4. – P. 365–368.
297. Development of a new hollow fiber silicone membrane oxygenator for ECMO: the recent progress / S. Kawahito, T. Motomura, J. Glueck, Y. Nose // *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2002. – Vol. 8, N 5. – P. 268–274.

298. Dicato, M. Anemia in cancer / M. Dicato, L. Plawny, M. Diederich // *Ann. Oncol.* 2009. – Vol. 21, N 7. – P. 159–161.
299. Differential erythropoietin action upon cells induced to eryptosis by different agents / D.M. Vota, R.E. Maltaner, S.D. Wenker et al. // *Cell Biochem. Biophys.* – 2013. – Vol. 65, N 2. – P. 145–157.
300. Diminished expression of complement regulatory proteins on peripheral blood cells from systemic lupus erythematosus patients [Electronic resource] / A.P. Alegretti, L. Schneider, A.K. Piccoli et al. // *Clin. Dev. Immunol.* – 2012. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=411.%09Diminished+expression+of+complement+regulatory+proteins+on+peripheral+blood+cells+from+systemic+lupus+erythematosus+patients>
301. Does a hyperoncotic cardiopulmonary bypass prime affect extravascular lung water and cardiopulmonary function in patients undergoing coronary artery bypass surgery? / G.P. Eising, M. Niemer, T. Gunther et al. // *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* – 2001. – Vol. 20, N 2. – P. 282–289.
302. Dyslipidemia in youth with diabetes: to treat or not to treat? / D.M. Maahs, R.P. Wadwa, F. Bishop et al. // *J. Pediatr.* – 2008. – Vol. 153, N 4. – P. 458–465.
303. Early prediction of capillary leak syndrome in infants after cardiopulmonary bypass [Electronic resource] / R. Kubicki, J. Grohmann, M. Siepe et al. // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389476>
304. Effect of alpha-alpha diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) on the potency of sodium nitroprusside and nitroglycerine to decrease blood pressure in rats: a dose-response study / S.M. Erhart, D.J. Cole, P.M. Patel et al. // *Artif. Cells. Blood. Substit. Immobil. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 28, N 5. – P. 385–396.
305. Effect of deformability difference between two erythrocytes on their aggregation [Electronic resource] / M. Ju, S.S. Ye, H.T. Low et al. // *Phys. Biol.* – 2013. – Vol. 10, N 3. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23574688>
306. Effect of fluvastatin extended release on the protein-lipid structure of erythrocyte membrane and C-reactive protein in patients with hyperlipidemia / M. Broncel, M. Balcerak, D. Cieślak et al. // *Pol. Merk. Lekarski.* – 2007. – Vol. 22, N 128. – P. 107–111.

307. Effect of long term bed rest in men on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes / W. Pawlak, J. Kedziora, K. Zolynski et al. // *J. Gravit. Physiol.* – 1998. – Vol. 5, N 1. – P. 163–164.
308. Effect of oxidation of polyunsaturated phospholipids on the binding of proteins in monolayers / E. Boisselier, P. Calvez, E. Demers et al. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2013. – Vol. 109. – P. 109–114.
309. Effect of oxidative stress and erythropoietin on cytoskeletal protein and lipid organization in human erythrocytes / T.D. Choudhury, N. Das, A. Chattopadhyay, A.G. Datta // *Pol. J. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 51, N 4. – P. 341–350.
310. Effect of pericardial blood processing on postoperative inflammation and the complement pathways / B. Marcheix, M. Carrier, C. Martel et al. // *Ann. Thorac. Surg.* – 2008. – Vol. 85, N 2. – P. 530–535.
311. Effects of centrifugal and roller pumps on survival of autologous red cells in cardiopulmonary bypass surgery / R. Valeri, H. McGregor, G. Ragno et al. // *Perfusion.* – 2006. – Vol. 21. – P. 291.
312. Effects of cholesterol on physical properties of human erythrocyte membranes: impact on susceptibility to hydrolysis by secretory phospholipase A2 / A.L. Heiner, E. Gibbons, J.L. Fairbourn et al. // *Biophys. J.* – 2008. – Vol. 94, N 8. – P. 3084–3093.
313. Effects of S-nitrosation and cross-linking of hemoglobin on hypoxic pulmonary vasoconstriction in isolated rat lungs / S. Deem, J.U. Kim, B.N. Manjula et al. // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 91. – P. 626–632.
314. Effects of turbulent stresses upon mechanical hemolysis: Experimental and computational analysis / M. Kameneva, G. Burgreen, K. Kono et al. // *ASAIO J.* – 2004. – Vol. 50, N 5. – P. 418–423.
315. Elevated C1rC1sC1inh levels independently predict atherosclerotic coronary heart disease / Z. Horváth, D. Csuka, K. Vargova et al. // *Mol. Immunol.* – 2013. – Vol. 54, N 1. – P. 8–13.
316. Elevated plasma arginase-1 does not affect plasma arginine in patients undergoing liver resection / M.C. van de Poll, S.J. Hanssen, M. Berbee et al. // *Clin. Sci. (Lond).* 2008. – Vol. 114. – P. 231–241.

317. Elyassi, A.R. Perioperative management of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patient: A review of literature / A.R. Elyassi, H.H. Rowshan // *Anesth. Prog.* – 2009. – Vol. 56, N 3. – P. 86–91.
318. Endothelin receptor antagonism prevents hypoxia-induced mortality and morbidity in a mouse model of sickle-cell disease / N. Sabaa, L. de Franceschi, P. Bonnin et al. // *J. Clin. Invest.* – 2008. – Vol. 118, N 5. – P. 1924–1933.
319. Endotoxin in pooled pericardial blood contributes to the systemic inflammatory response during cardiac surgery / T. Spanier, K. Tector, G. Schwartz et al. // *Perfusion.* – 2000. – Vol. 15, N 5. – P. 427–431.
320. Erslev, A.J. Traumatic cardiac hemolytic anemia / A.J. Erslev // *Williams Hematology* / ed. E. Butler, M.A. Lichtman, B.S. Coler et al. – 6th ed. – Mc Graw Hill., 2001. – Chapter 50. – P. 619–621.
321. Eryptosis, a window to systemic disease / F. Lang, E. Gulbins, H. Lerche et al. // *Cell Physiol. Biochem.* – 2008. – Vol. 22, N 5-6. – P. 373–380.
322. Erythrocyte aggregation as a cause of slow flow in patients of acute coronary syndromes / Y. Arbel, S. Banai, J. Benhorin et al. // *Int. J. Cardiol.* – 2012. – Vol. 154, N 3. – P. 322–327.
323. Erythrocyte aggregation in patients with systemic lupus erythematosus / M.I. Spengler, M.J. Svetaz, M.B. Leroux et al. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2011. – Vol. 47, N 4. – P. 279–285.
324. Erythrocyte concentrations of adenosine triphosphate (ATP) and magnesium, before and after conservative therapy of lower extremities atherosclerosis / W. Drozd, T. Kedryna, B. Ostrowska et al. // *Pol. Merkur. Lekarski.* – 2004. – Vol. 16, N 94. – P. 332–336.
325. Erythrocyte deformability and oxidative stress in inflammatory bowel disease / T. Akman, M. Akarsu, H. Akpinar et al. // *Dig. Dis. Sci.* – 2012. – Vol. 57, N 2. – P. 458–464.
326. Erythrocyte membrane, plasma and atherosclerotic plaque lipid pattern in coronary heart disease / N.R. Lausada, S. Boullón, F. Boullón et al. // *Medicina (B Aires).* – 2007. – Vol. 67, N 5. – P. 451–457.

327. Erythrophagocytosis by angiogenic endothelial cells is enhanced by loss of erythrocyte deformability / M.H. Fens, G. Storm, R.C. Pelgrim et al. // *Exp. Hematol.* – 2010. – Vol. 38, N 4. – P. 282–291.
328. Erythropoietin, erythropoiesis and beyond / S. Chateauvieux, C. Grigorakaki, F. Morceau et al. // *Biochem Pharmacol.* – 2011. – Vol. 82, N. 10. – P. 1291–1303.
329. Erythrocyte disaggregation shear stress, sialic acid, and cell aging in humans / A.L. Hadengue, M. Del-Pino, A. Simon, J. Levenson // *Hypertension.* – 1998. – Vol. 32, N 2. – P. 324–330.
330. Evaluation of a new condensed extra-corporeal circuit for cardiac surgery: a prospectiverandomized clinical pilot study / E.J. Fransen, Y.M. Ganushchak, V. Vijay et al. // *Perfusion.* – 2005. – Vol. 20, N 2. – P. 91–99.
331. Evaluation of oxidative stress among coronary diabetics patients / A. Dandana, S. Ferchichi, F. Addad et al. // *Acta Biomed.* – 2011. – Vol. 82, N 3. – P. 187–196.
332. Everse, J. The toxicities of native and modified hemoglobins / J. Everse, N. Hsia // *Free Radic. Biol. Med.* – 1997. – Vol. 22. – P. 1075–1099.
333. Experimental investigation of pulsatility effect on the deformability and hemolysis of blood cells / Y.J. Kang, M.G. Kim, K.H. Son et al. // *J. Artif. Organs.* – 2010. – Vol. 34, N 4. – P. 103–109.
334. Expression of complement regulatory proteins CD55, CD59, CD35, and CD46 in rheumatoid arthritis / A.K. Piccoli, A.P. Alegretti, L. Schneider et al. // *Rev. Bras. Reumatol.* – 2011. – Vol. 51, N 5. – P. 503–510.
335. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes / D. Mandal, A. Mazumder, P. Das et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, N 47. – P. 39460–39467.
336. Flow and atherosclerosis in coronary bifurcations / G.D. Giannoglou, A.P. Antoniadis, K.C. Koskinas, Y.S. Chatzizisis // *EuroIntervention.* – 2010. – N 6. – P. 16–23.
337. Fogelstrand, P. Retention of atherogenic lipoproteins in the artery wall and its role in atherogenesis / P. Fogelstrand, J. Borén // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* – 2012. – Vol. 22, N 1. – P. 1–7.

338. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues / J. Folch, M. Lees, A.G. Sloane-Stanley // J. Biol. Chem. – 1957. – Vol. 226, N 1. – P. 497–509.
339. Föller, M. Erythrocyte programmed cell death / M. Föller, S.M. Huber, F. Lang // IUBMB Life. – 2008. – Vol. 60, N 10. – P. 661–668.
340. Fransen, E.J. Is postoperative blood loss, loss of blood? A pilot study in cardiac surgical patients / E.J. Fransen, D.S. de Jong, W.T. Hermens // Perfusion. – 2001. – Vol. 16, N. 4. – P. 301–308.
341. Frauenknecht, V. Complement – a phylogenetically old system as a new player in the development of atherosclerosis / V. Frauenknecht, V. Schroeder // Hamostaseologie. – 2012. – Vol. 32, N 4. – P. 276–285.
342. Functional significance of the intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel for the short-term survival of injured erythrocytes / M. Föller, D. Bobbala, S. Koka et al. // Pflugers Arch. – 2010. – Vol. 460, N 6. – P. 1029–1044.
343. Gasier, H.G. Oxidative stress, antioxidant defenses and nitric oxide production following hyperoxic exposures / H.G. Gasier, D.M. Fothergill // Undersea Hyperb. Med. – 2013. – Vol. 40, N 2. – P. 125–134.
344. Gerrah, R. Impaired oxygenation and increased hemolysis after cardiopulmonary bypass in patients with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency / R. Gerrah, Y. Shargal, A. Elami // Ann Thorac Surg. – 2003. – Vol. 76, N 2. – P. 523–527.
345. Glader, D. Destruction of erythrocytes / D. Glader // Wintrobe's Clinical Hematology / eds. J.P. Greer, J. Forster, J.N. Lukens et al. – 11th ed. – Lippincott Williams and Wilkins, 2004. – Chapter 9. – P. 249–265.
346. Gladwin, M.T. Storage lesion in banked blood due to hemolysis-dependent disruption of nitric oxide homeostasis / M.T. Gladwin, D.B. Kim-Shapiro // Curr. Opin. Hematol. – 2009. – Vol. 16. – P. 515–523.
347. Glovsky, M.M. Complement determinations in human disease / M.M. Glovsky, P.A. Ward, K.J. Johnson // Ann. Allergy Asthma Immunol. – 2004. – Vol. 93, N 6. – P. 513–522.
348. Glutathione-related antioxidant defense system in elderly patients treated for hypertension / J. Rybka, D. Kupczyk, K. Kędziora-Kornatowska et al. // Cardiovasc. Toxicol. – 2011. – Vol. 11, N 1. – P. 1–9.

349. Gould, G.W. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression / G.W. Gould, G.D. Holman // *Biochem. J.* – 1993. – Vol. 295, N 2. – P. 329–341.
350. Gov, N. Red blood cell shape and fluctuations: cytoskeleton confinement and ATP activity / Gov N., Safran S.A. // *J. Biol. Phys.* – 2005. – Vol. 31, N 3-4. – P. 453–464.
351. Grainger, D.J. Transforming growth factor β and atherosclerosis: so far, so good for the protective cytokine hypothesis / D.J. Grainger // *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology.* – 2004. – Vol. 24. – P. 399–404.
352. Griffiths, R.E. Normal prion protein trafficking in cultured human erythroblasts / R.E. Griffiths, K.J. Heesom, D.J. Anstee // *Blood.* – 2007. – Vol. 110, N 13. – P. 4518–4525.
353. Grundtman, C. The autoimmune concept of atherosclerosis / C. Grundtman, G. Wick // *Curr. Opin. Lipidol.* – 2011. – Vol. 22, N 5. – P. 327–334.
354. Haase, M. Cardiopulmonary bypass, hemolysis, free iron, acute kidney injury and the impact of bicarbonate / M. Haase, A. Haase-Fielitz, R. Bellomo // *Contrib. Nephrol.* – 2010. – Vol. 165. – P. 28–32.
355. Haemoglobin blocks von Willebrand factor proteolysis by ADAMTS-13: a mechanism associated with sickle cell disease / Z. Zhou, H. Han, M.A. Cruz et al. // *Thromb. Haemost.* – 2009. – Vol. 101, N 6. – P. 1070–1077.
356. Hamadmad, S.N. Erythropoietin receptor signal transduction requires protein geranylgeranylation / S.N. Hamadmad, M.K. Henry, R.J. Hohl // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – Vol. 316, N. 1. – P. 403–409.
357. Hamadmad, S.N. Lovastatin suppresses erythropoietin receptor surface expression through dual inhibition of glycosylation and geranylgeranylation / S.N. Hamadmad, R.J. Hohl // *Biochem. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 74, N 4. – P. 590–600.
358. Haptoglobin: basic and clinical aspects / A.P. Levy, R. Asleh, S. Blum et al. // *Antioxid. Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12, N 2. – P. 293–304.
359. Harmand, M.F. In vitro comparative evaluation under static conditions of the hemocompatibility of four types of tubing for cardiopulmonary bypass / M.F. Harmand, F. Briquet // *Biomaterials.* – 1999. – Vol. 20, N 17. – P. 1561–1571.

360. Hei, F. Plasma exchange during cardiopulmonary bypass in patients with severe hemolysis in cardiac surgery / F. Hei, S. Irou, J. Ma, C. Long // *ASAIO J.* – 2009. – Vol. 55, N 1. – P. 78–82.
361. Heme scavenging and the other facets of hemopexin / E. Tolosano, S. Fagoonee, N. Morello et al. // *Antioxid Redox Signal.* – 2010. – Vol. 12, N 2. – P. 305–320.
362. Hemodialysis-induced release of hemoglobin limits nitric oxide bioavailability and impairs vascular function / C. Meyer, C. Heiss, C. Drexhage et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2010. – Vol. 55, N 1. – P. 454–459.
363. Hemoglobin, erythropoietin and systemic inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease / D. Markoulaki, K. Kostikas, G. Papatheodorou et al. // *Eur. J. Intern. Med.* – 2011. – Vol. 22, N. 1. – P. 103–107.
364. Hemolysis due to active venous drainage during cardiopulmonary bypass: Comparison of two different techniques / S. Cirri, L. Negri, M. Babbini et al. // *Perfusion.* – 2001. – Vol. 16, N 4. – P. 313–318.
365. Hemolysis during CPB: An in vivo comparison of standard roller pumps, non-occlusive roller pumps and centrifugal pumps / S.D. Hansbro, A.C. Sharpe, R. Cathpole et al. // *Perfusion.* – 1999. – Vol. 14, N 1. – P. 3–10.
366. Hemolysis results in impaired intestinal microcirculation and intestinal epithelial cell injury / S.J. Hanssen, T. Lubbers, C.M. Hodin, et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2011. – Vol. 17, N 2. – P. 213–218.
367. Hemolytic characteristics of three commercially available centrifugal blood pumps / D.S. Lawson, R. Ing, I.M. Cheifetz et al. // *Pediatr. Crit. Care Med.* – 2005. – Vol. 6, N 5. – P. 573–577.
368. Heparin-enhanced plasma phospholipase A2 activity and prostacyclin synthesis in patients undergoing cardiac surgery / H. Nakamura, D.K. Kim, D.M. Philbin, M.B. Peterson // *J. Clin. Invest.* – 1995. – Vol. 95, N 3. – P. 1062–1070.
369. Hepatic acute phase proteins – regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF-κB-dependent signaling / J.G. Bode, U. Albrecht, D. Häussinger et al. // *Eur. J. Cell Biol.* – 2012. – Vol. 91, N. 6-7. – P. 496–505.

370. Horai, T. Coronary artery bypass grafting under cardiopulmonary bypass in a patient with beta-thalassemia: report of a case / T. Horai, K. Tanaka, M. Takeda // *Surg Today*. – 2006. – Vol. 36, N 6. – P. 538–540.
371. Hu, E.B. Effect of glutathione pretreatment on lung ischemia-reperfusion injury during cardiopulmonary bypass / E.B. Hu, H.H. Jiang // *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao*. – 2003. – Vol. 28, N 6. – P. 619–622.
372. Human babesiosis-recent discoveries / S. Mitrović, I. Kranjčić-Zec, V. Arsić-Arsenijević et al. // *Med. Pregl.* – 2004. – Vol. 57, N 7-8. – P. 349–353.
373. Hunfeld, K.P. Babesiosis: recent insights into an ancient disease / K.P. Hunfeld, A. Hildebrandt, J.S. Gray // *Int. J. Parasitol.* – 2008. – Vol. 38, N 11. – P. 1219–1237.
374. Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps / H. Chu, E. Puchulu-Campanella, J.A. Galan et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2012. — Vol. 109, N 31. – P. 12794–12799.
375. Identification of the haemoglobin scavenger receptor / M. Kristiansen, J.H. Graversen, C. Jacobsen et al. // *Nature*. – 2001. – Vol. 409. – P. 198–201.
376. IL-6 is an independent risk factor for resistance to erythropoiesis-stimulating agents in hemodialysis patients without iron deficiency / H.S. Won, H.G. Kim, Y.S. Yun et al. // *Hemodial. Int.* – 2012. – Vol. 16, N. 1. – P. 31–37.
377. Impaired erythrocyte antioxidant defense in active inflammatory bowel disease: impact of anemia and treatment / M. Krzystek-Korpacka, K. Neubauer, I. Berdowska et al. // *Inflamm. Bowel. Dis.* – 2010. – Vol. 16, N 9. – P. 1467–1475.
378. In vitro stimulation of oxidative stress by hypoxanthine in blood of rats: prevention by vitamins e plus C and allopurinol / A.C. Mesquita-Casagrande, M.N. Wamser, D.D. de Lima et al. // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. – 2013. – Vol. 32, N 1. – P. 42–57.
379. Increase in band 3 density and aggregation in hereditary spherocytosis / D. Reinhardt, O. Witt, N. Miosge et al. // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2001. – Vol. 27, N 2. – P. 399–406.
380. Increase in fragmented phosphatidylcholine in blood plasma by oxidative stress / B. Frey, R. Haupt, S. Alms et al. // *J. Lipid Res.* – 2000. – Vol. 41, N 7. – P. 1145–1153.

381. Increased oxidative damages of erythrocytes caused by declined blood oxygen saturation / Zhao Y., Lan K., Wang X. et al. // *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.* – 2012. – Vol. 29, N 2. – P. 323–327.
382. Independent and additive predictive value of total cholesterol content of erythrocyte membranes with regard to coronary artery disease clinical presentation / D.N. Tziakas, G.K. Chalikias, D. Stakos et al. // *Int. J. Cardiol.* – 2011. – Vol. 150, N 1. – P. 22–27.
383. Influence of mechanical cell salvage on red blood cell aggregation, deformability and 2,3-diphosphoglycerate in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass / Y.J. Gu, W.J. Vermeijden, A.J. de Vries et al. // *Ann. Thorac. Surg.* – 2008. – Vol. 86, N 5. – P. 1570–1575.
384. Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin / S. Myssina, S.M. Huber, C. Birka et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* – 2003. – Vol. 14, N 11. – P. 2750–2757.
385. Inhibition of intermediate-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel and cytoprotective properties of 4-piperidinomethyl-2-isopropyl-5-methylphenol / A.Y. Shen, J.H. Tsai, H.C. Teng et al. // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 59, N 5. – P. 679–685.
386. Insulin resistance, metabolic stress, and atherosclerosis / M. Pansuria, H. Xi, L. Li et al. // *Front Biosci.* – 2012. – Vol. 4. – P. 916–931.
387. Interaction between complement proteins C5b-7 and erythrocyte membrane sialic acid / P. Marshall, A. Hasegawa, E.A. Davidson, V. Nussenzweig // *J. Exp. Med.* – 1996. – Vol. 184, N 4. – P. 1225–1232.
388. Interleukin-8 is increased in the membrane of circulating erythrocytes in patients with cutecoronary syndrome / D.N. Tziakas, G.K. Chalikias, I.K. Tentis et al. // *Eur. Heart J.* – 2008. – Vol. 29, N 22. – P. 2713–2722.
389. Involvement of nitric oxide in human transient lower esophageal sphincter relaxations and esophageal primary peristalsis / D.P. Hirsch, R.H. Holloway, G.N. Tytgat, G.E. Boeckxstaens // *Gastroenterology.* – 1998. – Vol. 115. – P. 1374–1380.
390. Ipsaro, J.J. Structural basis for spectrin recognition by ankyrin / J.J. Ipsaro, A. Mondragón // *Blood.* – 2010. – Vol. 115, N 20. – P. 4093–4101.

391. Jeffers, A. Computation of plasma hemoglobin nitric oxide scavenging in haemolytic anaemias / A. Jeffers, M.T. Gladwin, D.B. Kim-Shapiro // *Free Radi. Biol. Med.* – 2006. – Vol. 41, N 3. – P. 1557–1565.
392. Jiang, H. Red blood cells (RBCs), epoxyeicosatrienoic acids (EETs) and adenosine triphosphate (ATP) / H. Jiang, G.D. Anderson, J.C. McGiff // *Pharmacol. Rep.* – 2010. – Vol. 62, N 3. – P. 468–474.
393. Jilani, K. Carmustine-induced phosphatidylserine translocation in the erythrocyte membrane / K. Jilani, F. Lang // *Toxins (Basel)*. – 2013. – Vol. 5, N 4. – P. 703–716.
394. Jones, S.P. Myocardial reperfusion injury: insights gained from gene-targeted mice / S.P. Jones, D.J. Lefer // *News in Physiological Sciences*. – 2000. – Vol. 15, N. 6. – P. 303–308.
395. Kaestner, L. Ion channels in the human red blood cell membrane: their further investigation and physiological relevance / L. Kaestner, I. Bernhardt // *Bioelectrochemistry*. – 2002. – Vol. 55, N 1-2. – P. 71–74.
396. Kai, O.K. The pathophysiology of malarial anaemia: where have all the red cells gone? / O.K. Kai, D.J. Roberts // *BMC Med.* – 2008. – Vol. 6, N 3. – P. 24.
397. Kamp, D. Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes / D. Kamp, T. Sieberg, C.W. Haest // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40, N 31. – P. 9438–9446.
398. Kato, G.J. Haptoglobin halts hemoglobin's havoc / Kato G.J. // *J. Clin. Invest.* – 2009. – Vol. 119, N 8. – P. 2140–2142.
399. Kato, G.J. Pleiotropic Effects of Intravascular Hemolysis on Vascular Homeostasis / G.J. Kato, J.G. Taylor // *Br. J. Haematol.* – 2010. – Vol. 148, N 5. – P. 690–701.
400. Keerthivasan, G. Erythroblast enucleation [Electronic resource] / G. Keerthivasan, A. Wickrema, J.D. Crispino // *Stem. Cells. Int.* – 2011. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22007239>
401. Kones, R. Primary prevention of coronary heart disease: integration of new data, evolving views, revised goals, and role of rosuvastatin in management. A comprehensive survey / R. Kones // *Drug. Des. Devel. Ther.* – 2011. – Vol. 5. – P. 325–380.
402. Koury, M.J. The molecular mechanisms of erythropoietin action / M.J. Koury, M.C.

- Bondurant // Eur J. Biochem. – 1992. – Vol. 210. – P. 649–663.
403. Kulbertus, H. Atherosclerosis: a complex disease / H. Kulbertus, P. Lancellotti // Rev. Med. Liege. – 2012. – Vol. 67, N 5-6. – P. 273–278.
 404. Kurlansky, P. Do octogenarians benefit from coronary artery bypass surgery: a question with a rapidly changing answer? / P. Kurlansky // Curr. Opin. Cardiol. – 2012. – Vol. 27, N 6. – P. 611–619.
 405. Lachmann, P.J. The control of homologous lysis / P.J. Lachmann // Immunol. Today. – 1991. – Vol. 12, N 9. – P. 312–315.
 406. Lang, E. Killing me softly - suicidal erythrocyte death / E. Lang, S.M. Qadri, F. Lang // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2012. – Vol. 44, N 8. – P. 1236–1243.
 407. Lang, F. Mechanisms and significance of eryptosis, the suicidal death of erythrocytes / F. Lang, S.M. Qadri // Blood Purif. – 2012. – Vol. 33, N 1-3. – P. 125–130.
 408. Lenox, L.E. BMP4 and Madh5 regulate the erythroid response to acute anemia / L.E. Lenox, J.M. Perry, R.F. Paulson // Blood. – 2005. – Vol. 105. – P. 2741–2748.
 409. Level of oxidative stress in the red blood cells of patients with liver cirrhosis / A. Geetha, M.D. Lakshmi Priya, S.A. Jeyachristy, R. Surendran // Indian J. Med. Res. – 2007. – Vol. 126, N 3. – P. 204–210.
 410. Levels of hematopoiesis inhibitor N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline partially explain the occurrence of anemia in heart failure / P. van der Meer, E. Lipsic, B.D. Westenbrink et al. // Circulation. – 2005. – Vol. 112, N. 12. – P. 1743–1747.
 411. Levy, J.H. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass / J.H. Levy, K.A. Tanaka // Ann. Thorac. Surg. – 2003. – Vol. 75, N 2 – P. 715–720.
 412. Lewalle, A. Axisymmetric optical-trap measurement of red blood cell membrane elasticity [Electronic resource] / A. Lewalle, K.H. Parker // J. Biomech. Eng. – 2011. – Vol. 133, N 1. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Lewalle+A.+2011>
 413. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis / P. Libby // Arterioscler Thromb. Vasc. Biol. – 2012. – Vol. 32, N 9. – P. 2045–2051.
 414. Ligation of complement receptor 1 increases erythrocyte membrane deformability / A.M. Glodek, R. Mirchev, D.E. Golan et al. // Blood. – 2010. – Vol. 116, N 26. – P. 6063–6071.

415. Lipid peroxidation and antioxidative protection in patients with coronary heart disease / O.L. Belaia, N.E. Artamoshina, V.I. Kalmykova et al. // Klin. Med. – 2009. – Vol. 87, N 5. – P. 21–24.
416. Liu, J.J. Membrane remodeling during reticulocyte maturation / J.J. Liu, X.A. Guo, N.M. Mohandas et al. // Blood. – 2010. – Vol. 115, N 10. – P. 2021–2027.
417. Liu, Y. Atherosclerosis, vascular aging and therapeutic strategies / Y. Liu, K.J. Chen // Chin J. Integr. Med. – 2012. – Vol. 18, N 2. – P. 83–87.
418. Lominadzea, D.D. Involvement of fibrinogen specific binding in erythrocyte aggregation / D.D. Lominadzea, W.L. Denamb // Blood. – 2002. – N 2. – P. 235–240.
419. Ludewig, B. The in and out of monocytes in atherosclerotic plaques : Balancing inflammation through migration / B. Ludewig, J.D. Laman // PNAS. – 2004. – Vol. 101, N 32. – P. 11529–11530.
420. Lundberg, J.O. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics / J.O. Lundberg, E. Weitzberg, M.T. Gladwin // Nat. Rev. Drug Discov. – 2008. – Vol. 7. – P. 156–167.
421. Lung dysfunction following cardiopulmonary bypass / E. Apostolakis, K.S. Filos, E. Koletsis, D. Dougenis // J. Card. Surg. – 2010. – Vol. 25, N 1. – P. 47–55.
422. Luo, J. Effect of aprotinin on the red cell immunity in cardiopulmonary bypass / J. Luo, Y. Huang, H. Lan // J Tongji Med Univ. – 1998. – Vol. 18, N 2. – P. 97–100.
423. Maas, A.H. Gender differences in coronary heart disease / A.H. Maas, Y.E. Appelman // Neth. Heart J. – 2010. – Vol. 18, N 12. – P. 598–603.
424. Macey, R.I. Erythrocyte membrane potentials determined by hydrogen ion distribution / R.I. Macey, J.C. Adorante, F.W. Orme // Biochim. Biophys. Acta. – 1978. – Vol. 512. – P. 284–295.
425. Mahajan, R.C. Anaemia & expression levels of CD35, CD55 & CD59 on red blood cells in *Plasmodium falciparum* malaria patients from India / R.C. Mahajan, K. Narain, J. Mahanta // Indian J. Med. Res. – 2011. – Vol. 133, N 6. – P. 662–664.
426. Maher, A.D. The Gárdos channel: a review of the Ca²⁺-activated K⁺ channel in human erythrocytes / A.D. Maher, P.W. Kuchel // Int. J. Biochem. Cell Biol. – 2003. – Vol. 35, N 8. – P. 1182–1197.
427. Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine

- dehydrogenase to xanthine oxidase / T. Nishino, K. Okamoto, B. T. Eger et al. // FEBS J. – 2008. – Vol. 275, N 13. – P. 3278–3289.
428. Martinet, W. Molecular and cellular mechanisms of macrophage survival in atherosclerosis / W. Martinet, D.M. Schrijvers, G.R. de Meyer // Basic Res. Cardiol. – 2012. – Vol. 107, N 6. – P. 297.
429. Mause, S.F. Intrusion through the fragile back door: immature plaque microvessels as entry portals for leukocytes and erythrocytes in atherosclerosis / S.F. Mause, C. Weber // J. Am. College Cardiol. – 2009. – Vol. 53, N 17. – P. 1528–1531.
430. Mechanisms of suicidal erythrocyte death / K.S. Lang, P.A. Lang, C. Bauer et al. // Cell Physiol. Biochem. – 2005. – Vol. 15, N 5. – P. 195–202.
431. Melatonin protects against lipid peroxidation and membrane rigidity in erythrocytes from patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery / J. Ochoa, M. Vilchez, M. Palacios et al. // J. Pineal. Res. – 2003. – Vol. 35, N 2. – P. 104–108.
432. Meningococcal surface fibrin (Msf) binds to activated vitronectin and inhibits the terminal complement pathway to increase serum resistance / N.J. Griffiths, D.J. Hill, E. Borodina et al. // Mol. Microbiol. – 2011. – Vol. 82, N 5. – P. 1129–1149.
433. Mennes, I. Sick cell anaemia and the consequences on the anaesthetic management of cardiac surgery / I. Mennes, M. Van de Velde, C. Missant // Acta Anaesthesiol Belg. – 2012. – Vol. 63, N 2. – P. 81–89.
434. MicroRNA-18a enhances the interleukin-6-mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes / M. Brock, M. Trenkmann, R.E. Gay et al. // J Biol Chem. – 2011. – Vol. 286, N 46. – P. 40142–40150.
435. Monoclonality of smooth muscle cells in human atherosclerosis / C.E. Murry, C.T. Gipaya, T. Bartosek et al. // Am J. Pathol. – 1997. – Vol. 151, N 3. – P. 697–705.
436. Morita, K. Surgical reoxygenation injury of the myocardium in cyanotic patients: clinical relevance and therapeutic strategies by normoxic management during cardiopulmonary bypass / K. Morita // Gen. Thorac. Cardiovasc Surg. – 2012. – Vol. 60, N 9. – P. 549–556.
437. Mullasari, A.S. Managing complications in acute myocardial infarction / A.S. Mullasari, P. Balaji, T. Khando // J. Assoc. Physicians India. – 2011. – Vol. 59. – P. 43–48.

438. Munnik, T. Plant phospholipid signaling: “in a nutshell” / T. Munnik, C. Testerink // *J. Lipid Res.* – 2009. – Vol. 50. – P. 260–265.
439. Muravyov, A. Role Ca(2+) in mechanisms of the red blood cells microrheological changes / A. Muravyov, I. Tikhomirova // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2012. – Vol. 740. – P. 1017–1038.
440. Muzyamba, M.C. Effect of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene on K⁺ transport in normal and sickle human red blood cells / M.C. Muzyamba, J.S. Gibson // *J Physiol.* – 2003. – Vol. 547, N 3. – P. 903–911.
441. Myocardial oxidative stress, and cell injury comparing three different techniques for coronary artery bypass grafting / W.J. van Boven, W.B. Gerritsen, A.H. Driessen et al. // *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* – 2008. – Vol. 34, N 5. – P. 969–975.
442. Myocardial protection of warm cardioplegic induction on the isolated perfused rat heart model / S. Li, J. Lin, E. Lenehan et al. // *J. Extra Corpor. Technol.* – 2004. – Vol. 36, N 1. – P. 58–65.
443. Nakamura, K. Time-related hemolysis in stored shed mediastinal blood after cardiopulmonary bypass / K. Nakamura, K. Kawahito // *J. Artif. Organs.* – 2011. – Vol. 14, N 3. – P. 264–267.
444. Needham, D. Elastic deformation and failure of lipid bilayer membranes containing cholesterol / D. Needham, R.S. Nunn // *Biophysik.* – 1990. – Vol. 58, N 4. – P. 997–1009.
445. Ney, P.A. Normal and disordered reticulocyte maturation / P.A. Ney // *Curr. Opin. Hematol.* – 2011. – Vol. 18, N 3. – P. 152–157.
446. Nigam, S. Phospholipase A(2)s and lipid peroxidation / S. Nigam, T. Schewe // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2000. – Vol. 1488, N 1-2. – P. 167–181.
447. Nitescu, N. Blood salvage with a continuous autotransfusion system compared with a haemofiltration system / N. Nitescu, A. Bengtsson, J.P. Bengtsson // *Perfusion.* – 2002. – Vol. 17, N 5. – P. 357–362.
448. Off-pump coronary artery bypass: techniques, pitfalls, and results [Electronic resource] / T. Tashiro, H. Wada, M. Nishimi, N. Minematsu // *Gen. Thorac. Cardiovasc. Surg.* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23775231>

449. Off-pump or on-pump coronary-artery bypass grafting at 30 days / A. Lamy, P.J. Devereaux, D. Prabhakaran // *N. Engl. J. Med.* – 2012. – Vol. 366, N 16. – P. 1489–1497.
450. Ogasawara, Y. Pyruvate kinase is protected by glutathione-dependent redox balance in human red blood cells exposed to reactive oxygen species / Y. Ogasawara, M. Funakoshi, K. Ishii // *Biol. Pharm. Bull.* – 2008. – Vol. 31, N 10. – P. 1875–1881.
451. On – pump beating heart versus off – pump coronary artery bypass surgery – evidence of pump – induced myocardial injury / A.J. Rastan, H.B. Bittner, J.F. Gummert et al. // *Eur. J. Cardio-Thoracic. Surg.* – 2005. – Vol. 27. – P. 1057–1064.
452. Oostendorp, M. Potassium but not lactate dehydrogenase elevation due to in vitro hemolysis is higher in capillary than in venous blood samples / M. Oostendorp, W.W. van Solinge, H. Kemperman // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2012. – Vol. 136. – P. 1262–1265.
453. Open structure of the Ca^{2+} gating ring in the high-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel / P. Yuan, M.D. Leonetti, Y. Hsiung, R. MacKinnon // *Nature.* – 2011. – Vol. 481, N 7379. – P. 94–97.
454. Outcome of myocardial revascularisation in Iceland / H. Sigurjonsson, S. Helgadottir, S.J. Oddsson et al. // *Laeknabladid.* – 2012. – Vol. 98, N 9. – P. 451–456.
455. Oxidative damages in erythrocytes of patients with metabolic syndrome / A. Ziobro, P. Duchnowicz, A. Mulik et al. // *Mol. Cell Biochem.* 2013. – Vol. 378, N 1-2. – P. 267–273.
456. Oxidative injury and antioxidants in coronary artery bypass graft surgery: off-pump CABG significantly reduces oxidative stress / A. Akila, B. D'souza, P. Vishwanath, V. D'souza // *Clin. Chim. Acta.* – 2007. – Vol. 375, N 1-2. – P. 147–152.
457. Oxidative injury in neonatal erythrocytes / S. Perrone, M.L. Tataranno, G. Stazzoni et al. // *J. Matern. Fetal Neonatal. Med.* – 2012. – Vol. 25, N 5. – P. 104–108.
458. Oxidative stress in atherosclerosis development: the central role of LDL and oxidative burst / I. Peluso, G. Morabito, L. Urban et al. // *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug. Targets.* – 2012. – Vol. 12, N 4. – P. 351–360.

459. Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart / M. Messarah, M. Saoudi, A. Boumendjel et al. // *Environ Toxicol. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 31, N 1. – P. 33–41.
460. Oxidative stress is evident in erythrocytes as well as plasma in patients undergoing heart surgery involving cardiopulmonary bypass / J.J. Ochoa, M.J. Vílchez, S. Ibáñez et al. // *Free Radic. Res.* – 2003. – Vol. 37, N 1. – P. 11–17.
461. Oxygen free radical generation during cardiac surgery induces lipid peroxidation and decreases blood cell rheology / A. Belboul, M. Krotkiewski, N. Al-Khaja et al. // *Vasc. Surg.* – 1993. – Vol. 214. – P. 288–292.
462. Oxygen-linked modulation of erythrocyte metabolism: state of the art / M. Castagnola, I. Messana, M.T. Sanna, B. Giardina // *Blood Transfus.* – 2010. – Vol. 8, N 3. – P. 53–58.
463. Palmitic acid induces the opening of a Ca²⁺-dependent pore in the plasma membrane of red blood cells: the possible role of the pore in erythrocyte lysis / K.N. Belosludtsev, A.S. Trudovishnikov, N.V. Belosludtseva et al. // *J. Membr. Biol.* – 2010. – Vol. 237, № 1. – P. 13–19.
464. Pan, S. Molecular mechanisms responsible for the atheroprotective effects of laminar shear stress / S. Pan // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2009. – Vol. 11, N 7. – P. 1669–1682.
465. Pangburn, M.K. Discrimination between host and pathogens by the complement system / M.K. Pangburn, V.P. Ferreira, C.D. Cortes // *Vaccine.* – 2008. – Vol. 26, N 8. – P. 15–21.
466. Paparella, D. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update / D. Paparella, T.M. Yau, E. Young // *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* – 2002. – Vol. 21, N 2. – P. 232–244.
467. Pasterkamp, G. Circulating cells: the biofactory for markers of atherosclerotic disease / Pasterkamp G., Daemen M. // *Eur. Heart J.* – 2008. – Vol. 29. – P. 2701–2702.
468. Pathophysiology of atherosclerosis: the role of inflammation. / D. Tousoulis, A.M. Kampoli, N. Papageorgiou et al. // *Curr. Pharm. Des.* – 2011. – Vol. 17, N 37. – P. 4089–4110.

469. Peng, X. Mammalian phospholipase D physiological and pathological roles / X. Peng, M.A. Frohman // *Acta Physiol. (Oxf)*. – 2012. – Vol. 204, N 2. – P. 219–226.
470. Pepys, M.B. C-reactive protein: a critical update / M.B. Pepys, G.M. Hirschfield // *J. Clin. Invest.* – 2003. – Vol. 111, N 12. – P. 1805–1812.
471. Pharmacodynamic analysis of changes in reticulocyte subtype distribution in phlebotomy-induced stresserythropoiesis / N.H. Al-Huniti, J.A. Widness, R.L. Schmidt, P. Veng-Pedersen // *J. Pharmacokinet. Pharmacodyn.* – 2005. – Vol. 26, N 3-4. – P. 359–376.
472. Phenotypic commitment of monocytes towards a protective hemoglobin scavenging phenotype (CD14(pos)CD163(high)HLA-DR(low)) following cardiopulmonary bypass / K.R. Quimby, A. Greenidge, A. Harris, R.C. Landis // *Cytometry B Clin. Cytom.* – 2010. – Vol. 78, N 5. – P. 357–360.
473. Phospholipases of mineralization competent cells and matrix vesicles: roles in physiological and pathological mineralizations / S. Mebarek, A. Abousalham, D. Magne et al. // *Int J Mol Sci.* – 2013. – Vol. 14, N 3. – P. 5036–5129.
474. Phosphorylcholine coating of bypass systems used for young infants does not attenuate the inflammatory response / A.M. Draaisma, M.G. Hazekamp, N. Anes et al. // *Ann. Thorac Surg.* – 2006. – Vol. 81, N 4. – P. 1455–1459.
475. Phosphorylcholine coating offers natural platelet preservation during cardiopulmonary bypass / S.F. De, B.Y. Van, F. Caes et al. // *Perfusion.* – 2002. – Vol. 17, N 1. – P. 39–44.
476. Physicochemical modifications induced by statins therapy on human erythrocytes membranes / M. Broncel, A. Bala, M. Koter-Michalak et al. // *Wiad Lek.* – 2007. – Vol. 60, N 7-8. – P. 321–328.
477. Physiological roles of the intermediate conductance, Ca^{2+} -activated potassium channel Kcnn4 / T. Begenesich, T. Nakamoto, C.T. Ovitt et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 12. – P. 681–687.
478. Physiologically aged red blood cells undergo erythrophagocytosis in vivo but not in vitro / Y. Gottlieb, O. Topaz, L.A. Cohen et al. // *Haematologica.* – 2012. – Vol. 97, N 7. – P. 994–1002.
479. Plant-produced human recombinant erythropoietic growth factors support erythroid differentiation in vitro [Electronic resource] / K. Musiychuk, R. Sivalenka, J. Jaje et

- al. // Stem. Cells Dev. – 2013. – URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23517237>
480. Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase sulfhydryl modifications: implication for oxidized red cell / N. Pengpanichpakdee, T. Thadtapong, S. Auparakkitanon, P. Wilairat // Southeast Asian J. Trop Med. Public Health. – 2012. – Vol. 43, N 5. – P. 1252–1257.
481. Plasma membrane calcium pump (PMCA) differential exposure of hydrophobic domains after calmodulin and phosphatidic acid activation / I. Mangialavori, A.M. Villamil-Giraldo, M.F. Pignataro et al. // J Biol Chem. – 2011. – Vol. 286, N 21. – P. 18397–18404.
482. Plebani, M. Hemolysis index: quality indicator or criterion for sample rejection? / M. Plebani, G. Lippi // Clin. Chem. Lab. Med. – 2009. – Vol. 47, N 8. – P. 899–902.
483. Polomsky, M. Off-pump coronary artery bypass grafting – the current state / M. Polomsky, J.D. Puskas // Circ. J. – 2012. – Vol. 76, N 4. – P. 784–790.
484. Portoghese, M. Evolution of coronary artery bypass graft techniques / M. Portoghese, G. Carta, E. Coradduzza // G. Ital. Cardiol. (Rome). – 2012. – Vol. 13, N 11. – P. 723–733.
485. Potential roles of the NF κ B and glutathione pathways in mature human erythrocytes / M. Ghashghaeinia, M. Toulany, M. Saki et al. // Cell Mol Biol Lett. – 2012. – Vol. 17, N 1. – P. 11–20.
486. Procoagulant and prothrombotic activation of human erythrocytes by phosphatidic acid / J.Y. Noh, K.M. Lim, O.N. Bae et al. // Am. J. Physiol. Heart circulator Physiol. – 2010. – Vol. 299, N 2. – P. 347–355.
487. Prophylactic perioperative sodium bicarbonate to prevent acute kidney injury following open heart surgery: a multicenter double-blinded randomized controlled trial / M. Haase, A. Haase-Fielitz, M. Plass et al. // PLoS Med. – 2013. – Vol. 10, N 4. – URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Prophylactic+perioperative+sodium+bicarbonate+to+prevent+acute+kidney+injury+following+open+heart+surgery%3A+a+multicenter+double-blinded+randomized+controlled+trial>
488. Protective role of nitric oxide in a model of thrombotic microangiopathy in rats / J. Shao, T. Miyata, K. Yamada et al. // J. Am. Soc. Nephrol. – 2001. – Vol. 12, N 10. – P. 2088–2097.

489. Pulse conductance and flow-induced hemolysis during pulsatile cardiopulmonary bypass / A.P. Simons, P. Wortel, R.A. van Kan et al. // *Artif. Organs.* – 2010. – Vol. 34, N 4. – P. 289–294.
490. Quantification of glycophorin A and glycophorin B on normal human RBCs by flow cytometry / N.G. De Isla, B.D. Riquelme, R.J. Rasia et al. // *Transfusion.* – 2003. – Vol. 3, N 8. – P. 1145–1152.
491. Quantitation of CD55 and CD59 expression on reticulocytes and mature erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, and healthy control subjects / Y. Kim, J. Lim, M. Kim et al. // *Ann. Clin. Lab. Sci.* – 2010. – Vol. 40, N 3. – P. 226–232.
492. Rampling, M.W. Albumin and rouleaux formation / M.W. Rampling, G. Martin // *Clin. Hemorheol.* – 1992. – № 12. – P. 761–765.
493. Rate of nitric oxide scavenging by hemoglobin bound to haptoglobin / I. Azarov, X. He, A. Jeffers et al. // *Nitric Oxide.* – 2008. – Vol. 18. – P. 296–302.
494. Recombinant EPO therapy increases erythrocyte expression of complement regulatory proteins / H. Ohi, M. Tamano, S. Sudo, N. Okada // *Am. J. Kidney Dis.* – 2003. – Vol. 41, N 1. – P. 179–185.
495. Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte membrane / D. Tziakas, G. Chalikias, A. Grapsa et al. // *Clin. Hemorheol. Microcirc.* – 2012. – Vol. 51, N 4. – P. 243–254.
496. Red blood cell energy metabolism during cardiopulmonary bypass / F. Cavaliere, F. Meo, A. Scapigliati et al. // *J. Cardiovasc. Surg. (Torino).* – 1999. – Vol. 40, N 5. – P. 653–657.
497. Red blood cell trauma during cardiopulmonary bypass: narrow pore filterability versus free hemoglobin / S. Svenmarker, E. Jansson, H. Stenlund, K. Engstrom // *Perfusion.* – 2000. – Vol. 15, N 1 – P. 33–40.
498. Red cell distribution width, C-reactive protein, the complete blood count, and mortality in patients with coronary disease and a normal comparison population / J.M. Lappé, B.D. Horne, S.H. Shah et al. // *Clin. Chim. Acta.* – 2011. – Vol. 412, N 23-24. – P. 2094–2099.
499. Red cells, hemoglobin, heme, iron and atherogenesis / E. Nagy, J.W. Eaton, V.

- Jeney et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. – Vol. 30, N 7. – P. 1347–1353.
500. Redox-dependent regulation of the Na⁺,K⁺ pump: New twists to an old target for treatment of heart failure [Electronic resource] / C.C. Liu, N.A. Fry, E.J. Hamilton et al. // *J. Mol. Cell Cardiol.* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23727392>
501. Reduced citrulline production in sepsis is related to diminished de novo arginine and nitric oxide production / Y.C. Luiking, M. Poeze, G. Ramsay, N.E. Deutz // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2009. – Vol. 89. – P. 142–152.
502. Reduced complement activation during cardiopulmonary bypass does not affect the postoperative acute phase response / J. Van den Goor, R. Nieuwland, A. Van den Brink et al. // *Eur. J. Cardio-thoracic. Surg.* – 2004. – Vol. 26, N 5. – P. 926–931.
503. Reduced PKC α activity induces senescent phenotype in erythrocytes [Electronic resource] / R.B. Govekar, P.D. Kawle, S.H. Advani, S.M. Zingde // *Anemia.* – 2012. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3439938/>
504. Reduction of cell cycle progression in human erythroid progenitor cells treated with tumour necrosis factor alpha occurs with reduced CDK6 and is partially reversed by CDK6 transduction / C. Dai, I.J. Chung, S. Jiang et al. // *Br. J. Haematol.* – 2003. – Vol. 121, N. 6. – P. 919–927.
505. Reduction of low-density lipoprotein cholesterol, plasma viscosity, and whole blood viscosity by the application of pulsed corona discharges and filtration [Electronic resource] / J.M. Jung, A. Fridman, D.J. Cho, Y.I. Cho // *Rev. Sci. Instrum.* – 2013. – Vol. 84, N 3. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Reduction+of+low-density+lipoprotein+cholesterol%2C+plasma+viscosity%2C+and+whole+blood+viscosity+by+the+application+of+pulsed+corona+discharges+and+filtration>.
506. Reduction of the inflammatory response following coronary bypass grafting with total minimal extracorporeal circulation / Y. Fromes, D. Gaillard, O. Ponzio et al. // *Eur. J. Cardio-Thoracic Surg.* – 2002. – Vol. 22, N 4. – P. 527–533.
507. Regulation of bone marrow hematopoietic stem cell is involved in high-altitude erythrocytosis / P. Li, J. Huang, H.J. Tian et al. // *Exp. Hematol.* – 2011. – Vol. 39, N. 1. – P. 37–46.
508. Regulation of xanthine oxidoreductase protein expression by hydrogen peroxide

- and calcium / J.S. McNally, A. Saxena, H. Cai et al. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2005. – Vol. 25, N 8. – P. 1623–1628.
509. Regulatory phosphorylation of FXVD2 by PKC and cross interactions between FXVD2, plasmalemmal Ca^{2+} -ATPase and $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase / V.F. Cortes, I.M. Ribeiro, H. Barrabin et al. // *Arch Biochem Biophys.* – 2011. – Vol. 505, N 1. – P. 75–82.
510. Relation between blood and atrial fatty acids in patients undergoing cardiac bypass surgery / R.G. Metcalf, L.G. Cleland, R.A. Gibson et al. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2010. – Vol. 91, N 3. – P. 528–534.
511. Resolving the distinct stages in erythroid differentiation based on dynamic changes in membrane protein expression during erythropoiesis / K. Chen, J. Liu, S. Heck et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106, N 41. – P. 17413–17418.
512. Reversal of mitochondrial proteomic loss in Type 1 diabetic heart with overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase / W.A. Baseler, E.R. Dabkowski, R. Jagannathan et al. // *AJP - Regul. Physiol.* – 2013. – Vol. 304, N 7. – P. 553–565.
513. Risk factors of neurological complications in cardiac surgery / K. Baranowska, G. Juszczak, I. Dmitruk et al. // *Kardiol. Pol.* – 2012. – Vol. 70, N 8. – P. 811–818.
514. Role of phospholipid oxidation products in atherosclerosis / S. Lee, K.G. Birukov, C.E. Romanoski et al. // *Circ Res.* – 2012. – Vol. 111, N 6. – P. 778–799.
515. Rosenson, R.S. Phospholipase A2 enzymes and the risk of atherosclerosis / R.S. Rosenson, E. Hurt-Camejo // *Eur. Heart J.* – 2012. – Vol. 33, N 23. – P. 2899–2909.
516. Ross, R. Atherosclerosis — an inflammatory disease / R. Ross // *N. Eng. J. Med.* – 1999. – Vol. 340, N 2. – P. 115–126.
517. Sailaja, Y.R. The antioxidant status during maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics / Y.R. Sailaja, R. Baskar, D. Saralakumari // *Free Radic Biol. Med.* – 2003. – Vol. 35, N 2. – P. 133–139.
518. Sarrazin, S. Integration of cytokine and transcription factor signals in hematopoietic stem cell commitment / S. Sarrazin, M. Sieweke // *Semin Immunol.* – 2011. – Vol. 23, N 5. – P. 326–334.
519. Shahid, S.M. Electrolytes and $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase: potential risk factors for the development of diabetic nephropathy / S.M. Shahid, T. Mahboob // *Pak. J. Pharm. Sci.* – 2008. – Vol. 21, N 2. – P. 172–179.

520. Shiva, S. Nitrite mediates cytoprotection after ischemia/reperfusion by modulating mitochondrial function / S. Shiva, M.T. Gladwin // *Basic Res. Cardiol.* – 2009. – Vol. 104. – P. 113–119.
521. Sialic acid content in erythrocyte membranes of patients on chronic hemodialysis / A. Bednarek-Skublewska, B. Jakubowska-Solarska, J. Solski, A. Ksiazek // *Polish Arch. Int. Med.* – 2009. – Vol. 119, N 4. – P. 194–199.
522. Sohal, R.S. The redox stress hypothesis of aging / R.S. Sohal, W.C. Orr // *Free Radic Biol. Med.* – 2012. – Vol. 52, N 3. – P. 539–555.
523. Soluble complement receptor-1 protects heart, lung, and cardiac myofilament function from cardiopulmonary bypass damage / P.J. Chai, R. Nassar, A.E. Oakeley et al. // *Circulation.* – 2000. – Vol. 101, N 5. – P. 541–546.
524. Sphingomyelin of erythrocytes membranes is related to total cholesterol and LDL-cholesterol in patients with significant coronary arterial disease / J.A. Jiménez, N. Loango, A.M. Giraldo et al. // *Open Clin. Chem. J.* – 2012. – Vol. 5. – P. 27–32.
525. State of antioxidant and oxygen transport system of the blood in the process of adaptation of the body to hypoxic hypoxia / N.V. Pavliuk, O.M. Krys'ko, N.I. Klymyshyn et al. // *Ukr. Biokhim. Zh.* – 1998. – Vol. 70, N 4. – P. 58–64.
526. Statins inhibited erythropoietin-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells / T. Kaneda, S. Tsuruoka, A. Fujimura // *Eur. J. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 649, N. 1-3. – P. 38–43.
527. Steed, M.M. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia / M.M. Steed, S.C. Tyagi // *Antioxid. Redox Signal.* – 2011. – Vol. 15, N 7. – P. 1927–1943.
528. Steffen, P. Quantification of depletion-induced adhesion of red blood cells [Electronic resource] / P. Steffen, C. Verdier, C. Wagner // *Phys Rev Lett.* – 2013. – Vol. 110, N 1. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Quantification+of+depletion-induced+adhesion+of+red+blood+cells>
529. Steinberg, D. Lipoproteins and atherogenesis: current concepts / D. Steinberg, J.L. Witztum // *JAMA.* – 1990. – N. 264. – P. 3047–3052.
530. Strategies for the prevention and treatment of sudden cardiac death / E.F. Aziz, F. Javed, B. Pratap, E. Herzog // *Open Access Emerg. Med.* – 2010. – N 2. – P. 99–114.

531. Stuck rotablator: the nightmare of rotational atherectomy / D.S. Sulimov, M. Abdel-Wahab, R. Toelg et al. // *EuroIntervention*. – 2013. – Vol. 9, N 2. – P. 251–258.
532. Suhail, M. Na^+, K^+ -ATPase: ubiquitous multifunctional transmembrane protein and its relevance to various pathophysiological conditions / M. Suhail // *J. Clin. Med. Res.* – 2010. – Vol. 2, N 1. – P. 1–17.
533. Superiority of centrifugal pump over roller pump in pediatric cardiac surgery: Prospective randomised trial / I.S. Morgan, M. Codispoti, K. Sanger, P.S. Mankad // *Eur. J. Cardio. Thorac. Surg.* – 1998. – Vol. 13, N 5. – P. 526–532.
534. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules / W.H. Cerwinka, D. Cooper, C.F. Kriegelstein et al. // *Am J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* – 2003. – Vol. 284, N 2. – P. 535–541.
535. Surdacki, A. L-arginine analogs – inactive markers or active agents in atherogenesis? / Surdacki A. // *Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.* – 2008. – Vol. 6, N 4. – P. 302–311.
536. Testa, L. Pexelizumab in ischemic heart disease: a systematic review and meta-analysis on 15,196 patients / L. Testa, W.J. Van Gaal, R. Bhindi et al. // *J. Thoracic. Cardiovasc. Surg.* – 2008. – Vol. 36, N 4. – P. 884–893.
537. The anti inflammatory effects of high density lipoproteins / A.J. Murphy, J.P. Chin-Dusting, D. Sviridov, K.J. Woollard // *Curr. Med. Chem.* – 2009. – Vol. 16, N 6. – P. 667–675.
538. The biological role of inflammation in atherosclerosis / B.W. Wong, A. Meredith, D. Lin, B.M. McManus // *Can. J. Cardiol.* – 2012. – Vol. 28, N 6. – P. 631–641.
539. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease / R.P. Rother, L. Bell, P. Hillmen, M.T. Gladwin // *JAMA*. – 2005. – Vol. 293, N 13. – P. 1653–1662.
540. The effect of normovolemic modified ultrafiltration on inflammatory mediators, endotoxins, terminal complement complexes and clinical outcome in high-risk cardiac surgery patients / N. Papadopoulos, F. Bakhtiary, V. Grün et al. // *Perfusion*. – 2013. – Vol. 28, N 4. – P. 306–314.
541. The effect of priming techniques of ultrafiltrators on blood rheology: An in vitro evaluation / K. Glogowski, A. Stammers, K. Niimi et al. // *Perfusion*. – 2001. – Vol. 16, N 3. – P. 221–228.

542. The effect of simvastatin on erythrocyte membrane fluidity during oxidative stress induced by cardiopulmonary bypass: a randomized controlled study / R. Coccia, C. Spadaccio, C. Foppoli et al. // Clin Ther. – 2007. – Vol. 29, N 8. – P. 1706–1717.
543. The effect of sodium nitroprusside infusion on renal function during reperfusion period in patients undergoing coronary artery bypass grafting: A prospective randomized clinical trial / K. Kaya, M. Oguz, A.R. Akar et al. // Eur. J. Cardiothorac. Surg. – 2007. – Vol. 31, N 2. – P. 290–297.
544. The endothelium and its role in regulating vascular tone / A. Sandoo, J.J. van Zanten, G.S. Metsios et al. // Open Cardiovasc. Med. J. – 2010. – Vol. 23, N 4. – P. 302–312.
545. The hematopoietic system: a new niche for the renin-angiotensin system / C. Hubert, K. Savary, J.M. Gasc, P. Corvol // Nat. Clin. Pract Cardiovasc. Med. – 2006. – Vol. 3, N 2. – P. 80–85.
546. The ins and outs of human reticulocyte maturation: autophagy and the endosome/exosome pathway / R.E. Griffiths, S. Kupzig, N. Cogan et al. // 2012. – Vol. 8, N 7. – P. 1150–1151.
547. The invasion process of bovine erythrocyte by Babesia divergens: knowledge from an in vitro assay / Y. Sun., E. Moreau, A. Chauvin, L. Malandrin // Vet. Res. – 2011. – Vol. 42, N 1. – P. 62.
548. The pathophysiology of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and treatment with eculizumab / R. Kelly, S. Richards, P. Hillmen, A. Hill // Ther. Clin. Risk. Manag. – 2009. – Vol. 5. – P. 911–921.
549. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation / M. Nairz, T. Sonnweber, A. Schroll et al. // Microbes Infect. – 2012. – Vol. 14, N. 3. – P. 238–246.
550. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes / Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. et al. // Archives Biochem. Biophys. – 1963. – Vol. 100, N 1. – P. 119–130.
551. The role of complement in biomaterial-induced inflammation / B. Nilsson, K.N. Ekdahl, T.E. Mollnes, J.D. Lambris // Mol. Immunol. – 2007. – Vol. 44, N 1-3. – P. 82–94.

552. Tiffert, T. Elevated intracellular Ca^{2+} reveals a functional membrane nucleotide pool in intact human red blood cells / T. Tiffert, V.L. Lew // J. Gen. Physiol. – 2011. – Vol. 138, N 4. – P. 381–391.
553. TNF-alpha-induced apoptosis is prevented by erythropoietin treatment on SH-SY5Y cells / N. Pregi, S. Wenker, D. Vittori et al. // Exp. Cell Res. – 2009. – Vol. 315, N. 3. – P. 419–431.
554. Torzewski, M. Complement and atherosclerosis-united to the point of no return / M. Torzewski, S. Bhakdi // Clin. Biochem. – 2013. – Vol. 46, N 1-2. – P. 20–25.
555. Total cholesterol content of erythrocyte membranes and coronary atherosclerosis: an intravascular ultrasound pilot study / G.D. Giannoglou, K.C. Koskinas, D.N. Tziakas et al. // Angiology. – 2009. – Vol. 60, N 6. – P. 676–682.
556. Total cholesterol content of erythrocyte membranes is associated with the severity of coronary artery disease and the therapeutic effect of rosuvastatin / Y. Zhong, H. Tang, Q. Zeng et al. // Ups J Med Sci. – 2012. – Vol. 117, N 4. – P. 390–398.
557. Towards excellence in revascularization for left main coronary artery disease / R.L. Osnabrugge, S.J. Head, A.J. Bogers, A.P. Kappetein // Curr. Opin. Cardiol. – 2012. – Vol. 27, N 6. – P. 604–610.
558. TRAIL promotes a pro-survival signal in erythropoietin-deprived human erythroblasts through the activation of anNF-kB/IkBalpna pathway / S. Sancilio, V. di Giacomo, A.M. Quaglietta et al. // J. Biol. Regul. Homeost Agents. – 2011. – Vol. 25, N. 3. – P. 375–386.
559. Transport of organic anions by multidrug resistance-associated protein in the erythrocyte / B. Rychlik, L. Pułaski, A. Sokal et al. // Acta Biochim Pol. – 2000. – Vol. 47, N 3. – P. 763–772.
560. Treatment strategies in severe symptomatic carotid and coronary artery disease / K. Dzierwa, P. Pieniazek, P. Musialek et al. // J. Med. Sci Monit. – 2011. – Vol. 17, N 8. – P. 191–197.
561. Trimetazidine Reduces Oxidative Stress in Cardiac Surgery / I. Iskesen, O. Saribulbul, M. Cerrahoglu et al. // Circ. J. – 2006. – Vol. 70. – P. 1169–1173.
562. Tsukamoto, H. Clinical aspects of the complement system / H. Tsukamoto, T. Horiuchi // Rinsho Byori. – 2006. – Vol. 54, N 7. – P. 757–762.

563. Tumor necrosis factor- α inhibits generation of glycophorin A⁺ cells by CD34⁺ cells / W. Xiao, K. Koizumi, M. Nishio et al. // *Exp. Hematol.* – 2002. – Vol. 30, N. 11. – P. 1238–1247.
564. Type IV thoracoabdominal aneurysm repair: predictors of postoperative mortality, spinal cord injury, and acute intestinal ischemia / E. Kieffer, L. Chiche, G. Godet et al. // *Ann. Vasc. Surg.* – 2008. – Vol. 22, N 6. – P. 822–828.
565. Tyrosine residues as redox cofactors in human hemoglobin: Implications for engineering nontoxic blood substitutes / B.J. Reeder, M. Grey, R.L. Silaghi-Dumitrescu et al. // *J Biol Chem.* – 2008. – Vol. 283. – P. 30780–30787.
566. Update on interventional cardiology / J.M. de la Torre Hernández, J.F. Díaz Fernández, M. Sabaté Tenas, J. Goicolea Ruigomez // *Rev. Esp. Cardiol.* – 2013. – Vol. 66, N 4. – P. 282–289.
567. Updated role of nitric oxide in disorders of erythrocyte function / M.J. Kahn, J.H. Maley, G.F. Lasker, P.J. Kadowitz // *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* – 2013. – Vol. 13, N 1. – P. 83–87.
568. Valencak, T.G. Phospholipid composition and longevity: lessons from Ames dwarf mice [Electronic resource] / T.G. Valencak, T. Ruf // *Age (Dordr).* – 2013. – URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23640425>
569. Vestergaard-Bogind, B. Calcium - induced oscillation in K⁺ conductance and membrane potential of human erythrocytes mediated by the ionophore A23187 / B. Vestergaard-Bogind, P. Bennekou // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – Vol. 688. – P. 37–44.
570. Vitronectin inhibits neutrophil apoptosis through activation of integrin-associated signaling pathways / H.B. Bae, J.W. Zmijewski, J.S. Deshane et al. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* – 2012. – Vol. 46, N 6. – P. 790–796.
571. Wan, S. Inflammatory response to cardiopulmonary bypass: mechanisms involved and possible therapeutic strategies / S. Wan, J.L. LeClerc, J.L. Vincent // *Chest.* – 1997. – Vol. 112, N 3. – P. 676–692.
572. Wenger, R.H. Erythropoietin / R.H. Wenger, A. Kurtz // *Compr Physiol.* – 2011. – Vol. 1, N. 4. – P. 1759–1794.

573. Winterhalter, M. Management of adult patients with perioperative pulmonary hypertension: technical aspects and therapeutic options / M. Winterhalter, T. Antoniou, T. Loukanov // *Cardiology*. – 2010. – Vol. 116. – P. 3–9.
574. Wright, G. Haemolysis during cardiopulmonary bypass: update / G. Wright // *Perfusion*. – 2001. – Vol. 16, N 5. – P. 345–351.
575. Wulff, H. Therapeutic potential of KCa3.1 blockers: recent advances and promising trends / H. Wulff, N.A. Castle // *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* – 2010. – Vol. 3, N 3. – P. 385–396.
576. Young, R.W. Hyperoxia: a review of the risks and benefits in adult cardiac surgery / R.W. Young // *J. Extra Corpor. Technol.* – 2012. – Vol. 44, N 4. – P. 241–249.
577. Zhang, S. The protective effect of propofol on erythrocytes during cardiopulmonary bypass / S. Zhang, S.J. Yao // *Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* – 2004. – Vol. 24, N 2. – P. 199–201.
578. Zhang, Z.G. Mechanical behavior of the erythrocyte in microvessel stenosis / Z.G. Zhang, X.W. Zhang // *Science China*. – 2011. – Vol. 54, N 5. – P. 450–458.
579. Zhao, S. Hypoxia inducible factor stabilization as a novel strategy to treat anemia / S. Zhao, J. Wu // *Curr. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 20, N 21. – P. 2697–2711.
580. Zhu, J. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment / J. Zhu, S.G. Emerson // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21, N 21. – P. 3295–3313.