

УДК 616.155.18:616-089.168.1-06

СТРУКТУРА ЛИПИДНОЙ ФАЗЫ МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С ВЫРАЖЕННЫМ ГЕМОЛИЗОМ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИЙ С ИСКУССТВЕННЫМ КРОВООБРАЩЕНИЕМ*

Хохлов О.А.*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск*

РЕЗЮМЕ

Проведено исследование состава липидной фазы мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) с выраженным постперфузионным гемолизом (18 человек) до коронарного шунтирования и через 1 ч после завершения искусственного кровообращения (ИК). Показано, что для больных ИБС с выраженным гемолизом характерно нормальное соотношение фракций фосфолипидов (ФЛ) в мембране эритроцитов до операции, что связано с высоким содержанием молодых форм эритроцитов в крови на данном этапе. После операции доля лизофосфатидилхолина и фосфатидной кислоты в эритроцитарной мембране возрастет на фоне снижения фосфатидилинозитола и фосфатидилхолина, что, вероятно, отражает одновременную активацию фосфолипаз трех классов (А, С и D) в эритроцитах во время ИК. Вне зависимости от этапа исследования у больных ИБС с выраженным гемолизом общее содержание ФЛ в мембране эритроцитов понижено при высоком уровне холестерина (ХС) и соотношения ХС/ФЛ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроциты, фосфолипиды, искусственное кровообращение.

Введение

В настоящее время искусственное кровообращение (ИК) является одной из наиболее эффективных и часто применяемых методик в кардиохирургии. Основную долю (44,6%) среди таких операций составляют вмешательства у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС), 29,2% – приобретенные пороки сердца, 26,2% – врожденные пороки сердца [1]. Однако применение ИК неизбежно приводит к травме форменных элементов крови, прежде всего эритроцитов, что сопровождается внутрисосудистым гемолизом и нарастанием гемоглобинемии [15]. Как известно, гемолитическая стойкость красных клеток крови зависит от состояния их мембраны, основным структурным и функциональным компонентом которой являются липиды [4, 6]. Артериальная гипероксия, применяемая во время ИК для компенсации гемодилюции, вызывает образование свободных радикалов в липидах мембран клеток и активацию перекисного

окисления липидов (ПОЛ) [1]. Установлено, что усиление ПОЛ индуцирует нарушение асимметричного распределения фосфолипидов в бислой мембраны эритроцитов и существенным образом изменяет ее фосфолипидный спектр [4, 6]. Подобные модификации мембранных липидов в эритроцитах во время ИК могут лежать в основе патогенеза интраоперационного снижения гемолитической стойкости клеток и развития массивной гемоглобинемии.

Цель исследования – оценить фосфолипидный спектр мембраны эритроцитов и содержание в ней холестерина у больных с выраженным гемолизом после операций с ИК.

Материал и методы

В исследовании приняли участие 18 больных (16 мужчин и 2 женщины) в возрасте от 51 до 65 лет, страдающих ишемической болезнью сердца и перенесших операцию коронарного шунтирования с использованием ИК.

Пациенты характеризовались высокой степенью тяжести стенокардии напряжения (III–IV функциональный класс стенокардии) и имели среднюю продолжительность ИБС ((4,62 ± 0,71) года), длительность ИК составила (140,18 ± 13,56) мин. Реваскуляризация

* Работа выполнена под руководством д-ра мед. наук, профессора О.И. Уразовой, д-ра мед. наук, академика РАМН, профессора В.В. Новицкого.

✉ *Хохлов Олег Алексеевич*, тел.: 8 (3822) 55-36-13, 8-923-411-35-16; e-mail: Hohlovoa@sibmail.com

миокарда проводилась в условиях нормотермии и кристаллоидной кардиоopleгии (кустодиол, Германия) с применением аппаратов ИК роликового типа производства фирмы Stokert (Германия) и одноразовых мембранных оксигенаторов Quadrox (Швеция).

Критерием включения пациентов в исследование служил уровень свободного гемоглобина в плазме крови после операции более 40 мг/дл, который был выбран в качестве признака выраженной гемоглобинемии в связи с тем, что при концентрации свободного гемоглобина в плазме крови свыше 40 мг/дл наблюдаются клинические проявления внутрисосудистого гемолиза [2]. Критериями исключения из исследования считали проведение у пациентов продолженного ИК, выполнение сочетанных операций, отказ от исследования. В контрольную группу вошли 15 практически здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с больными ИБС, не страдающих патологией сердечно-сосудистой системы, а также заболеваниями других систем органов в стадии обострения.

Материалом для исследования служила гепаринизированная (50 ЕД/мл) венозная кровь. Из цельной крови готовили тонкие мазки, которые суправитально окрашивали 1,2%-м раствором бриллиантового кристаллового синего для подсчета ретикулоцитов [5]. Исследование уровня свободного гемоглобина в плазме крови проводили с помощью бензидинового метода [7]. Мембраны эритроцитов выделяли путем гипотонического лизиса [12], липидный экстракт получали по методу J. Folch и соавт. [13]. Определяли общее содержание фосфолипидов (ФЛ) по содержанию липидного фосфора [3] и уровень холестерина ферментативным методом после выпаривания экстрактов с помощью коммерческого набора «Новохол А» (ЗАО «Вектор-Бэст», г. Новосибирск). Фосфолипидный спектр мембраны эритроцитов изучали с помощью тонкослойной хроматографии, разделяя фракции ФЛ в системе хлороформ – метанол – вода (32 : 12,5 : 2) на пластинках Silufol UV254. Идентификацию фракций осуществляли с использованием стандартов Sigma (США). Все исследования проводили двукратно: непосредственно до операции и через 1 ч после завершения ИК.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета программ Statistica 8.0. Для каждой выборки вычисляли выборочное среднее M и ошибку среднего m . Для проверки гипотезы о нормальном распределении выборочных данных использовали тест Шапиро–Уилки. Проверку гипотезы о равенстве средних выборочных величин проводили с использованием t -критерия Стьюдента для нормально распределенных выборок и критерия Манна–Уитни для выборок с не-

нормальным распределением данных. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что концентрация свободного гемоглобина в плазме крови у кардиохирургических больных превышала значения контрольной группы как до операции, так и после нее (таблица). При этом на дооперационном этапе уровень свободного гемоглобина был почти в 2 раза выше аналогичного показателя группы здоровых доноров и многократно возрастал в послеоперационном периоде.

Усиление процессов эритродиереза у пациентов еще до операции, вероятно, объясняется нарушением структурно-метаболического статуса эритроцитов при ИБС [6], а после хирургического вмешательства – влиянием экстремальных факторов ИК: турбулентного потока крови, положительного и отрицательного давления, артериальной гипероксии, температурного градиента, активации системы комплемента и т.д. [1, 15].

Исследование общего содержания холестерина (ХС) и соотношения холестерина/фосфолипидов (ХС/ФЛ) в мембране красных клеток крови у пациентов с выраженным гемолизом выявило, что вне зависимости от этапа исследования оба показателя превышали значения контрольной группы (таблица). Увеличение содержания холестерина и связанного с этим интегрального коэффициента ХС/ФЛ является следствием атерогенных дислипидотемий и служит одним из этапов развития ИБС, чем и объясняется повышение этих показателей до операции [4, 6]. Более того, в силу длительной циркуляции эритроцитов в крови и отсутствия в них процессов метаболизма липидов клетки способны сорбировать на себе ХС, в связи с чем увеличение соотношения ХС/ФЛ в мембране эритроцитов представляет собой ранний и высокочувствительный признак атеросклероза, возникающий еще задолго до повышения концентрации общего ХС в плазме крови [3].

Оценка общего содержания фосфолипидов в мембране эритроцитов у кардиохирургических больных обнаружила снижение исследуемого показателя по сравнению с группой контроля на обоих этапах исследования (таблица).

Известно, что увеличение удельного веса ХС в мембране эритроцитов оказывает опосредованное влияние на активацию процессов липопероксидации. Это способствует гидролизу фосфолипидов, запуску реакций арахидонового каскада и опосредует снижение содержания фосфолипидов в мембране. Интенсификация ПОЛ у больных ИБС является общеизвестным фактом и лежит

в основе типовой реакции эритроцитов на повреждение [6]. К тому же у больных ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом это сопровождается увеличени-

ем проницаемости эритроцитарной мембраны до операции [9].

Содержание ретикулоцитов в крови и свободного гемоглобина в плазме крови, а также холестерина, фосфолипидов и их отдельных фракций в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца до и после операции с искусственным кровообращением ($M \pm m$)

Показатель	Здоровые доноры	Больные с выраженным постперфузионным гемолизом	
		До операции	После операции
Концентрация свободного гемоглобина, мг/дл	6,35 ± 0,81	12,57 ± 1,09 $p_k < 0,01$	56,02 ± 5,16 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,001$
Содержание ретикулоцитов, ‰	6,22 ± 0,79	12,35 ± 0,83 $p_k < 0,05$	16,64 ± 1,39 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$
Общее содержание ХС, мг/мг белка	0,49 ± 0,02	0,58 ± 0,03 $p_k < 0,05$	0,60 ± 0,03 $p_k < 0,05$
Общее содержание ФЛ, мг/мг белка	0,52 ± 0,02	0,46 ± 0,02 $p_k < 0,05$	0,43 ± 0,02 $p_k < 0,05$
Соотношение ХС/ФЛ	0,95 ± 0,04	1,24 ± 0,06 $p_k < 0,01$	1,40 ± 0,06 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$
Лизофосфатидилхолин, %	2,92 ± 0,15	2,72 ± 0,41	4,55 ± 0,69 $p_1 < 0,05$
Фосфатидилинозитол, %	10,55 ± 0,64	9,47 ± 0,96	7,83 ± 0,56 $p_k < 0,05$
Сфингомиелин, %	15,20 ± 0,26	14,29 ± 1,31	14,62 ± 0,74
Фосфатидилхолин, %	26,76 ± 1,07	26,33 ± 1,46	20,66 ± 0,59 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$
Фосфатидилсерин, %	6,37 ± 0,68	5,69 ± 1,30	5,43 ± 1,13
Фосфатидилэтаноламин, %	23,61 ± 0,53	24,23 ± 0,91	24,92 ± 1,71
Фосфатидная кислота, %	14,59 ± 1,01	16,14 ± 1,73	19,43 ± 1,00 $p_1 < 0,05$

Примечание. p_k – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров; p_1 – по сравнению с показателями у кардиохирургических больных до операции.

Интраоперационная гипероксия способствует интенсификации свободнорадикального окисления в клетках красной крови, что характерно именно для пациентов с выраженной постперфузионной гемоглобинемией [9]. Окисление мембранных фосфолипидов облегчает их доступность для действия фосфолипаз, что способствует удалению данных молекул из мембраны и изменению ее фосфолипидного спектра [1, 6]. Можно полагать, что деградация ФЛ в циркулирующих клетках во время ИК уравнивается поступлением в кровяной ток их молодых форм – ретикулоцитов (дозревают в костном мозге в течение 48 ч после энуклеации оксифильных нормобластов), мембране которых присуще высокое содержание ФЛ и низкий уровень ХС [8]. При этом реципрокные тенденции в изменении количества ХС и ФЛ в мембране эритроцитов после ИК реализуются в статистически значимое увеличение их соотношения по-

сле операции (таблица), что негативно отражается на реологических характеристиках эритроцитов, снижая их механическую резистентность и предрасполагая к перфузионной травме [9].

Интересно, что до операции фосфолипидный спектр мембраны эритроцитов у больных ИБС с выраженной постперфузионной гемоглобинемией характеризовался нормальным соотношением фракций ФЛ. При клинически верифицированном диагнозе атеросклероза коронарных артерий подобный факт можно объяснить лишь высоким содержанием ретикулоцитов в крови у данной категории больных (таблица). Между тем после операции относительное содержание различных ФЛ в мембране эритроцитов существенно изменялось: доля лизофосфатидилхолина и фосфатидной кислоты возрастала при снижении уровня фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилинозитола (ФИ) (таблица).

Послеоперационная динамика показателей фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов у больных ИБС с выраженным гемолизом позволяет заключить, что развитие выраженной постперфузионной гемоглобинемии сопровождается сочетанной активацией фосфолипазы А₂, которая расщепляет ФЛ с образованием лизофракций, и активацией фосфолипаз С и D, продуктом деятельности которых является фосфатидная кислота [7, 11, 14]. Поскольку фосфолипаза А₂ преимущественно гидролизует ФХ, а фосфолипаза D обладает исключительной специфичностью к данному ФЛ [11, 14], то, по-видимому, именно активация данных ферментов приводит к снижению уровня ФХ в мембране после операции. Кроме того, потенцирующее действие в деградации ФХ оказывает свободнорадикальная модификация его молекулы, которая богата ненасыщенными двойными связями и выступает в роли главного субстрата в процессах липопероксидации [6, 11]. Гипероксия, неизбежно возникающая при ИК, приводит к активации ПОЛ, что способствует интенсификации липопероксидации фосфолипидов в мембране эритроцитов и уменьшению содержания последних в красных клетках крови [1]. ФЛ, имеющие в составе гидропероксиды жирных кислот, особенно активно гидролизуются фосфолипазой А₂ [11]. Наряду с этим уменьшение доли ФЛ у пациентов после ИК, очевидно, связано с активацией фосфолипазы С, подвергающей деградации ФЛ с образованием инозитолтрифосфата и диацилглицерола, метаболизирующегося далее до фосфатидной кислоты [14].

Заключение

Таким образом, для больных ИБС с выраженным гемолизом после операций с ИК характерно нормальное соотношение фракций фосфолипидов в мембране эритроцитов до операции, что связано с высоким содержанием молодых форм эритроцитов в крови на данном этапе исследования. После операции доля лизофосфатидилхолина и фосфатидной кислоты в эритроцитарной мембране возрастает на фоне снижения концентрации фосфатидилинозитола и фосфатидилхолина, что, вероятно, отражает одновременную активацию фосфолипаз трех классов (А, С и D) в эритроцитах во время ИК. Вне зависимости от этапа исследования общее содержание ФЛ в мембране эритроцитов у больных ИБС с выраженным гемолизом понижено при высоком уровне холестерина и по-

вышенном значении коэффициента ХС/ФЛ, которое еще более возрастает после операции.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ в рамках проекта «Механизмы нарушений гемолитической стойкости эритроцитов к факторам экстракорпоральной перфузии» (соглашение № 12-04-31655/12 от 16 октября 2012 г.).

Литература

1. Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш. Что необходимо знать кардиологу об искусственном кровообращении // Креативная кардиология. 2007. № 1–2. С. 102–117.
2. Дуткевич И.Г. Тактика экстренной диагностики и лечения гемолитических гемотрансфузионных осложнений // Вестник хирургии. 2007. Т. 166, № 6. С. 77–80.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике Минск: Беларусь, 2000. Т. 2. 495 с.
4. Кравец Е.Б., Степовая Е.А., Коцеев Т.Ю. и др. Липидный состав и активность Na⁺,K⁺-АТФазы мембраны эритроцитов у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа при дислипотеинемиях // Сахарный диабет. 2010. № 1. С. 41–44.
5. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. М.: Медицина, 1987. 368 с.
6. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та. 2004. 202 с.
7. Рождественская М.А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови // Актуальные вопросы переливания крови. 1955. № 4. С. 55.
8. Руководство по гематологии: в 3 т. / Ю.Н. Андреев, З.С. Баркаган, А.Ю. Буланов и др.; под ред. А.И. Воробьева. М.: Ньюдиамед, 2005. Т. 3. 416 с.
9. Чумакова С.П., Уразова О.И., Новицкий В.В. и др. Факторы внутрисосудистого гемолиза у кардиохирургических больных после операций с искусственным кровообращением // Вестник РАМН. 2012. № 7. С. 15–19.
10. Чумакова С.П., Уразова О.И., Шипулин В.М. и др. Структурные особенности мембраны эритроцитов при постперфузионном гемолизе различной степени выраженности // Вестн. урал. мед. академ. науки. 2011. Т. 33, № 1. С. 73–76.
11. Balsinde J., Balboa M.A., Insel P.A. et al. Regulation and inhibition of phospholipase A₂ // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1999. V. 39. P. 175–189.
12. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. et al. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes // Archives Biochem Biophys. 1963. V. 100, № 1. P. 119–130.
13. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley A.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues // J. Biol. Chem. 1957. V. 226. Suppl. 1. P. 497–509.
14. Liscotovitch M., Czarny M., Fiucci G. et al. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family // Biochem. J. 2000. V. 345. P. 401–415.
15. Vercaemst L. Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: A review in search of a treatment algorithm // The J. of Extra Corporeal Technology. 2008. V. 40, № 4. P. 257–267.

Поступила в редакцию 25.10.2012 г.

Хохлов Олег Алексеевич – аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

✉ Тел.: 8 (3822) 55-36-13, 8-923-411-3516; e-mail: Hohlovoa@sibmail.com

THE STRUCTURE OF THE LIPID PHASE OF THE ERYTHROCYTE MEMBRANE IN PATIENTS WITH EXPRESSED HEMOLYSIS AFTER SURGERY WITH CARDIOPULMONARY BYPASS

Khokhlov O.A.

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

ABSTRACT

The composition of lipid phase of red-cell membrane in patients with ischemic heart disease (IHD) with pronounced postperfusion hemolysis (18 patients) before coronary artery bypass surgery and 1 hour after the completion of cardia bypass (CB) has been studied. It is shown that patients with IHD with pronounced hemolysis are characterized by the normal ratio of phospholipids (PL) fractions in red-cell membrane before surgery, which is connected with eth high content of young forms of red cells in blood at this stage. After surgery, the fraction of lysophosphatidylcholine and phosphatidic acid in red-cell membrane increases against the background of decrease of phosphatidylinositol and phosphatidylcholine, which likely reflects the simultaneous activation of phospholipases of three classes (A, C, and D) in red cells during CB. Regardless of the phase of the study, the total content of PL in red-cell membrane of IHD patients with pronounced hemolysis is decrease at the high level of cholesterol (CS) and the CS/PI ratio.

KEY WORDS: red cells, phospholipids, cardia bypass.

Bulletin of Siberian Medicine, 2013, vol. 12, no. 1, pp. 75–79

References

1. Averina T.B., Samuilova D.Sh. *Creative cardiology*, 2007, no. 1–2, pp. 102–117 (in Russian).
2. Dutkevich I.G. *The bulletin of surgery*, 2007, vol. 166, no. 6, pp. 77–80 (in Russian).
3. Kamyshnikov V.S. *Handbook of clinical and biochemical laboratory diagnostics*. Minsk, Belarus Publ., 2000, vol. 2, 495 p. (in Russian).
4. Kravets Ye.B., Stepovaya Ye.A., Koshhevets T.Yu. et al. *Diabetes mellitus*, 2010, no. 1, pp. 41–44 (in Russian).
5. Men'shikov V.V. *Laboratory methods of investigation in clinic. Handbook*. Moscow, Medicine Publ., 1987, 368 p. (in Russian).
6. Novitsky V.V., Ryazantseva N.V., Stepovaya Ya.A. *Physiology and pathology of the red blood cell*. Tomsk, TSY Publ., 2004, 202 p. (in Russian).
7. Rozhdestvenskaja M.A. *Actual issues of blood transfusion*, 1955, no. 4, pp. 55. (in Russian).
8. *Guide to hematology*. In 3 vol. Yu.N. Andreev, Z.S. Barkagan, A.Yu. Bulanov et al., ed. A.I. Vorob'ev. Moscow, Newdiamed Publ., 2005, vol. 3, 416 p. (in Russian).
9. Chumakova S.P., Urazova O.I., Novitsky V.V. et al. *The Bulletin of RAMS*, 2012, no. 7, pp. 15–19 (in Russian).
10. Chumakova S.P., Urazova O.I., Shipulin V.M. et al. *The Bulletin of Ural Medical Academic Science*, 2011, vol. 33, no. 1, pp. 73–76 (in Russian).
11. Balsinde J., Balboa M.A., Insel P.A. et al. Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1999, vol. 39, pp. 175–189.
12. Dodge J.T., Mitchell C., Hanahan D.J. et al. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes. *Archives Biochem. Biophys.*, 1963, vol. 100, no. 1, pp. 119–130.
13. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley A.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 1957, vol. 226, suppl. 1, pp. 497–509.
14. Liscotovitch M., Czarny M., Fiucci G. et al. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem. J.*, 2000, vol. 345, pp. 401–415.
15. Vercaemst L. Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: A review in search of a treatment algorithm. *The J. of Extra Corporeal Technology*, 2008, vol. 40, no. 4, pp. 257–267.

Khokhlov Oleg A., postgraduate student at the Chair of Pathophysiology of SSMU Tomsk, Russian Federation.

✉ Phone: +7 (3822) 55-36-13, +7-923-411-35-16; e-mail: Hohlovoa@sibmail.com