

С.П. Чумакова, В.М. Шипулин*, О.И. Уразова, В.В. Новицкий,
С.Э. Бармина, И.В. Мальцева, И.В. Пономаренко*, Э.В. Сапрыкина

Влияние механической резистентности эритроцитов на выраженность гемолиза после операций с искусственным кровообращением

ГОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет Минздравсоцразвития России», 634050, Томск, ул. Московский тракт, 2, office@ssmu.net.ru
* УРАМН «НИИ кардиологии СО РАМН», 634012, Томск, ул. Киевская, 111 А, press@cardio.tsu.ru

УДК 616.12-089:616.77:616.155.18:612.13
БАК 14.01.20

Поступила в редакцию 4 апреля 2011 г.

© С.П. Чумакова, В.М. Шипулин, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, С.Э. Бармина, И.В. Мальцева, И.В. Пономаренко, Э.В. Сапрыкина, 2012

В исследование включены больные ишемической болезнью сердца (ИБС) с умеренным (37 чел.) и выраженным (18 человек) гемолизом после коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения (ИК). До и после операции изучали концентрацию свободного гемоглобина в плазме крови, механическую резистентность эритроцитов, содержание ТБК-активных продуктов и общую антиокислительную активность в эритроцитах, учитывали длительность ИК и объемную скорость перфузии. Установлено, что у больных с выраженным постперфузионным гемолизом уровень ТБК-активных продуктов в эритроцитах после операции нарастает при снижении их общей антиокислительной активности. Развитие умеренного гемолиза не сопровождается изменениями оксидантно-антиоксидантного баланса эритроцитов. Между группами больных отсутствуют достоверные различия в продолжительности ИК, объемной скорости перфузии, механической резистентности эритроцитов на обоих этапах исследования. Таким образом, в основе индивидуально обусловленного выраженного постперфузионного гемолиза лежит свободнорадикальный механизм повреждения эритроцитов, а не механическая травма клеток крови в процессе ИК. Ключевые слова: гемолиз; механическая травма; искусственное кровообращение.

Изобретение аппарата ИК в середине прошлого века совершило революционный прорыв в области торакальной хирургии. Однако внедрение экстракорпоральных технологий в медицину неизбежно сопряжено с комплексом патофизиологических реакций организма на экстремальное воздействие и серьезными нарушениями гомеостаза. В связи с этим одним из первых и до сих пор нерешенных вопросов кардиохирургии остается проблема травматизации форменных элементов крови в экстракорпоральном контуре с развитием внутрисосудистого гемолиза и тромбоцитопении.

По данным литературы, изучение механизмов интраоперационного лизиса эритроцитов при операциях с ИК находилось в центре внимания многих ученых второй половины XX в., но из-за низкого уровня методической базы того времени ограничилось в основном серией работ по исследованию механической и осмотической резистентности эритроцитов. Кроме того, изучение гемолиза до сих пор проводилось исключительно для оценки функциональных параметров аппарата ИК или с целью сравнительной харак-

теристики перфузиологических устройств и методик. В итоге было показано, что повреждение клеток обусловлено турбулентностью потока крови вследствие выраженных напряжений сдвига, возникающих из-за резких изменений площади поперечного сечения канюль и трубок; действием струйных сил, появляющихся при высокой скорости движения крови, сил гидродинамического удара и сил поверхностного натяжения; влиянием повышенного давления в насосах аппарата ИК и отрицательного давления в коронарном отсосе [15].

В результате проведенных исследований было сделано справедливое заключение о ведущей роли механического фактора в формировании постперфузионного гемолиза. Позже появились сведения об активирующем влиянии чужеродных поверхностей перфузиологических систем на систему комплемента, гемостаза и клетки крови, в которых при этом усиливаются процессы свободнорадикального окисления [2, 12]. В связи с этим основной задачей минимизации интраоперационного гемолиза стала разра-

ботка менее травматичных и максимально биосовместимых компонентов экстракорпорального контура.

В настоящее время современное перфузиологическое оборудование удовлетворяет этим условиям, и разрушение эритроцитов во время ИК стало заметно меньше [15]. Однако степень послеоперационной гемоглобинемии продолжает сильно варьировать у различных больных, оперированных в равных условиях ИК с применением идентичного перфузиологического оборудования. Принимая это во внимание, представляется актуальной проблема изучения механизмов, детерминирующих индивидуальность гемолитических реакций при экстракорпоральной перфузии. Цель исследования – оценить влияние исходной (дооперационной) механической резистентности эритроцитов на выраженность постперфузионного гемолиза при операциях в условиях ИК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В исследование включены 55 больных ИБС, перенесших операцию коронарного шунтирования с использованием ИК. Реваскуляризация миокарда проводилась в условиях нормотермического ИК ($36,07 \pm 0,18^\circ\text{C}$) и кристаллоидной кардиopleгии («Кустодиол», Германия). Экстракорпоральная перфузия осуществлялась на аппаратах ИК производства «Gambro» (Швеция), оснащенных роликовыми насосами, и с применением одноразовых мембранных оксигенаторов «Quadrox» (Швеция). Критериями исключения из исследования считали проведение у пациентов продленного после операции ИК и выполнение сочетанных операций. Исследования проводили в двух группах, сформированных в зависимости от концентрации свободного гемоглобина в плазме крови после операции: с умеренным гемолизом (гемоглобинемия менее 40 мг/дл, 37 человек) и с выраженным гемолизом (гемоглобинемия свыше 40 мг/дл, 18 человек). Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови

40 мг/дл была выбрана в качестве критерия распределения больных на группы, потому что при гемоглобинемии свыше этого уровня наблюдаются клинические проявления внутрисосудистого гемолиза (прежде всего – желтуха) [3]. Больные двух групп сравнения оказались сопоставимыми по возрасту, полу, функциональному классу стенокардии (табл. 1), количеству выполненных анастомозов ($2,79 \pm 0,28$) и длительности интраоперационной ишемии миокарда ($78,92 \pm 11,73$ мин). В контрольную группу вошли 12 практически здоровых доноров мужского пола, сопоставимых по возрасту с группами больных ишемической болезнью сердца и не страдающих патологией кардиоваскулярной системы, а также заболеваниями других систем органов в стадии обострения.

Материалом исследования служила гепаринизированная венозная кровь в количестве 5 мл. В плазме крови определяли содержание свободного гемоглобина бензидиновым методом [9]. Эритроциты, трижды отмытые изотоническим 10 мМ трис-НСl буфером ($\text{pH} = 7,4$), использовали для оценки механической резистентности красных клеток крови и приготовления гемолизата (соотношение эритроцитов и гипотонического 10 мМ трис-НСl буфера ($\text{pH} = 7,4$), содержащего 40 мМ ЭДТА, 1:9). В лизате клеток определяли содержание ТБК-активных продуктов в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) [5] и общую антиокислительную активность с помощью индикатора окислительно-восстановительных реакций 2,6-дихлорфенолиндофенола, рассчитывая затем константу ингибирования по разнице скоростей его окисления в реакционной смеси, содержащей и не содержащей биологический материал [10]. Механическую резистентность эритроцитов изучали методом Я.В. Ганиткевич, Л.И. Черненко [1978] в собственной модификации, регистрируя концентрацию свободного гемоглобина в 2%-й суспензии эритроцитов (дилуент – раствор Рингера, забуференный HEPES ($\text{pH} = 7,4$) и содержащий 0,1% глюкозы), подвергнутой механическому воздействию путем постоянной ротации

Таблица 1

Характеристика больных ИБС с умеренным и выраженным гемолизом после операций в условиях искусственного кровообращения

Клинический статус	Больные с постперфузионным гемолизом	
	умеренным	выраженным
Средний возраст больных, лет	$57,73 \pm 1,62$	$61,00 \pm 2,38$
Мужчины/женщины, n	33/4	16/2
Длительность ИБС, лет	$5,02 \pm 1,19$	$6,63 \pm 1,74$
Функциональный класс стенокардии	$2,97 \pm 0,10$	$3,06 \pm 0,21$
Недостаточность кровообращения по NYHA, ст.	$1,33 \pm 0,16$	$1,42 \pm 0,33$
Гипертоническая болезнь, ст.	$2,16 \pm 0,20$	$2,29 \pm 0,24$
Сахарный диабет II типа, %	$10,81 \pm 5,18$	$11,11 \pm 7,62$
Язвенная болезнь желудка и/или двенадцатиперстной кишки, %	$16,22 \pm 6,14$	$11,11 \pm 7,62$
Заболевания бронхолегочной системы, %	$16,22 \pm 6,14$	$61,11 \pm 11,82$
Патология печени, %	$16,22 \pm 6,14$	$38,89 \pm 11,82$
Патология мочевыделительной системы, %	$32,43 \pm 7,80$	$22,22 \pm 10,10$
Дисфункция предстательной железы, %	$21,62 \pm 6,87$	$11,11 \pm 7,62$

в течение 30 мин при 1 500 об/мин. Результат выражали как процент гемолизированных клеток после механического воздействия, принимая за 100% гемолиза содержание свободного гемоглобина в 2%-м гемолизате эритроцитов (дилуент – дистиллированная вода). Все исследования проводили двукратно: непосредственно до операции и в постперфузионном периоде через 1 ч после нейтрализации гепарина адекватной дозой протамина сульфата. При интерпретации данных учитывали длительность искусственного кровообращения и объемную скорость перфузии.

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью пакета программ Statistica 6.0 и Excel. Для каждой выборки вычисляли $\bar{X}$ – среднее арифметическое и m – ошибку среднего. Проверку гипотезы о равенстве средневыворочных величин проводили с использованием t -критерия Стьюдента для зависимых и независимых выборок и непараметрических критериев Манна – Уитни для независимых выборок и Вилкоксона для зависимых выборок. Различия считали достоверными при уровне $p < 0,05$. Оценку взаимосвязей изучаемых величин проводили путем вычисления коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведенных исследований было показано, что у больных ИБС концентрация свободного гемоглобина в плазме крови до коронарного шунтирования превышала показатели здоровых доноров в среднем в 2 раза (табл. 2). После хирургического вмешательства степень гемоглобинемии продолжала нарастать: у пациентов с умеренным гемолизом в 2,1 раза ($p_1 < 0,001$), с выраженным в 4,8

раза ($p_1 < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем. Неравнозначная кинетика интраоперационного лизиса эритроцитов определяла статистически значимые различия по концентрации свободного гемоглобина между группами больных после коронарного шунтирования.

Механическая резистентность эритроцитов у обследованных пациентов в периоперационном периоде оказалась сниженной ($p_k < 0,05$, см. табл. 2) за исключением нормальных значений до операции у больных с выраженным постперфузионным гемолизом. При этом в обеих группах сравнения отмечалась отрицательная динамика механической стойкости клеток после прямой реваскуляризации миокарда (процент гемолизированных эритроцитов при сдвиговой нагрузке *in vitro* возрастал; $p_1 < 0,05$).

Изучение окислительно-антиокислительного баланса в эритроцитах выявило высокие концентрации ТБК-активных продуктов и низкую общую антиокислительную активность в клетках красной крови у всех категорий больных как до, так и после хирургического вмешательства (см. табл. 2). Только у пациентов с выраженным гемолизом была зарегистрирована реципрокная динамика данных показателей в послеоперационном периоде: содержание ТБК-активных продуктов в эритроцитах возрастало на 40% ($p_1 < 0,05$) по сравнению с исходными значениями, а общая антиокислительная активность в клетках уменьшалась на 36% ($p_1 < 0,05$). Следует отметить, что параметры экстракорпоральной перфузии достоверно не отличались между группами пациентов: длительность ИК у больных с умеренным постперфузионным гемолизом составила $116,75 \pm 14,28$ мин, у пациентов с выраженной гемоглоби-

Таблица 2

Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови, механическая резистентность эритроцитов и показатели их окислительно-антиокислительного баланса, достоверность различий: p_k по сравнению с показателями крови здоровых доноров, p_1 после операции по сравнению с дооперационным периодом, p_2 между группами больных с умеренным и выраженным гемолизом

Группы	Концентрация свободного гемоглобина в плазме крови, мг/дл	Механическая резистентность эритроцитов, % гемолизированных клеток	Концентрация ТБК-активных продуктов в эритроцитах, мкмоль/мл	Общая антиокислительная активность эритроцитов, $\times 10^{-2}$ л/(мл · мин)
Здоровые доноры, $n = 12$	$6,28 \pm 0,90$	$2,82 \pm 0,44$	$3,08 \pm 0,10$	$3,15 \pm 0,24$
Больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом, $n = 37$	До операции $11,48 \pm 1,31$ $p_k < 0,05$	$3,93 \pm 0,63$ $p_k < 0,05$	$7,45 \pm 0,63$ $p_k < 0,001$	$2,67 \pm 0,27$ $p_k < 0,05$
После операции	$23,63 \pm 2,61$ $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,001$	$5,65 \pm 0,67$ $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$	$7,72 \pm 0,55$ $p_k < 0,001$	$2,72 \pm 0,26$ $p_k < 0,05$
Больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом, $n = 18$	До операции $13,70 \pm 0,82$ $p_k < 0,05$	$3,32 \pm 0,95$	$6,94 \pm 0,77$ $p_k < 0,001$	$2,50 \pm 0,54$ $p_k < 0,05$
После операции	$77,34 \pm 12,42$ $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$	$5,52 \pm 1,10$ $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$	$9,75 \pm 1,18$ $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$	$1,84 \pm 0,34$ $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

немией – $133,16 \pm 14,79$ мин, объемная скорость перфузии равнялась $5,46 \pm 0,48$ и $5,19 \pm 0,62$ л/мин соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Настоящее исследование констатировало вариабельность степени внутрисосудистого гемолиза у кардиохирургических больных, оперированных в условиях ИК. По данным ряда авторов, концентрация свободного гемоглобина в плазме крови после операций на остановленном сердце, действительно, регистрируется в широких пределах – от 2,5 мг/дл [15] до 1000 мг/дл [2]. Различные уровни постперфузионного гемолиза, зафиксированные отечественными и зарубежными учеными, могут быть вызваны особенностями перфузиологического оборудования и методик, применяемых в кардиохирургических клиниках. Между тем нами показано, что гемолитические реакции, индуцированные ИК, носят индивидуальный характер, поскольку у больных как с умеренным, так и с выраженным гемолизом экстракорпоральная перфузия выполнялась с помощью одинаковых перфузионных систем, аппаратов ИК и оксигенаторов. Интересно, что параметры перфузии (объемная скорость перфузии и длительность ИК), определяющие динамические характеристики потока крови в экстракорпоральном контуре и интенсивность сдвиговой нагрузки, оказались сопоставимыми в группах больных с умеренным и выраженным гемолизом.

Исходя из концепции о ведущей роли механического фактора в интраоперационной гибели эритроцитов, неоднозначность гемолитических реакций на фоне равного деформирующего воздействия извне может быть обусловлена изменениями механических свойств самих клеток больного. В связи с этим у пациентов с выраженной гемоглобинемией закономерно было бы ожидать низкую механическую резистентность эритроцитов до и/или после операции. Наряду с этим накануне хирургического вмешательства у данной категории больных механическая стойкость клеток была в пределах нормы в отличие от пациентов, проявляющих умеренный гемолиз при низкой механической резистентности эритроцитов. Как известно, нарушение деформируемости красных клеток крови у больных атеросклерозом обусловлено избыточной сорбцией холестерина на мембране эритроцитов и окислительной модификацией структур цитолеммы. Кроме того, реологические свойства эритроцитов ухудшаются по мере старения клеток, которые приобретают сферическую форму [8]. Так как атеросклерозом страдали все обследованные пациенты, а уровень ТБК-активных продуктов в эритроцитах больных с различной степенью гемолиза был одинаковым до операции, то нормальную механическую резистентность клеток на фоне атеросклероза можно объяснить циркуляцией в крови более молодой клеточной популяции [7].

После операции снижение механической стойкости эритроцитов в обеих группах больных происходило в равной

степени (см. табл. 2), отражая негативное влияние экстракорпоральных технологий на клетки крови. По современным данным, ИК сопровождается не только гибелью слабостойких эритроцитов в процессе перфузии, но и субгемолитическими нарушениями целостности мембраны сохранившихся клеток и дисфункцией механизмов восстановления их ионного баланса [13]. Это приводит к повышению содержания внутриклеточного кальция, что угнетает работу цитоскелета, снижая деформируемость клетки, и активирует ряд ферментов, индуцирующих процессы клеточной деструкции [8]. Подводя итог анализа влияния механического фактора на эритроциты во время ИК, можно заключить, что ни динамические параметры перфузии, ни механические свойства красных клеток крови не являются причиной массивной гемоглобинемии после ИК.

В качестве других патогенетических факторов интраоперационного гемолиза в кардиохирургии также рассматриваются интенсификация перекисного окисления липидов (ПОЛ) мембран клеток крови [13]. Оксидантно-антиоксидантный статус эритроцитов у больных с различной степенью гемолиза на дооперационном этапе был сопоставимым и характеризовался активацией процессов липопероксидации в сочетании с угнетением системы антиоксидантной защиты (см. табл. 2), что отражает патологию периферического звена эритрона на фоне атеросклероза. Как известно, ИБС сопровождается интенсификацией процессов ПОЛ и дефицитом антиоксидантов в эритроцитах [8, 14].

Основными путями образования активных форм кислорода (АФК) в эритроцитах являются неферментативный путь генерации супероксиданиона при самопроизвольном окислении гемоглобина в метгемоглобин и образование гидроксила в реакциях Фентона и Габера – Вейса. В ишемизированных тканях источником АФК служит цепь электронного транспорта митохондрий, аутоокисление убихинона, флавинов и катехоламинов. Кроме того, ишемия сопровождается активацией протеолитических ферментов и ростом интрацеллюлярных концентраций кальция, которые осуществляют конверсию ксантиндегидрогеназы в ксантиноксидазу. Одновременно накапливаются продукты распада аденозинтрифосфата, выступающие в роли субстрата для ксантиноксидазы, которая, в отличие от ксантиндегидрогеназы, метаболизирует молекулярный кислород до супероксиданиона [4]. В итоге свободные радикалы, образующиеся в тканях и эритроцитах, активно вступают в реакцию с фосфолипидами эритроцитарной мембраны, нарушая ее проницаемость и эластические свойства [8]. Выполнение прямой реваскуляризации миокарда в условиях ИК вызывало изменения окислительного метаболизма только у больных с выраженным гемолизом, у которых была зарегистрирована еще большая по сравнению с дооперационным уровнем интенсификация ПОЛ в эритроцитах при истощении их общей антиокислительной активности. Возможно, это связано с незрелостью систем антиради-

кальной защиты молодых эритроцитов, продуцируемых костным мозгом в условиях длительного напряжения эритропоэза [6]. Во время ИК активации ПОЛ и нарушению антиоксидантной защиты организма способствует гипоксия тканей на фоне интраоперационной гипероксигенации крови, а также реперфузия органов после их длительной ишемии [4, 11]. Важно отметить, что в постперфузионном периоде константа ингибирования в эритроцитах отрицательно коррелировала с уровнем свободного гемоглобина в плазме крови. Чем ниже общая антиокислительная активность эритроцитов после операции, тем интенсивнее гемоглобинемия. Это указывает на определяющую роль процессов свободнорадикального окисления в механизмах формирования выраженного гемолиза после проведения операций в условиях ИК.

Механический фактор не является ведущим в патогенезе выраженного постперфузионного гемолиза у кардиохирургических больных при использовании идентичного перфузиологического оборудования.

В основе индивидуально обусловленной вариабельности гемолитических реакций после операций с ИК лежит интенсификация ПОЛ мембраны эритроцитов на фоне угнетения общей антиокислительной активности клеток в процессе экстракорпоральной перфузии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ганиткевич Я.В., Черненко Л.И. // Лабораторное дело. 1978. № 2. С. 116–117.
2. Дементьева И.И., Морозов Ю.А., Чарная М.А. // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2008. № 6. С. 60–63.
3. Дуткевич И.Г. // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. 2007. № 5. С. 77–80.
4. Зенков Н.К., Ланкин В.З., Меньщикова Е.Б. Окислительный стресс. Биохимический и патофизиологический аспекты. М., 2001.
5. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск, 2000. Т. 2.
6. Лакомая Ю.А., Колосова М.В., Титова Н.М. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2004. № 8. С. 139.
7. Мальцева И.В., Чумакова С.П., Никищенко С.А. и др. // Бюл. Федерального центра сердца, крови и эндокринологии им. В.А. Алмазова. 2010. № 2. С. 250.
8. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск, 2004.
9. Рождественская М.А. // Актуальные вопросы переливания крови. 1955. №. 4. С. 55.
10. Семенов В.Л., Ярош А.М. // Украинский биохимический журнал. 1985. Т. 57, № 3. С. 50–52.
11. D'souza A.B., D'souza P.V., D'souza V. // Clinica Chimica Acta. 2007. V. 375, № 1–2. P. 147–152.
12. Paparella D., Yau T.M., Young E. // Eur. J. Cardiothor. Surg. 2002. V. 21, № 2. P. 232–244.
13. Vercaemst L. // J. Extra Corporeal Tech. 2008. V. 40, № 4. P. 257–267.
14. Wang X., Yang L., Liu Y. et al. // J. Biomech. 2009. V. 42, № 14. P. 2394–2399.
15. Wright G. // Perfusion. 2001. V. 16, № 5. P. 345–351.

Чумакова Светлана Петровна – кандидат медицинских наук, докторант кафедры патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета (Томск).

Шипулин Владимир Митрофанович – доктор медицинских наук, профессор, Заслуженный деятель науки РФ, научный руководитель отделения сердечно-сосудистой хирургии НИИ кардиологии СО РАМН (Томск).

Уразова Ольга Ивановна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета (Томск).

Новицкий Вячеслав Викторович – доктор медицинских наук, академик РАМН, Заслуженный деятель науки РФ, ректор и заведующий кафедрой патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета (Томск).

Бармина Светлана Эдуардовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета (Томск).

Мальцева Инна Викторовна – аспирант кафедры патофизиологии Сибирского государственного медицинского университета (Томск).

Пономаренко Игорь Валерьевич – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отделения сердечно-сосудистой хирургии НИИ кардиологии СО РАМН (Томск).

Сапрыкина Элеонора Васильевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела биохимии и спектрального анализа Сибирского государственного медицинского университета (Томск).