

## Механизмы регуляции объема эритроцитов у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом после операций на остановленном сердце

Чумакова С.П.<sup>1</sup>, Новицкий В.В.<sup>1</sup>, Уразова О.И.<sup>1</sup>, Петрова И.В.<sup>1</sup>, Шипулин В.М.<sup>2</sup>, Сапрыкина Э.В.<sup>1</sup>, Хохлов О.А.<sup>1</sup>

## Mechanisms of regulation of erythrocytes volume in cardiosurgical patients with moderated and expressed the hemolysis after operations

Chumakova S.P., Novitsky V.V., Urazova O.I., Petrova I.V., Shipulin V.M., Saprykina E.V., Khokhlov O.A.

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

<sup>2</sup> НИИ кардиологии СО РАМН, г. Томск

© Чумакова С.П., Новицкий В.В., Уразова О.И. и др.

Проведено исследование механизмов регуляции объема эритроцитов у кардиохирургических больных с умеренным (24 человека) и выраженным (13 человек) гемолизом после коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения. Установлено, что развитие выраженного гемолиза ассоциировано с большим, чем при умеренном гемолизе, объемом эритроцитов после операции, уменьшением их  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимой  $\text{K}^+$ -проницаемости и активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы на фоне дефицита АТФ в клетках. У больных с умеренным гемолизом вне зависимости от этапа исследования  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая

$\text{K}^+$ -проницаемость мембраны эритроцитов не отличается от таковой у здоровых доноров, но активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы снижена при достаточном содержании АТФ.

**Ключевые слова:** гемолиз, объем эритроцита,  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая  $\text{K}^+$ -проницаемость,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФаза, АТФ, искусственное кровообращение.

A study of mechanisms of regulation of volume of erythrocytes in cardiosurgical patients with moderate (24 patients) and expressed (13 patients) hemolysis after coronary artery bypass grafting in conditions of cardiopulmonary bypass was carried out. It was established that development expressed hemolysis is associated with higher (than under moderate hemolysis) volume of erythrocytes after operation, reduction  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$ -permeability and activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in their against deficiency of ATP in cells. At patients with moderated hemolysis independently of an investigation phase  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$ -permeability of a membrane of erythrocytes doesn't differ from healthy donors, but activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase is reduced at the sufficient content of ATP.

**Key words:** hemolysis, volume erythrocytes,  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$ -permeability,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, ATP, cardiopulmonary bypass.

УДК 616.12-089-06:616.155.18-08

### Введение

Одной из основных и до сих пор не решенных проблем обеспечения оперативных вмешательств на остановленном сердце является травматизация форменных элементов крови в аппаратах искусственного кровообращения (ИК), индуцирующая развитие внутрисосудистого гемолиза [8]. В условиях постоянной деформации эритроцит испытывает изменение проницаемости цитоплазматической мембраны для одновалентных катионов и кальция. Такой феномен называ-

ется деформационным стрессом [7]. Экстремальные значения напряжений сдвига в аппарате ИК вызывают существенное увеличение концентрации кальция в клетке, что обуславливает снижение деформируемости эритроцитов, активацию кальцийзависимых липо- и протеолитических ферментов в эритроцитах, которые наряду с процессами липопероксидации и комплементопосредованного лизиса определяют ионный дисбаланс клетки [4, 7]. В этих условиях гемолитическая стойкость эритроцитов во многом зависит от способности клеток сохранять свой объем, что достигает-

ся функционированием  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{K}^+$ -каналов ( $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$ -каналов) [4, 5]. Открывание последних инициируется поступлением кальция в клетку и опосредует выход из нее ионов  $\text{K}^+$ , что ведет к уменьшению объема эритроцита, а избыток  $\text{Ca}^{2+}$  активирует  $\text{Ca}^{2+}$ -насос и приводит к последующему закрыванию  $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$ -каналов [5].

Цель исследования — определение роли  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимых  $\text{K}^+$ -каналов и  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в механизмах регуляции объема эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца с умеренным и выраженным гемолизом после операций в условиях искусственного кровообращения.

## Материал и методы

В исследование приняли участие 37 больных (32 мужчины и 5 женщин) в возрасте от 50 до 62 лет (средний возраст  $(57,84 \pm 1,53)$  года), страдающих ишемической болезнью сердца (ИБС) и перенесших операцию коронарного шунтирования с использованием ИК. Реваскуляризация миокарда проводилась в условиях нормотермии и кристаллоидной кардиopleгии (кустоидиол, Германия) с применением аппаратов ИК роликового типа производства Stokert (Германия) и однократных мембранных оксигенаторов Quadrox (Швейцария). Критериями исключения из исследования были проведение у пациентов продленного ИК и выполнение сочетанных операций.

Пациенты были распределены на две группы в зависимости от концентрации свободного гемоглобина в плазме крови после операции: с умеренным (гемоглобинемия менее 40 мг/дл, 24 человека) и выраженным гемолизом (гемоглобинемия свыше 40 мг/дл, 13 человек). Критерием распределения больных на группы явился уровень гемоглобинемии 40 мг/дл, свыше которого наблюдаются клинические проявления внутрисосудистого гемолиза [1]. Больные групп сравнения были сопоставимыми по возрасту и полу, функциональному классу стенокардии (III—IV) и продолжительности ИБС ( $(4,62 \pm 0,71)$  года), но отличались по длительности ИК: при умеренном гемолизе ( $105,32 \pm 8,09$  мин, при выраженном —  $(136,94 \pm 11,67)$  мин ( $p < 0,05$ ). Контрольная группа была сформирована из 12 практически здоровых доноров, сопоставимых по полу и возрасту с группами больных ИБС, не страдающих патологией сердечно-сосудистой системы, а также заболеваниями других систем органов в стадии обострения.

Материалом исследования служила гепаринизированная (при добавлении 50 ЕД/мл гепарина) венозная кровь. После центрифугирования (1 000g, 5 мин, 4 °С) плазму и клетки белой крови удаляли, а эритроциты трижды промывали тремя частями изотонического раствора  $\text{NaCl}$  (150 ммоль), содержащего натрий-фосфатный буфер (5 ммоль) (рН 7,4), при тех же условиях центрифугирования. Для исследования  $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$ -каналов был применен метод регистрации мембранного потенциала в суспензии эритроцитов по изменениям рН среды инкубации в присутствии протонофора, основанный на том, что в этих условиях распределение протонов зависит от мембранного потенциала [5]. Защелачивание среды соответствует гиперполяризации (ГП) мембраны, скорость которой характеризует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую  $\text{K}^+$ -проницаемость, а восстановление рН — возвращению мембранного потенциала (МП) к исходному значению и отражает активность  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы [5]. Активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в мембране эритроцитов определяли по накоплению неорганического фосфата в инкубационной среде, содержащей тени эритроцитов и АТФ (2 ммоль) [3]. Содержание АТФ в эритроцитах определяли методом тонкослойной хроматографии [2], уровень свободного гемоглобина в плазме крови — бензидиновым методом [6]. Объем эритроцитов оценивали с помощью гематологического анализатора МЕК-6410 (Nihon Kohden, Япония). Все исследования проводили двукратно: непосредственно перед операцией 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 законе распределения использовался тест Шапиро—Уилки. Проверку гипотезы о равенстве средневыборочных величин проводили с использованием  $t$ -критерия Стьюдента, критериев Вилкоксона и Манна—Уитни. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Согласно полученным данным степень выраженности гемоглобинемии у кардиохирургических больных после операции с ИК сильно варьировала, отличаясь в 2,5 раза между группами пациентов (таблица). Такое различие нельзя объяснить лишь продолжительностью

перфузии, которая у пациентов с выраженным гемолизом превышала таковую в альтернативной группе только на 30%. Следует отметить, что до операции концентрация свободного гемоглобина в плазме крови у пациентов обеих групп сравнения почти в 2 раза превышала контрольный уровень, отражая дисфункцию эритроцитов при ИБС [4]. Несмотря на повышенный уровень гемоглобинемии накануне хирургического вмешательства у пациентов с выраженным постперфузионным гемолизом, средний объем эритроцитов в этот период был сопоставимым в группах обследованных лиц (таблица). Между тем после операции формирование выраженной гемоглобинемии сочеталось с достоверно большим объемом эритроцитов, чем при умеренном эритролизисе, что позволяет судить о несостоятельности ионтранспортирующих систем эритроцитарной мембраны.

Изучение гиперполяризационного ответа мембраны эритроцитов показало, что до проведения ИК его показатели (скорость ГП и время максимальной ГП) не отличались между группами больных и находились в пределах контрольных значений (таблица). Наряду с этим активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз (судя по скорости восстановления МП) мембраны эритроцитов в этот период оказалась пониженной у пациентов с умеренным постперфузионным гемолизом, а содержание АТФ — у больных с выраженной гемоглобинемией

(таблица). Поскольку АТФ необходим для деятельности ионных насосов, а активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы определяли в суспензии теней эритроцитов, содержащей стандартное количество АТФ (2 ммоль), то логично предположить, что в цельных клетках эффективность функционирования  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы с нормальной активностью фермента на фоне дефицита АТФ (при выраженном гемолизе) будет примерно равной таковой в клетках со сниженной активностью фермента и достаточным содержанием АТФ (при умеренной гемоглобинемии). Вероятно, данное обстоятельство, а также не отличающаяся от контрольных значений  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимая  $\text{K}^+$ -проницаемость мембраны эритроцитов до операции у больных с различной степенью выраженности постперфузионного гемолиза определяют возможность поддержания объема эритроцитов на одинаковом уровне.

Осуществление экстракорпоральной перфузии у больных с выраженным гемолизом сопровождалось уменьшением активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы эритроцитов и времени максимальной ГП мембраны (таблица). Последнее можно объяснить отчетливой тенденцией к увеличению скорости восстановления МП, что свидетельствует о некотором повышении активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и, возможно, о сокращении времени открытого состояния  $\text{K}(\text{Ca}^{2+})$ -каналов ( $p_k < 0,05$ ). Кроме того, угнетение

**Параметры гиперполяризационного ответа клеток красной крови и активность  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в их мембране, содержание АТФ в эритроцитах и свободного гемоглобина в плазме крови у больных ишемической болезнью сердца до и после операций с искусственным кровообращением ( $M \pm m$ )**

| Показатель   | Здоровые доноры<br>(12 человек) | Больные с умеренным постперфузионным гемолизом (24 человек) |  | Больные с выраженным постперфузионным гемолизом (13 человек) |  |
|--|---------------------------------|---|--|--|--|
|  |                                 | до операций   | после операции                               | до операций  | после операции   |
| Концентрация свободного гемоглобина, мг/дл   | 6,35 ± 0,81                     | 10,71 ± 0,82<br>$p_k < 0,05$                                | 22,15 ± 1,30<br>$p_k < 0,01$<br>$p_1 < 0,01$ | 12,57 ± 1,09<br>$p_k < 0,01$                                 | 56,02 ± 5,16<br>$p_k < 0,001$<br>$p_1 < 0,001$<br>$p_2 < 0,01$ |
| Скорость гиперполяризации мембраны эритроцитов при ГПО, мкВОН/(мин · л) клеток               | 4,79 ± 0,44                     | 4,98 ± 0,34   | 5,31 ± 0,44                                  | 5,38 ± 0,27  | 5,04 ± 0,39  |
| Время максимальной гиперполяризации мембраны эритроцитов при ГПО, с                          | 45,31 ± 2,71                    | 43,54 ± 2,83  | 40,30 ± 2,01                                 | 41,15 ± 2,53   | 36,99 ± 1,92<br>$p_k < 0,05$                                   |
| Скорость восстановления мембранного потенциала при ГПО эритроцитов, мкВН/(мин · л) клеток    | 1,76 ± 0,15                     | 1,35 ± 0,13<br>$p_k < 0,05$                                 | 1,26 ± 0,12<br>$p_k < 0,05$                  | 1,48 ± 0,16  | 1,71 ± 0,18  |
| Активность $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - АТФазы в мембране эритроцитов, мкмольР/(мин · л) белка | 0,085 ± 0,012                   | 0,052 ± 0,007<br>$p_k < 0,05$                               | 0,057 ± 0,012<br>$p_k < 0,05$                | 0,082 ± 0,008<br>$p_2 < 0,05$                                | 0,061 ± 0,012<br>$p_k < 0,05$<br>$p_1 < 0,05$                  |
| Содержание АТФ в эритроцитах,  | 2,95 ± 0,22                     | 2,71 ± 0,21   | 2,46 ± 0,18                                  | 2,24 ± 0,18  | 2,08 ± 0,27  |

| мкмоль/г Нв                                   |                  |                  |                  | $p_k < 0,05$     | $p_k < 0,05$                 |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------------------|
| Средний объем эритроцитов, $\cdot 10^{-15}$ л | 87,45 $\pm$ 1,61 | 92,68 $\pm$ 1,12 | 83,13 $\pm$ 0,85 | 91,67 $\pm$ 1,56 | 86,50 $\pm$ 0,91             |
|   |                  |                  | $p_1 < 0,01$     |                  | $p_1 < 0,05$<br>$p_2 < 0,05$ |

Примечание. ГПО — гиперполяризационный ответ; АТФ — аденозинтрифосфат;  $p_k$  — уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров;  $p_1$  — по сравнению с показателями у кардиохирургических больных до операции;  $p_2$  — по сравнению с показателями у больных с умеренным гемолизом.

активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, определяющей содержание  $\text{K}^+$  в эритроцитах, и некоторое снижение скорости ГП, отражающей  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую  $\text{K}^+$ -проницаемость клеточной мембраны, также способствуют уменьшению суммарной утечки ионов  $\text{K}^+$  из клетки. Развитие умеренного гемолиза не сопровождается достоверными изменениями изучаемых параметров ионного транспорта (см. таблицу), однако несколько большие значения скорости ГП и времени максимальной ГП, а также содержания АТФ в клетках красной крови у этих больных по сравнению с альтернативной группой пациентов могут потенцировать эффект уменьшения объема эритроцитов после операции.

## Заключение

Таким образом, развитие умеренного гемолиза у больных после операций с ИК сопровождается значительным уменьшением объема эритроцитов, что носит компенсаторно-приспособительный характер и достигается за счет некоторого увеличения проводимости  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов при нормальном времени их открытия и уровня АТФ в эритроцитах на фоне исходно низкой активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в их мембране.

Формирование выраженной гемоглобинемии после ИК сочетается с небольшим сокращением объема эритроцитов, что снижает их гемолитическую стойкость и реализуется вследствие некоторого уменьшения проводимости  $\text{K}^+(\text{Ca}^{2+})$ -каналов при существенном сокращении времени их открытия и пула АТФ в клетках, потенцируя послеоперационное угнетение активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009—2013 годы» (соглашения № 14.А18.21.0206 и № 14.А18.21.0174) и РФФИ по тематике «Механизмы нарушений гемолитической стойкости эритроцитов к факторам экстракорпоральной перфузии» (номер заявки 12-04-31655).*

## Литература

1. Дуткевич И.Г. Тактика экстренной диагностики и лечения гемолитических гемотрансфузионных осложнений // Вестн. хирургии. 2007. Т. 166, № 6. С. 77—80.
2. Захарова Н.Б., Рубин В.И. Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках Силуфол // Лаб. дело. 1980. № 12. С. 735—738.
3. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. Исследование активности  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в эритроцитах млекопитающих // Биохимия. 1984. Т. 49, № 7. С. 1089—1094.
4. Новицкий В.В., Рязанцева Н.В., Степовая Е.А. Физиология и патофизиология эритроцита. Томск: Изд-во Том. ун-та. 2004. 202 с.
5. Орлов С.Н., Петрова И.В., Покудин Н.И. и др.  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые калиевые каналы эритроцитов, исследованные методом регистрации  $\text{Ca}^{2+}$ -индуцированных изменений мембранного потенциала // Биол. мембраны. 1992. Т. 9, № 9. С. 885—903.
6. Рождественская М.А. Определение гемоглобина в плазме консервированной крови // Актуальные вопросы переливания крови. 1955. № 4. С. 55.
7. Сторожок С.А., Санников А.Г., Захаров Ю.М. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства. Тюмень: Изд-во Тюм. ун-та. 1997. 140 с.
8. 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 19.07.2012 г.

Утверждена к печати 09.10.2012 г.

## Сведения об авторах

**С.П. Чумакова** — канд. мед. наук, докторант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**В.В. Новицкий** — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**О.И. Уразова** — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск);

**И.В. Петрова** — д-р биол. наук, профессор кафедры биофизики и функциональной диагностики СибГМУ (г. Томск).

*Чумакова С.П., Новицкий В.В., Уразова О.И. и др. Механизмы регуляции объема эритроцитов у кардиохирургических больных...*

**В.М. Шипулин** — заслуженный деятель науки РФ, д-р мед. наук, профессор, научный руководитель отделения сердечно-сосудистой хирургии НИИ кардиологии СО РАМН (г. Томск).

**Э.В. Сапрыкина** — канд. хим. наук, научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ (г. Томск).

**О.А. Хохлов** — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

**Для корреспонденции**

**Чумакова Светлана Петровна**, тел.: 8 (3822) 55-36-13, 8-909-539-5109; e-mail: Chumakova\_S@mail.ru