

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

На правах рукописи

ХОХЛОВ Олег Алексеевич

РОЛЬ НАРУШЕНИЙ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ
МЕМБРАНЫ ЭРИТРОЦИТОВ В ИНТРАОПЕРАЦИОННОМ ГЕМОЛИЗЕ
ПРИ ИСКУССТВЕННОМ КРОВООБРАЩЕНИИ

14.03.03 - патологическая физиология

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Уразова О.И.

доктор медицинских наук, профессор,

академик РАМН,

заслуженный деятель науки РФ

Новицкий В.В.

Томск - 2013

СОДЕРЖАНИЕ:

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Архитектоника мембраны эритроцитов в норме и при патологии.....	14
1.1.1. Нарушения структуры липидной фазы мембраны эритроцитов и их цитоскелета при заболеваниях различного генеза.....	14
1.1.2. Активный транспорт в эритроцитах и его дисфункция при патологии.....	21
1.1.3. Антигенные детерминанты эритроцитов.....	23
1.2. Этиология и патогенез гемолитических реакций.....	29
1.2.1. Механизмы гемолитических реакций в норме и при патологии.....	29
1.2.2. Дисфункция эритроцитов как причина интенсификации гемолитических реакций.....	31
1.3. Патогенез внутрисосудистого гемолиза при искусственном кровообращении.....	35
1.3.1. Устройство аппарата искусственного кровообращения и цитодеструктивные эффекты его компонентов.....	35
1.3.2. Патогенетические факторы гемолиза при искусственном кровообращении	37
1.4. Негативное влияние свободного гемоглобина на организм кардиохирургических больных.....	40
1.5. Патология эритроцитов при ишемической болезни сердца.....	42
1.5.1. Краткие сведения об ишемической болезни сердца и методах ее лечения.....	43
1.5.2. Модификация мембраны эритроцитов при ишемической болезни сердца и атеросклерозе.....	45

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	49
2.1. Характеристика обследованных больных ишемической болезнью сердца.....	49
2.2. Материал исследования.....	54
2.3. Методы исследования.....	54
2.3.1. Приготовление взвеси эритроцитов	54
2.3.2. Определение концентрации свободного гемоглобина в плазме крови бензидиновым методом.....	55
2.3.3. Подсчет ретикулоцитов в суправитально окрашенных мазках периферической крови	56
2.3.4. Метод выделения мембран эритроцитов.....	56
2.3.5. Определение белка микробиуретовым методом.....	57
2.3.6. Изучение липидного состава мембраны эритроцитов.....	57
2.3.6.1. Получение липидного экстракта мембран эритроцитов.....	57
2.3.6.2. Определение содержания общего холестерина в липидном экстракте мембран эритроцитов	58
2.3.6.3. Определение общей концентрации фосфолипидов в липидном экстракте мембран эритроцитов по содержанию липидного фосфора.....	59
2.3.6.4. Изучение фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов.....	60
2.3.7. Определение активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов.....	61
2.3.8. Определение содержания аденозинтрифосфата в эритроцитах...	62
2.3.9. Определение содержания гемоглобина в гемолизате гемиглобинцианидным методом.....	63
2.3.10. Исследование поверхностных структур мембраны эритроцитов (CD35, CD55, гликофорины А и В).....	64
2.3.11. Оценка проницаемости мембраны эритроцитов для низкомолекулярных гидрофильных веществ	65

2.3.12. Определение концентрации терминального комплекса комплемента в сыворотке крови.....	66
2.3.13. Определение Резус-фенотипа эритроцитов.....	68
2.4. Статистическая обработка результатов.....	68
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	70
3.1. Содержание свободного гемоглобина и ретикулоцитов в крови у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	70
3.2. Содержание гликофорин A ⁺ , гликофорин B ⁺ , CD35 ⁺ , CD55 ⁺ эритроцитов в периферической крови у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	70
3.3. Показатель мочевинового гемолиза, активность Na ⁺ /K ⁺ -АТФазы и содержание АТФ в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	73
3.4. Содержание холестерина, фосфолипидов в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	75
3.4.1. Общее содержание холестерина в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	75
3.4.2. Общее содержание фосфолипидов и их фракций в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	76
3.5. Частота встречаемости антигенов системы Резус и Резус-фенотипов эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения.....	80
Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	82

ВЫВОДЫ.....	121
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	123

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АТФаза – аденозинтрифосфатаза

Г-6-ФДГ – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови

ИБС – ишемическая болезнь сердца

ИК – искусственное кровообращение

ЛФХ – лизофосфатидилхолин

МКАТ – моноклональные антитела

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат восстановленный

ПОЛ – перекисное окисление липидов

СФМ – сфиногомиелин

ТКК – терминальный комплекс комплемента

ФИ – фосфатидилинозитол

ФК – фосфатидная кислота

ФЛ – фосфолипиды

ФС – фосфатидилсерин

ФХ – фосфатидилхолин

ФЭА – фосфатидилэтаноламин

ХЛ – холестерол

CD – cluster of differentiation

CR1 – complement receptor 1

MCV – mean corpuscular volume

MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. В настоящее время заболевания сердечно-сосудистой системы являются основной причиной смерти граждан Российской Федерации и большинства развитых стран мира [Оганов Р.Г., 2008; Кузьмина О.Ю., 2009; Шальнова С.А. и соавт., 2012]. При этом ишемическая болезнь сердца занимает лидирующие позиции в рейтинге летальных исходов от сердечно-сосудистых заболеваний [Гребенщикова И.А. и соавт., 2011].

Фармакологическая коррекция коронарной недостаточности позволяет значительно улучшить состояние пациентов. В случае неэффективности терапевтического лечения применяется операция коронарного шунтирования, наиболее часто выполняемая в условиях искусственного кровообращения. Данный метод обеспечения кардиохирургических вмешательств позволяет проводить манипуляции на остановленном сердце, а значит, использовать микрохирургическую технику, обеспечивая высокую надежность шунтов и долгосрочное улучшение коронарной перфузии у больных ишемической болезнью сердца [Murphy G.S. et al., 2009; Lezama-Urtecho C.A. et al., 2010; Агеева М.В. и соавт., 2011].

Между тем, проведение коронарного шунтирования с применением искусственного кровообращения осложняется возникновением интраоперационного и постперфузионного гемолиза [Дементьев И.И. и соавт., 2008, 2010; Vercaemst L., 2008]. Основной причиной гемолиза служит перфузионная травма эритроцитов, возникающая при циркуляции крови в аппарате искусственного кровообращения в результате работы роликовых или центрифужных насосов, кардиотомного отсоса, пассажа крови в пределах оксигенатора и артериальной канюли [Vercaemst L., 2008; Murphy G.S. et al., 2009]. Контакт крови с неэндотелизированной поверхностью экстракорпорального контура, гипероксия и гипотермия, применяемые при искусственном кровообращении, потенцируют интраоперационную гибель красных клеток крови [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007; Ломиворотов

В.Н., 2010; Агеева М.В. и соавт., 2011]. Изменения структурной организации мембраны лежат в основе гибели эритроцитов при атеросклерозе, который на сегодняшний день рассматривается в качестве основной причины ишемической болезни сердца [Осипенко А.Н., 2012; Осипенко А.Н. и соавт., 2012].

Во время проведения искусственного кровообращения эритроцит подвергается окислительному и деформационному воздействию [Gu Y.J. et al., 2008]. В то же время известно, что при выполнении искусственного кровообращения в равных условиях с использованием идентичного оборудования степень выраженности гемоглобинемии оказывается неравнозначной [Чумакова С.П. и соавт., 2011, 2012]. Это свидетельствует о том, что индивидуальные особенности мембраны эритроцитов, определяющие транспортные, антигенные и микрореологические свойства данного типа клеток, оказывают влияние на их гемолитическую стойкость при перфузии в аппарате искусственного кровообращения.

Важно отметить, что в литературе содержится достаточное количество сведений о повреждающем влиянии аппаратов искусственного кровообращения различных модификаций и их компонентов на красные клетки крови [Kaufmann T.A. et al., 2009; Leme J. et al., 2011; Schnürer C. et al., 2011], но практически отсутствуют данные о роли исходных изменений структуры эритроцитов в патогенезе интраоперационного гемолиза при выполнении искусственного кровообращения. В свете этого поиск факторов, определяющих дооперационное состояние мембраны красных клеток, изучение его влияния на выраженность гемолитических реакций при проведении искусственного кровообращения представляет значительный теоретический и практический интерес.

Цель исследования: оценить роль нарушений структуры мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца в патогенезе умеренного и выраженного интраоперационного гемолиза при искусственном кровообращении.

Задачи исследования:

- 1) Оценить активность системы комплемента крови, экспрессию поверхностных молекул-ингибиторов системы комплемента (CD35, CD55) на эритроцитах и проницаемость их мембраны у больных ишемической болезнью сердца до и после операции в условиях искусственного кровообращения, сопровождающегося умеренным и выраженным гемолизом.
- 2) Оценить Резус-фенотип и экспрессию гликофоринов А и В на эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения, в зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза.
- 3) Проанализировать изменения липидного состава, активность Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы мембраны и содержание аденозинтрифосфата в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца до и после операции в условиях искусственного кровообращения, сопровождающегося умеренным и выраженным гемолизом.
- 4) На основе анализа показателей до- и послеоперационного состояния структуры мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца выделить патогенетические факторы умеренного и выраженного постперфузионного гемолиза.

Научная новизна. Получены новые данные о роли исходных (до операции) нарушений структурной организации мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) в механизмах умеренного и выраженного постперфузионного гемолиза при проведении оперативного вмешательства в условиях искусственного кровообращения (ИК). Впервые обосновано, что компенсация до- и послеоперационного внутрисосудистого гемолиза за счет поступления в кровь эритроцитарных клеток костномозгового резерва у больных ИБС при умеренной гемоглобинемии ассоциируется с восстановлением количества эритроцитов, содержащих гликофорины А и В, только после ИК, а при выраженном гемолизе – с

отсутствием изменений их количества на обоих этапах исследования. Показано, что интенсивная деструкция эритроцитов в аппарате ИК у больных ИБС определяется предсуществующей патологией клеток, о чем свидетельствует повышение проницаемости их мембраны, дефицит поверхностных молекул-ингибиторов комплемента CD55 и внутриклеточного аденозинтрифосфата (АТФ), показатели которых у пациентов с умеренным гемолизом соответствуют норме. Наряду с этим, обнаружено, что связь между выраженным послеоперационным гемолизом и экспрессией CD35 на эритроцитах у больных ИБС отсутствует, в то время как прослеживается ассоциация с *сс*-фенотипом Резус-системы эритроцитов. Установлено, что интраоперационное повреждение красных клеток крови у больных ИБС вне зависимости от выраженности постперфузионного гемолиза определяется повышением активности системы комплемента, изменениями структурной организации липидного бислоя и угнетением активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов, что у пациентов с выраженной послеоперационной гемоглобинемией усугубляется исходным (предшествующим операции) дефицитом АТФ в клетках. Постперфузионные изменения фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов у больных ИБС при развитии умеренного гемолиза проявляются увеличением содержания фосфатидной кислоты, что в случае выраженной гемоглобинемии (при исходно нормальном долевым распределении фракций фосфолипидов) сочетается с уменьшением относительного и абсолютного количества фосфатидилинозитола и фосфатидилхолина при накоплении лизофосфатидилхолина.

Теоретическая и практическая значимость. Результаты диссертационной работы об этиопатогенетических факторах структурных изменений мембраны эритроцитов у больных ИБС, предрасполагающих к развитию умеренного и выраженного интраоперационного гемолиза, расширяют теоретические знания о механизмах постперфузионного лизиса эритроцитов различной степени выраженности при выполнении ИК.

Полученные данные о механизмах выраженного постперфузионного гемолиза могут быть применены для разработки дифференцированных подходов к профилактике и коррекции интраоперационных гемолитических реакций и послеоперационных осложнений при экстракорпоральной перфузии, а также учтены при создании новых типов перфузиологического оборудования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Развитию умеренного гемолиза у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения, предшествует исходное (до операции) нарушение фосфолипидного состава мембраны эритроцитов (сокращение общего пула фосфолипидов за счет фракций фосфатидилинозитола, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина при повышении содержания лизофосфатидилхолина), низкая активность Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы, дефицит клеток, экспрессирующих гликофорины А и В, и активация системы комплемента крови. При этом проницаемость мембраны, экспрессия на эритроцитах молекул-ингибиторов комплемента и уровень внутриклеточного аденозинтрифосфата до операции сохраняются в пределах нормы.
2. Усиление лизиса эритроцитов при развитии умеренной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца после искусственного кровообращения обусловлено повышением проницаемости мембраны клеток вследствие значительно возрастающей активности системы комплемента, сохраняющихся структурных нарушений липидного бислоя (высокий уровень лизофосфатидилхолина в сочетании с увеличением содержания фосфатидной кислоты) и низкой активности Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы. При этом количество эритроцитов, экспрессирующих гликофорины А и В, нормализуется в ассоциации с увеличением количества ретикулоцитов в крови после операции.
3. Исходно (до операции) повышенный уровень гемоглобинемии у больных

ишемической болезнью сердца с выраженным постперфузионным гемолизом обусловлен более значимой (чем при умеренном гемолизе) активацией системы комплемента в связи с дефицитом комплементингибиторных молекул CD55 на эритроцитах, что обуславливает увеличение проницаемости их мембраны. При этом распределение фракций фосфолипидов в мембране эритроцитов на фоне сокращения общего их пула варьирует в пределах нормы, что связано с мобилизацией в кровь эритроцитарных клеток костномозгового резерва.

4. Изменения структуры мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца с выраженным гемолизом после операции аортокоронарного шунтирования потенцируются повреждающим действием искусственного кровообращения, что проявляется увеличением соотношения «холестерол-фосфолипиды» и нарушениями спектра мембранных фосфолипидов (более выраженными, чем при умеренной гемоглобинемии) в сочетании с возрастающей активностью системы комплемента. При этом на фоне сохраняющегося в клетках дефицита аденозинтрифосфата снижается активность Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы мембраны эритроцитов. К развитию выраженного интраоперационного гемолиза предрасполагает *сс*-фенотип системы Резус эритроцитов.

Апробация и реализация диссертации. Материалы диссертации доложены и обсуждены на Межрегиональной научно-практической конференции «Диагностика и лечение анемий в XXI веке» (Рязань, 2011), VI Российской конференции с международным участием «Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция» (Москва, 2011); IV и V Международных научных конференциях «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине» (Сочи, 2011, 2012), Конгрессе гематологов России (Москва, 2012); XII Конгрессе молодых ученых «Науки о человеке» (Томск, 2011); Всероссийской конференции хирургов, посвященной 10-летию медицинского центра им. Р.П. Аскерханова (Махачкала, 2012); XVIII Всероссийском съезде

сердечно-сосудистых хирургов (Москва, 2012) и научных семинарах кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск, 2010-2013).

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.).

Результаты работы внедрены в учебный процесс кафедры патофизиологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 научных работ, в том числе 8 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ, 9 статей и тезисов в материалах конгрессов, конференций, съездов.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 153 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4 глав, выводов и списка используемой литературы. Работа иллюстрирована 7 рисунками и 7 таблицами. Библиографический указатель включает 289 источников, из них 105 отечественных и 184 зарубежных авторов.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации. Соискатель непосредственно проанализировал данные литературы по теме диссертации, произвел набор клинико-экспериментального материала, провел запланированные исследования и статистическую обработку результатов и их анализ.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Архитектоника мембраны эритроцитов в норме и при патологии

1.1.1. Нарушения структуры липидной фазы мембраны эритроцитов и их цитоскелета при заболеваниях различного генеза

Плазматическая мембрана клеток красной крови является важнейшим их компонентом, поскольку определяет все разнообразие антигенных, транспортных и механических характеристик эритроцитов [Mohandas N., Gallaher P.G., 2008]. Зрелый эритроцит не имеет цитоплазматических органелл и ядра, поэтому он не способен к синтезу белков и липидов, окислительному фосфорилированию и поддержанию реакций цикла трикарбоновых кислот. Несмотря на то, что цикл трикарбоновых кислот в циркулирующих эритроцитах не функционирует, небольшая активность его ферментов (фумараза, малатдегидрогеназа) выявляется в зрелых клетках эритроидного ряда [Магеррамов А.М. и соавт., 2009]. Вследствие отсутствия у зрелых эритроцитов способности к синтезу белков они существуют и функционируют за счет ранее синтезированных (в ядродержащих клетках эритроидного ряда) белков, в том числе ферментов [Бойтлер Э., 1981; Марри П. и соавт., 1993; Эллиот В., Эллиот Д., 1999; Новицкий В.В. и соавт., 2004].

Мембрана эритроцитов состоит из липидного бислоя, белков цитоскелета, интегральных и поверхностных протеинов. Внутримембранная группа белка полосы 3 и гликофорин С прикреплены к двойному слою фосфолипидов через дополнительные связывающие белки (анкирин и белок полосы 4.1) [Nguyen D.V., 2010].

Одним из основных компонентов мембраны эритроцитов является холестерол (ХЛ). Его молекулы расположены между двумя слоями фосфолипидов (ФЛ). При этом основная часть молекулы ХЛ располагается внутри гидрофобного слоя ФЛ, а гидроксильная группа взаимодействует с водной фазой [Сторожок С.А. и соавт., 1997]. Наиболее важная функция ХЛ – его способность модулировать физико-химические свойства клеточных

мембран. Известно, что ХЛ влияет на процессы фазовых переходов бислойных ФЛ. При температуре фазового перехода ФЛ из кристаллического геля переходят в жидкокристаллическое состояние, что сопровождается возрастанием беспорядка и подвижности жирнокислотных цепей ФЛ [Геннис Р., 1997]. По сути, ХЛ играет роль своеобразного «наполнителя», снижая силы притяжения между углеводородными цепями липидов. При наличии в мембране ХЛ ни повышение, ни снижение температуры не грозит упорядоченности и подвижности жирнокислотных цепей. Благодаря ХЛ температурные фазовые переходы в плазматических мембранах отсутствуют или крайне редки [Шевченко О.Г., 2010].

ХЛ увеличивает степень упорядоченности и снижает подвижность углеводородных цепей мембранных ФЛ, способствует их вытягиванию. Высокая степень упорядоченности ФЛ в мембранах приводит к усилению плотности и снижению проницаемости мембраны, увеличению ее микровязкости [Yeagle P.L. et al., 1990].

Снижение концентрации ХЛ в мембране эритроидных клеток приводит к уменьшению транспорта калия в эритроцитах, что оказывает влияние на осмотическую резистентность данных клеток. Уменьшение содержания ХЛ в мембране эритроцитов также увеличивает ее проницаемость для липофильных криопротекторов. Так, ХЛ-«истощенные» эритроциты имеют повышенную проницаемость мембраны для глицерола [Stoll C. et al., 2011]. Показано увеличение содержания ХЛ в мембране эритроидных клеток при сахарном диабете типа 1 и 2, атеросклерозе и ряде заболеваний иного генеза [Новицкий В.В. и соавт., 2006].

Мембранные ФЛ состоят из сфингомиелина и глицерофосфолипидов, которые могут быть разделены на фракции: фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин, лизофосфатидилхолин, фосфатидилинозитол, фосфатидилхолин, фосфатидная кислота [Nguen D.B., 2010]. В работе N. Mohandas и P.G. Gallagher [2008] показано, что фосфатидилхолин и сфингомиелин расположены преимущественно во внешнем монослое

липидов, в то же время большая часть фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина, вместе с малыми фракциями фосфатидилинозитола, располагается во внутреннем липидном монослое. Наличие фосфатидилсерина во внутреннем слое липидов, по мнению авторов, способствует сохранению клеток при контакте с макрофагами ретикулоэндотелиальной системы, особенно селезенки, в то время как присутствие данного липида во внешнем слое способствует распознаванию эритроцитов макрофагами и дальнейшему их фагоцитированию.

На фоне характерной для жизнеспособных клеток асимметрии ФЛ они фактически находятся в состоянии динамического равновесия между двумя монослоями липидов. Динамическое равновесие складывается из двух механизмов. Первый заключается в том, что все ФЛ пассивно диффундируют через бислой липидов со сравнительно медленной скоростью [Dekkers D.W.C. et al., 1998]. Вторым механизмом характеризуется тем, что аминокислоты (фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин) активно транспортируются из внешнего липидного монослоя во внутренний с помощью фермента Mg^{2+} -аденозинфосфат-зависимой аминокислотной трансферазы, и их распределение в мембране эритроцитов оказывает влияние на другие ФЛ [Kuipers F.A. et al., 1996].

Было продемонстрировано, что нарушение асимметрии ФЛ мембраны эритроцитов возникает при длительной инактивации аминокислотной трансферазы, к чему может приводить снижение уровня АТФ (аденозинтрифосфата) в клетке [Jong D.K., Beleznaý Z., 1996]. Жирнокислотный состав каждого ФЛ обоих монослоев в мембране эритроцитов влияет на ее физико-химические свойства (плотность упаковки липидов, текучесть, поверхностный заряд) [Schewe M. et al., 1992]. Снижение процентного содержания легкоокисляемых фракций фосфолипидов в мембране эритроцитов за счет увеличения устойчивых к окислению фракций (фосфатидилхолин и лизофосфатидилхолин) было выявлено при псориазе [Кешилева Р.К., Рахматов А.Б., 2010].

Гликолипиды мембраны эритроцитов составляют около 10% мембранных липидов и являются гликофинголипидами. Они содержат ненасыщенный аминспирт сфингозин, длинноцепочечную ненасыщенную жирную кислоту и полярные углеводные группы. В зависимости от вида полярной головки гликофинголипиды разделяют на нейтральные и кислые. Нейтральные гликофинголипиды содержат один или несколько остатков сахаров. Кислые гликофинголипиды включают сложные олигосахариды и сиаловые кислоты [Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Деградация гликолипидов мембраны эритроцитов, например, наблюдается при болезни Гоше [Franco M. et al., 2013].

Повреждение липидного бислоя мембраны имеет наиболее тяжелые последствия для клеток красной крови и часто является следствием активации процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ), действия мембранных фосфолипаз, механического (в том числе осмотического) растяжения мембраны, адсорбции на липидном слое полиэлектролитов, включая некоторые белки и пептиды. Процессу ПОЛ отводится роль механизма, обеспечивающего доступность липидных и белковых компонентов для действия фосфолипаз и протеаз [Новицкий В.В. и соавт., 2006]. Активация ПОЛ затрагивает важнейшие физико-химические свойства мембран – проницаемость и фазовое состояние. Усиление ПОЛ клеточных мембран приводит к уплотнению либо деструкции липидного бислоя, повышению его микровязкости, сокращению площади белок-липидных контактов, нарушению функциональной активности ферментов, снижению барьерных свойств мембраны и поверхностного заряда, нарушению функционального состояния мембрано-рецепторного комплекса [Нгуен Т.Х., 2012]. Возникает «порочный круг»: в тканях патогенный фактор (например, недостаток O_2) нарушает энергетический обмен в клетке и стимулирует свободнорадикальные процессы, что приводит к повреждению мембран и усугубляет дефицит энергии. Снижение уровня АТФ приводит к выключению ионных насосов и накоплению в клетке поступающих из

межклеточной среды ионов кальция, который активирует мембраносвязанные фосфолипазы, инициируя гидролиз части ФЛ и увеличение проницаемости мембран. Подобный комплекс изменений в эритроцитах является неспецифическим для многих патологических состояний и представляет собой типовой патологический процесс [Новицкий В.В. и соавт., 2004].

В экспериментах *in vitro* Е.В. Ройтман и соавт. [2001] показано, что при инкубации эритроцитов в среде с различной концентрацией продуктов ПОЛ клетки красной крови немедленно реагируют снижением деформируемости и увеличением агрегируемости на изменение активности ПОЛ, что характеризует высокую степень участия этих клеток не только в гемореологии, но и в системе антиоксидантной защиты. Эритроцитарное звено первым реагирует на изменение активности свободнорадикального окисления (и, не исключено, первым исчерпывает свои компенсаторные возможности). В свою очередь, такое положение звена – «посредника» между функциональными системами предполагает, что именно эритроцитарное звено ответственно за изменения реологических свойств крови на фоне интенсификации свободнорадикального окисления [Корчина Т.Я., 2002].

Микрореологические свойства эритроцитов связаны с наличием в них эластичной белковой сети цитоскелета, локализованной на внутренней поверхности липидного матрикса, связанного с интегральными белками. Белковый цитоскелет обуславливает поведение мембраны эритроцита как упругого твердого тела [Липунова Е.А., Скоркина М.Ю., 2004]

Одним из основных компонентов цитоскелета красных клеток крови является спектрин. Спектрин представляет собой белок тетрамер, сформированный ассоциацией «голова к голове» между латерально соединенными гетеродимерами. Под влиянием деформационного сдвига происходит диссоциация тетрамера спектринов на димеры. Увеличение содержания гетеродимеров в клетке ведет к снижению стабильности мембраны эритроцитов [Li J. et al., 2007]. Конформационные

изменения в молекуле тетрамера спектрина мембраны эритроцитов могут быть как наследственными, так и приобретенными, например, вследствие дефосфорилирования α - и β -спектринов при инфекции, вызванной вирусом герпеса [Луценко М.Т., Андриевская И.А., 2009].

Актин присутствует в эритроцитах человека в двух формах: G-актин (или неполимеризованный актин) и F-актин (или полимер). Молекулы мономера актина в эритроците в основном связаны с цитоскелетом. Белок полимеризуется в вытянутые нити и обладает АТФ-азной активностью. Филаменты актина состоят из 12-17 мономеров [Сторожок С.А. и соавт., 1997]. Изменение содержания актина в мембране эритроцитов отмечается даже при заболеваниях, не связанных с первичной патологией эритрона, в частности, повышенное количество этого белка обнаруживается при остром панкреатите [Гаврилюк В.П. и соавт., 2007].

Анкирин эритроцитов человека состоит из N-концевой области, которая строится из большого числа анкириновых повторов и ответственна за прикрепление цитоскелета к мембране и взаимодействие со спектрином, и из C-концевого участка, моделирующего афинность N-областей [Ipsaro J.J. et al., 2004]. Фосфорилирование сериновых остатков анкирина опосредуется цАМФ-зависимой, а также цАМФ-независимой протеинкиназами [Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Известно, что наследственный микросфероцитоз сопровождается дефектом, прежде всего, в молекуле анкирина, что обеспечивает появление нестабильного белка в эритроцитах, изменяющего форму этих клеток [Savvides P. et al., 1993].

Белок полосы 4.1 состоит из 4 доменов: два из них ответственны за связывание с гликофорином С, кальмодулином, белком р55, белком полосы 3, спектрином, актином; третий домен предназначен для фосфорилирования протеинкиназами А и С; четвертый имеет две изоформы – массой 22 или 24 кДа, при этом последний преобладает в старых, длительно живущих клетках эритроцитарного пула [Diakowski W. et al., 2004]. Взаимодействие белка полосы 4.1 с актином и β -субъединицей спектрина укрепляет связи

между спектрином и актином, что способствует образованию прочного комплекса [Li J. et al., 2005]. Недостаток АТФ в эритроцитах нарушает фосфорилирование белка 4.1. В нефосфорилированной форме белок способствует образованию прочной связи спектрина с мембраной, которая имеет важное значение в образовании флуктуационных колебаний мембраны эритроцитов [Betz T. et al., 2009]. По данным А.Н. Chishti et al. [1996], дефицит белка полосы 4.1 мембраны эритроцитов, приводящий к ослаблению связи между актином и спектрином, способствует развитию наследственного эллиптоза.

Белок полосы 3 составляет 25% всех протеинов в мембране эритроцитов. Он представляет собой большой гликопротеин, массой 95 кДа, имеющий два функционально независимых домена. Цитоплазматический N-терминальный домен, массой 40 кДа, играет важную роль в поддержании стабильности и целостности клетки, связывая подмембранный белковый цитоскелет с двойным слоем фосфолипидов с помощью анкирина и белков полосы 4.1 и 4.2 [Wang D.N., 1994]. Мембранный C-терминальный домен с массой 55 кДа пересекает мембрану 14 раз, образуя в результате 7 внеклеточных петель, и участвует в анионном транспорте, осуществляя обмен хлоридов и бикарбонатов через плазматическую мембрану, увеличивая тем самым способность эритроцитов переносить оксид углерода из тканей в легкие [Pool J., 2000]. При частичном дефиците белка полосы 3 в мембране эритроцитов происходит нарушение ее стабильности и изменение структуры цитоскелета, что приводит к сфероцитозу и гемолитической анемии [Сторожок С.А., Санников А.Г., 1996].

Дефекты цитоскелета сопровождаются освобождением некоторого количества актина, который участвует в активации мембранного белка CFTR, способствующего высвобождению АТФ из эритроцитов [Chasan B. et al., 2002]. Деформация эритроцитов вызывает появление линий сгиба в мембране, которые образуют многочисленные дефекты в спектриновой сети. В результате дефектов поверхность актинового филамента частично

освобождается и становится способной взаимодействовать с белком CFTR клеточной мембраны. В дальнейшем актиновые филаменты активируют данный белок [Gov N.S. Safran S.A., 2005].

Для регуляции объема клетки большое значение имеют белки цитоскелета, придающие мембране свойство напряженности и метастабильности. Кроме того, актин и подобные ему белки, обладая сократимостью, могут маскировать и изменять осмотическое поведение клетки. Однако нормализация объема клетки зависит не только от упругоэластических характеристик мембраны и состояния цитоскелета, но также и от концентрации различных ионов, создаваемой функционированием транспортной системы [Скоркина М.Ю. и соавт., 2011].

Таким образом, структура мембраны эритроцитов определяет функционирование транспортных белков, деятельность которых зависит от характера липидного микроокружения. Физиологическая активность АТФаз эритроцитарной мембраны оказывает непосредственное влияние на деформируемость эритроцитов, соотношение внутри- и внеклеточных электролитов, а также целостность мембраны красных клеток крови [Tu W.-F. et al., 1998].

1.1.2. Активный транспорт эритроцитов и его дисфункция при патологии

К ферментам, осуществляющим активный транспорт ионов в мембране эритроцитов, относятся Na^+/K^+ -АТФаза и Ca^{2+} -АТФаза, которые используют гидролиз АТФ для транспорта катионов против электрохимического градиента [Walter U., Müller S., 1998]. Na^+/K^+ -АТФаза и Ca^{2+} -АТФаза являются Mg^{2+} -зависимыми ферментами, Mg^{2+} регулирует активность данных структур [Kühlbrandt W., 2004]. Функционирование АТФаз разных видов зависит от содержания внутриклеточного АТФ, образование которого происходит в ходе гликолитических реакций [Казакова В.В. и соавт., 2011].

Na^+/K^+ -АТФаза является представителем семейства катионных насосов – АТФаз Р-типа [Арелл Н.-J., 2004]. Данный фермент катализирует АТФ-зависимый транспорт ионов Na^+ и K^+ через плазматическую мембрану. На каждую молекулу гидролизованного АТФ из клетки выводятся 3 иона Na^+ и поступают 2 иона K^+ [Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Фермент состоит из каталитической субъединицы α , пересекающей мембрану 10 раз, и гликолизированной β -субъединицы, необходимой для стабилизации комплекса, при этом оба конца полипептидной цепи обращены в цитоплазму [Karlis J.D., 2003]. Та часть β -субъединицы, которая обращена во внеклеточную среду, несет на себе ковалентно присоединенные углеводные фрагменты. По массе и наличию углеводов полипептид относится к лектинам – мембранным гликопротеинам, которые ответственны за адгезию [Болдырев А.А., 2008].

Снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов отмечается при сахарном диабете типа 1 и 2. Данный факт авторы связывают с негативным действием гипергликемии, приводящей к снижению активности фермента [Шамансурова З.М. и соавт., 2009]. При терминальной почечной недостаточности происходит резкое угнетение активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроидных клеток. В патогенезе хронической болезни почек важную роль играет нарушение метаболизма ФЛ в результате активации ПОЛ. Фосфолипидное окружение, как известно, определяет функционирование интегральных белков, в том числе и активность Na^+/K^+ -АТФазы, поэтому изменение состава ФЛ мембраны эритроцитов влечет за собой модификацию активности фермента [Казарян П.А. и соавт., 2008].

Ca^{2+} -АТФаза принадлежит к семейству АТФ-аз Р-типа. Данный фермент состоит из одной белковой субъединицы, представляющей собой полипептидную цепь, которая содержит около 1200 аминокислотных остатков. Большая часть (80%) полипептидной цепи ориентирована в цитоплазму, и только короткие петли экспонированы наружу клетки. Благодаря этому Ca^{2+} -АТФаза имеет компактную мембранную, небольшую

внеклеточную и большую вытянутую внутриклеточную части [Пестов Н.Б. и соавт., 2004]. Данный фермент состоит из 10 трансмембранных доменов, из которых в регуляции работы Ca^{2+} -АТФазы участвуют несколько: область трансдукции, АТФазный домен и С-терминальная область. Трансдукционный домен участвует в конформационном изменении белка во время активации, а также содержит домен, на который свое регулирующее действие оказывают ФЛ. АТФазный домен, представляющий собой каталитическую часть белка, включает участок связывания АТФ. С-терминальный домен содержит связывающий участок для кальция/кальмодулина, который играет ключевую роль в регуляции активности Ca^{2+} -АТФазы [Holton M., 2009].

Активность Ca^{2+} -АТФазы мембраны эритроидных клеток существенно снижена при болезни Шенлейна-Геноха (геморрагический васкулит), что связано с окислительным стрессом при данном заболевании, повреждающим ФЛ, и накоплением лизофосфатидов, что сопровождается переходом липидного бислоя в монослой, активацией проницаемости мембраны для катионов, изменением конформации Ca^{2+} -АТФазы мембраны эритроцитов [Симонян Л.Г., 2010]. Снижение активности фермента имеет место также при серповидно-клеточной анемии. Распад серповидных эритроцитов приводит к высвобождению железа и железосодержащих компонентов - гемоглобина и гема, катализирующих формирование реактивных форм кислорода. Последние оказывают ингибирующее действие на активность Ca^{2+} -АТФазы мембраны красных клеток крови [Moore R.V. et al., 1992].

Кроме вышеописанных и других транспортных протеинов в мембране эритроцитов располагается большое количество белковых и полисахаридных молекул, обладающих свойствами антигенных детерминант.

1.1.3. Антигенные детерминанты эритроцитов

В настоящее время известно более 300 поверхностных эритроцитарных антигенов, которые формируют 29 систем групп крови [Daniels G., 2006]. Наиболее часто в клинической практике используются фенотипирование

эритроцитов по АВ0 и Резус-антигенам, из которых наибольшее внимание уделяется D-антигену из-за высокой его иммуногенности.

Предшественником антигенов А и В, входящих в систему АВ0, является антиген Н. Детерминанты, определяющие групповую специфичность А, В, Н имеют олигосахаридную природу. В организме они входят в состав гликолипидов, экспрессированных на мембране эритроцитов, или гликопротеинов, находящихся в тканевых жидкостях и секретах организма (слюна, слизь кишечника), или существуют в виде свободных олигосахаридов, которые экскретируются преимущественно с мочой [Перехрестенко И.М. и соавт., 2000]. Гены *a* и *b*, входящие в локус АВ0, расположенный на 9-й хромосоме, кодируют А- и В-гликозилтрансферазы, присоединяющие к фукулизированному остатку галактозы Н-антигена N-ацетилгалактозоамин с образованием антигена А или остаток галактозы с образованием антигена В. Аллель 0 кодирует белок, не обладающий гликозилтрансферазной активностью, и поэтому у лиц с генотипом 0/0 на эритроцитах экспрессирован только антиген Н, а в секретах лиц с группой крови 0 обнаруживается только вещество Н [Фесенко Д.О. и соавт., 2010].

Кроме того, внутри групп крови системы АВ0 существуют деление на подгруппы. Группа крови с нормальным количеством антигена называется А и отличается от подгрупп, которые классифицируют по количеству антигена. Содержание его снижается в порядке убывания в следующем ряду - А₁, А₂, А₃, А_х, А_{end}, А_м, А_{el}. Кроме того, подгруппы группы крови В классифицируются по количеству антигена В. При этом содержание антигена уменьшается в ряду - В, В₃, В_х, В_м, В_{el}. Группу крови АВ также классифицируют на 9 подгрупп (А_хВ, А₁В_х, А_мВ, А₁В_м, А_{el}В, А₁В_{el}, cisА₂В₃, cisА₂В, cisА₁В₃) [Hosoi E., 2008].

В системе Резус, кроме антигена D, выделяют несколько видов антигенных детерминант, среди которых наиболее трансфузионно опасные (по частоте встречаемости антител к данным антигенам эритроцитов) формируют шкалу иммуногенности: D > К > Е > с > Сw > е > С > другие

[Донсков С.И., Липатова И.С., 2001]. При этом N.D. Avent и M.E. Reid [2000] показали, что первые 45 аминокислот N-терминального участка молекулы антигена D и антигенов C, E, e являются идентичными, и белок антигена D отличается от антигенов C и E только 35 аминокислотами. Несмотря на высокую степень соответствия, различные белки RhCcEe не экспрессируют антигенные детерминанты D, как и белок RhD не экспрессирует антигены C или e.

Rh-белки взаимодействуют с липидным бислоем при помощи пальмитирования. Они осуществляют присоединение ацильного радикала (ацилирование) остатков пальмитиновой кислоты, расположенных возле боковых цепей цистеина. Данные остатки цистеина, как предполагается, находятся на границе цитозоля и липидного бислоя [Umenishi F. et al., 1994].

Известен редкий фенотип «Резус-нуль», который характеризуется отсутствием всех антигенов системы Резус. У лиц с подобным фенотипом диагностируются гемолитическая анемия, сфероцитоз, стоматоцитоз и снижение осмотической резистентности эритроцитов, в которых обнаружено увеличение активности Na^+/K^+ -АТФазы, не связанное с поступлением ретикулоцитов в кровь из костного мозга [Ballas S. et al., 1984].

В последнее время были открыты Rh-ассоциированные протеины: RhAG на эритроцитах и сходные с ними протеины - RhBG и RhCG в других тканях. Эритроидный RhAG не ассоциирован с антигенами групп крови, но очень важен для экспрессии RhCcE и RhD на мембране красных клеток крови, и мутация в RhAG ответственна за отсутствие Резус-антигенов на мембране эритроцитов («Резус-нуль» фенотип) [Westoff C.M. et al., 2008]. Неэритроидные Rh-гликопротеины RhBG и RhCG локализованы в клетках почек, печени, головного мозга и кожи [Westoff C.M. et al., 2004].

В почках данные гликопротеины располагаются на базолатеральной и апикальной мембране вставочных клеток собирательных канальцев, где участвуют в транспорте аммиака из интерстиция в просвет канальца. В печени RhBG локализуется на базолатеральной мембране гепатоцитов и

участвуют в поглощении аммиака внутрь клеток. RhCG расположены в эпителиальных клетках желчных протоков, где с помощью данного гликопротеина осуществляется секреция аммиака в желчь [Weiner I.D., Verlander J.M., 2003].

Система **Kell** представляет собой сложный комплекс, содержащий 24 антигена, расположенных на гликопротеине массой 93000 кДа. Данный протеин экспрессирован на поверхности эритроцита, охватывает всю толщину мембраны клетки и присоединен к цитоскелету. Гликопротеин Kell содержит 12% углеводов, а все остальное – N-гликозиды [Lee S. et al., 1991].

Антиген **Диего**, известный как белок полосы 3, является одним из наиболее многочисленных гликопротеинов, располагающихся на поверхности эритроцитов. Он действует в качестве сайта связывания гемоглобина, ионов Ca^{2+} и гликолитических ферментов; играет роль в старении клетки [Daniels G., 2006].

Антиген **Kidd** представляет собой гликопротеин, участвующий в транспорте мочевины. Он присутствует на эритроцитах и эндотелиоцитах почечных канальцев. Гликопротеин состоит из 391 аминокислоты с 10 трансмембранными доменами и гликозирванным сайтом на третьей внеклеточной петле [Dimonte D.M., Pepe M., 2004].

Антигены системы **Knops** расположены на рецепторе комплемента типа 1 ((CR1) complement receptor 1) или CD (cluster of differencitation) 35. К настоящему времени известны 9 антигенов данной системы, каждый из которых имеет соответствующий номер [Li Q. et al., 2010].

Основной функцией CD35-молекулы, экспрессированной также на иммунокомпетентных клетках, является связывание и процессинг иммунных комплексов, а также транспорт их в печень и селезенку для удаления из кровотока [Daniels G., 2006].

CD35 является трансмембранным гликопротеином, который предотвращает чрезмерную активацию комплемента путем ингибирования C3- и C5-конвертаз во всех путях активации комплемента (классическом,

альтернативном и лектиновом). У этого белка есть два функционально отличных участка: первый связывает, главным образом, C4b-компонент комплемента и участвует в ускорении распада конвертазы классического пути, в то время как две почти идентичных копии второго участка связывают C3b и в меньшей степени C4b [Brouwers N. et al., 2012]. Наличие аспарагиновой кислоты в 1009 положении первого участка способствует связыванию C3b. Мутация в участке 2, ответственном за наличие лизина в 929 положении, вызывает снижение сродства к C4b-компонента комплемента, в то время как удаление положительного заряда из участка 2 не настолько важно вследствие компенсации другими основными аминокислотными цепями [Smith B.O. et al., 2002].

CD55 (фактор ускорения диссоциации) относится к антигенам системы **Cromer** и представляет собой фосфатидилинозитольный якорный белок, который ингибирует C3 и расщепляет C5 компоненты комплемента за счет ускоренного распада C3- и C5-конвертаз [Liu J. et al., 2005]. N-концевая цепь белка состоит из 4 участков, характерных для белков, контролирующих работу системы комплемента, за которыми следует богатая серином и треонином область, содержащая множество O-гликозидных олигосахаридных цепей. CD55 связан с мембраной через гликозилфосфатидилинозит. CD55 экспрессирован на клетках, находящихся в контакте с плазмой крови. Одна из дополнительных функций данной молекулы – это взаимодействие с CD97-маркером, экспрессирующимся на лейкоцитах во время воспалительного ответа, но значение такой кооперации мало изучено [Lucasik P. et al., 2004].

Другим фосфатидилинозитольным якорным белком является мембранный ингибитор лизиса CD59, который не относится к системе антигенов, но его молекула подобна антигенам систем Donbros, Cromer [Anstee D.J., 2011]. Он подавляет образование и внедрение мембраноатакующего комплекса путем связывания компонентов комплемента C7 и C9. У пациентов с пароксизмальной ночной

гемоглинурией уровень экспрессии на эритроцитах CD55 и CD35 не изменяется, а экспрессия CD59 снижается [Hill F. et al., 2006].

К семейству углеводных молекул относятся антигены системы **Lewis**. Известны две основные молекулы – Le^a и Le^b [Ornoft T.F. et al., 2004]. Экспрессия этих антигенов на эритроцитах определяется взаимодействием генов Lewis с генами H и SE, ответственными за присутствие антигенов системы ABO в слюне, плазме и тканевых жидкостях. В отличие от антигенов ABO антигены Lewis на эритроцитах пассивно приобретаются из гликолипидов сыворотки, в то время как на антиген H оказывает влияние секреторный ген [Sanders., Kern M.A., 1999].

MNSs-антигены также имеют полисахаридную природу и расположены на гликофоре A и гликофоре B. Эта система состоит из более чем 40 различных антигенов [Palacajornsuk P., 2009]. Гликофоры – это сиалосодержащие гликопротеины, имеющие внутриклеточный домен, один трансмембранный сегмент и короткий цитоплазматический домен [Геннис Р., 1997]. Гликофорин A несет антигены M и N. Экспрессия антигена M обеспечивается наличием серина и глицина в положениях 1 и 5 гена гликофорина A, а экспрессия антигена N – лейцином и глутаминовой кислотой в тех же положениях. Гликофорин B несет, соответственно, антигены S и s. Полиморфизм Ss зависит от одиночной замены аминокислоты в 29 положении. Экспрессия антигена S обеспечивается наличием метионина, а s – треонина [Palacajornsuk P., 2006].

Гликофоры A и B – самые многочисленные белки эритроцитарной мембраны; суммарное число их копий на клетку составляет 10^6 . Богатые полисахаридами экстраклеточные домены белков придают поверхности сильный отрицательный заряд, который, как считается, предотвращает прилипание эритроцитов друг к другу и к другим клеткам. Гликофоры A и B высокогомологичны. В сравнении с гликофором A, у гликофорина B утрачена часть внешнего домена и укорочен цитоплазматический участок [Оловникова Н.И., Николаева Т.Л., 2001].

Гликофорины С и D являются минорными сиалогликопротеинами эритроцитарной мембраны. При этом гликофорин D идентичен гликопротеину С, но короче его на 21 аминокислоту. Эти белки выполняют важную роль в формировании и регуляции формы эритроцита и механических свойств мембраны, образуют связь с белками цитоскелета [Сибирна Н.О., Буслик Т.В., 2009]. Установлено, что гликофорины С и D участвуют в образовании нескольких типов связей с белками цитоскелета. Аминокислотные остатки 82-98 гликопротеина С (61-77 гликофорина D) участвуют в образовании связи с белком полосы 4.1 цитоскелета эритроцитов, а остатки 112-128 аминокислот гликофорина С (91-107 гликопротеин D) связываются с белком р55, который участвует в образовании высокоафинной связи с белком полосы 4.1, и данная связь скрепляет цитоскелет и плазматическую мембрану эритроцитов [Chasis J.A., Mohandas N., 1992]. Уменьшение содержания гликофорина С проявляется рецессивно наследуемой анемией с эллиптоцитозом. Снижение количества гликофорина С на мембране эритроцитов является причиной низкой деформационной способности красных клеток крови [Сторожок С.А. и соавт., 1997].

Мембрана эритроцита является сложно организованной молекулярной структурой, определяющей весь спектр его иммунологических, морфологических и функциональных характеристик. Состоятельность барьерной функции мембраны эритроцита определяет ее целостность и возможность существования клетки. Повреждение плазмолеммы ведет к гибели эритроцита (гемолизу), что является логическим завершением его жизненного цикла и усиливается при первичной патологии клеток красной крови или под действием агрессивных факторов среды.

1.2. Этиология и патогенез гемолитических реакций

1.2.1. Механизмы гемолитических реакций в норме и при патологии

Известно, что гибель эритроцитов осуществляется путем внутриклеточного или внутрисосудистого гемолиза [Fendel R. et al., 2010]. Внутрисосудистый гемолиз представляет собой разрушение эритроцитов с освобождением содержимого клетки в плазму. Причинами деградации мембраны клеток красной крови и их разрушения могут быть: механическая травма, фиксация комплемента и активация его на клеточной поверхности, а также инфекционные агенты и множество других факторов [Dhaiwai G.P. et al., 2004]. Внутрисосудистый гемолиз сопровождается появлением свободного гемоглобина в крови. Этот продукт распада эритроцитов образует стабильный комплекс с гаптоглобином, который разрушается тканевыми макрофагами [Gordon S., 2001]. При интенсивном гемолизе гемоглобин преципитирует в почечной ткани, что приводит к острой почечной недостаточности [Zuwala-Jagiello J., 2006].

В физиологических условиях в основном происходит внутриклеточный гемолиз, заключающийся в удалении и разрушении красных клеток крови с измененной мембраной в макрофагах селезенки и печени. Циркулирующая кровь непрерывно фильтруется через тонкостенные селезеночные тяжи в синусоидах этого органа, а также проходит через лабиринт макрофагов с многочисленными ответвлениями [Gladwin M.T. et al., 2012]. Нормальные эритроциты с диаметром 7-8 мкм деформируются и проходят через отверстие размером 3 мкм в селезеночных тяжах. Клетки со структурными изменениями в мембране (включая фиксированные антитела) не проходят через фильтр и фагоцитируются макрофагами [Chadburn A., 2000].

При патологии ведущим механизмом гемолиза может стать внутрисосудистый путь разрушения эритроцитов. В этом случае комплекс «гаптоглобин-гемоглобин» распознается скавенджер-рецептором для гемоглобина (CD163), расположенным на поверхности моноцитов/макрофагов. Этот рецептор связывает данный комплекс и опосредует его эндоцитоз и разрушение. Однако связывающая способность гаптоглобина ограничена, поэтому образование большого количества

свободного гемоглобина приводит к быстрому истощению гаптоглобина [Rother R.P., 2005].

Связывая гемоглобин и удаляя его из кровообращения, гаптоглобин предотвращает поступление в плазму крови свободного железа, которое может индуцировать генерацию кислородных радикалов в организме, и тем самым осуществляет антиоксидантную функцию [Sadrzadeh S.M.H., Vozorgmehr J., 2004].

1.2.2. Дисфункция эритроцитов как причина интенсификации гемолитических реакций

В основе снижения гемолитической стойкости эритроцитов лежат разнообразные нарушения их структуры и функции, которые могут быть приобретенными и наследственно обусловленными. Последние классифицируются на мембранопатии (патология мембраны эритроцитов), энзимопатии (дефицит каких-либо ферментов) и гемоглобинопатии (дефекты синтеза гемоглобина) [Соколова Т.А., 2012]. Следует отметить, что при генетически детерминированных аномалиях эритроцитов мембрана клеток может вовлекаться в патогенез гемолиза как непосредственно – вследствие мутаций в генах мембранных и цитоскелетных белков (что было рассмотрено выше), так и опосредованно – при возникновении мутаций в генах глобина или некоторых ферментов клетки [Mohandas N., Gallaher P.G., 2008].

Первичная патология цитолеммы эритроцитов характерна для наследственных мембранопатий – микросфероцитоза, эллиптоцитоза, акантоцитоза и стоматоцитоза, среди которых наиболее часто встречается наследственный микросфероцитоз [Gallaher P.G., 2005]. Вторично в патогенез гемолитических реакций мембрана вовлекается при серповидно-клеточной анемии, талассемии, дефиците глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г-6-ФДГ), пируваткиназы и других ферментопатиях [Sarmaik S.A., 2005].

Так, серповидно-клеточная анемия (качественная гемоглобинопатия) связана с наследственным нарушением синтеза гемоглобина, возникающим в

результате мутации, связанной с заменой глутаминовой кислоты валином в β -цепи глобина [Wood K.C., Granger D.N., 2004]. Восстановленная форма серповидного гемоглобина (HBS) имеет низкую растворимость внутри эритроцита, поэтому агрегирует и полимеризуется, образуя тактоиды (кристаллы HBS), которые нарушают целостность эритроцитарной мембраны [Lei H., Karniadakis G.E., 2012].

При наследственном дефиците Г-6-ФДГ гемолиз протекает как по внутрисосудистому, так и по внутриклеточному пути и связан со свободнорадикальным повреждением мембраны эритроцитов [Cappellini M.D, Fiorelli G., 2008]. Г-6-ФДГ, образуя НАДФН, участвует в редукции глутатионсульфида, восстановленная форма которого препятствует денатурации гемоглобина, предохраняет от окисления SH-группы мембранных белков красных клеток крови и участвует в обезвреживании пероксида водорода и активных форм кислорода [Лакмоя Л.А., 2006; Luzzatto L., 2006; Скорнякова Е.А. и соавт., 2007]. Ген, кодирующий Г-6-ФДГ, расположен в области теломеры длинного плеча X-хромосомы, что обуславливает наследование данного заболевания, как рецессивного, сцепленного с X-хромосомой. При недостатке фермента образуются свободные радикалы, которые вызывают окисление сульфгидрильных групп цепей гемоглобина, что ведет к денатурации гемоглобина с образованием преципитатов (тельца Гейнца). Эритроциты, имеющие подобные включения, при прохождении через селезеночные тяжи распознаются макрофагами, которые «выкусывают» включения вместе с частью цитоплазмы и мембраны клетки, способствуя образованию «надкусанных» эритроцитов (дегмациты). В результате повреждения мембраны одновременно формируются сфероциты. Все эти изменения предрасполагают к захвату эритроцитов макрофагами селезенки и их гибели путем эритрофагоцитоза [Saad A., Cualing H., 2002].

Причиной развития приобретенных гемолитических анемий могут быть различные факторы, включая механическую травму эритроцитов, действие

бактериальных гемолизинов, фиксацию антител на поверхности мембраны красных клеток крови и разрушение эритроцитов путем комплемент-опосредованного лизиса, несовместимость по эритроцитарным антигенам, альтерацию мембраны эритроидных клеток свободными радикалами и др. [Sowemimo-Coker S.O., 2002].

Возможно также формирование повышенной чувствительности эритроцитов к лизису системой комплемента, имеющей 3 пути активации: классический, альтернативный и лектиновый. Например, у пациентов с пароксизмальной ночной гемоглобинурией альтернативный путь находится в состоянии непрерывной активации, что объясняет возникновение гемолиза в основном в ночное время. Эритроциты таких пациентов становятся чувствительными к комплемент-опосредованному лизису из-за снижения или полного отсутствия на эритроцитах двух важных мембранных белков – регуляторов комплемента – CD55 и CD59 [Brodsky R.A., 2008].

Кроме того, разрушение эритроцитов происходит вследствие опосредованного антителами комплемент-зависимого лизиса. Одной из причин разрушения эритроидных клеток является включение в их мембрану гидрофобного макромолекулярного комплекса, состоящего из терминальных белков каскада комплемента C5b-9, который увеличивает проницаемость мембраны красных клеток крови для катионов [Шурхина Е.Н. и соавт., 2003].

Существенный вклад в развитие гемолитических реакций вносят тепловые аутоантитела, которые представляют из себя иммуноглобулины G. Прикрепляясь к поверхности эритроцитов, тепловые реактивные антитела фиксируют комплемент. Когда эритроциты, покрытые антителами или комплементом, проходят через ретикулоэндотелиальную систему, они улавливаются и частично или полностью поглощаются макрофагами [Rackman C.H., 2008]. Холодовые аутоантитела (иммуноглобулины M) слабо связываются красными клетками крови и реже инициируют активацию полного каскада комплемента, завершающуюся внедрением

мембраноатакующего комплекса и возникновением внутрисосудистого гемолиза [Dhaliwai G.P. et al., 2004].

Гемолиз эритроцитов может быть вызван также лекарственными средствами. В данном случае, механизм заключается в том, что препарат конъюгирует с растворимым белком-носителем, образуя гаптен. Это приводит к последующему формированию высокоафинных антител, которые при комбинации с лекарственными средствами формируют комплекс «антитело-лекарство». Данные комплексы прикрепляются неспецифически к эритроцитам и запускают последующий комплемент-зависимый лизис красных клеток крови [Garratty G., 2010].

Механический гемолиз возникает при высвобождении гемоглобина в плазму при разрушении клеточной мембраны, индуцированном внешними механическими силами: чрезмерной силой сдвига, возникающей из-за высокого градиента давления, прямого внешнего воздействия и тромботических микроангиопатий (гемалитико-уремический синдром и тромбоцитопеническая пурпура) [Lee S.S. et al., 2004]. Впервые механический гемолиз был описан при маршевой гемоглобинурии у спортсменов и бегунов. Механизм гемоглобинемии обусловлен механической травмой стопы, что подтверждается низким содержанием гаптоглобина в сыворотке и высоким уровнем сывороточного железа после тренировки, особенно у нетренированных лиц [Robinson Y. et al., 2006].

Механический внутрисосудистый гемолиз может возникать и после замены сердечного клапана, что является серьезным осложнением данной операции. Гемоглобинемия выявляется у 5-15% пациентов, протезированных с применением шарового клапана. При этом хронический гемолиз может возникать у пациентов даже с механическим и биологическим клапанными протезами. Гемолиз происходит из-за турбулентного потока с высоким напряжением сдвига и аномальными струями, проходящими через клапанный протез [Shivakumaraswamy T. et al., 2006].

Известны случаи формирования приобретенной гемолитической анемии при глубоком дефиците витамина Е, который является антиоксидантом и предотвращает окисление ненасыщенных жирных кислот в мембране эритроцитов, препятствуя тем самым преждевременному эритролизису [Jilani T., Iqbal M.P., 2011]. Показано, что назначение витамина Е пациентам с дефицитом Г-6-ФДГ может играть протективную роль в антирадикальной защите мембраны эритроцитов, способствуя сохранению красных клеток крови [Sultana N. et al., 2009].

Таким образом, причины инициации гемолитических реакций разнообразны и связаны с действием различных факторов на клетки красной крови. Между тем, возможны состояния, при которых эритроциты подвергаются сочетанному воздействию целого ряда подобных стимулов. Это характерно для перфузионной травмы клеток крови при искусственном кровообращении (ИК), сопровождающемся внутрисосудистым гемолизом и ярко выраженной гемоглобинемией.

1.3. Патогенез внутрисосудистого гемолиза при искусственном кровообращении

1.3.1. Устройство аппарата искусственного кровообращения и цитодеструктивные эффекты его компонентов

Аппарат ИК применяется при коронарном шунтировании, хирургической коррекции врожденных и приобретенных пороков сердца [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007]. Однако аппарат ИК оказывает негативное воздействие на клетки крови [Mulholland J. et al., 2000], в первую очередь эритроциты, способствуя их травматизации и последующему гемолизу [Vercaemst L., 2008]. Основными компонентами аппарата ИК являются насос («искусственное сердце»), оксигенатор («искусственные легкие») и система трубок («искусственная сосудистая система»). Дополнительными компонентами являются теплообменник (в большинстве случаев соединенный с оксигенатором), кардиоплегическая канюля, датчики-

детекторы воздушной эмболии и артериальные фильтры [Misgeld V.J.E., 2006].

Насосы выполняют функцию сердца в аппарате ИК, обеспечивая циркуляцию крови в устройстве. Основная причина травмы эритроцитов в данном компоненте аппарата ИК связана с действием напряжения сдвига на красные клетки крови [Reul H.M, Akdis M., 2000]. На сегодняшний день существует три типа насосов, применяемых в аппаратах искусственного и вспомогательного кровообращения. Это насосы роликовые, центрифужные и желудочковые. Наиболее распространенным видом насосов, применяемых в последние тридцать лет, являются роликовые насосы, которые и составляют основу современных аппаратов ИК. Устройство ИК обычно оснащены 3-5 насосами [Murphy G.S. et al., 2009].

Основной насос – артериальный, производительность которого должна быть не менее 6 л/мин, чтобы обеспечить необходимый минутный объем кровообращения. Второй насос необходим для дренажа левого желудочка, третий – коронарный, предназначен для забора крови из раны и обеспечения «сухого поля». Четвертый насос нужен для проведения кардиоплегии [Локшин Л.С. и соавт., 1998].

Оксигенаторы осуществляют насыщение крови кислородом и удаляют из нее углекислый газ. Гемолитические реакции в оксигенаторе обусловлены действием центробежной силы, образующей пузырьки в крови, что является причиной травмы форменных элементов крови, в том числе красных клеток крови [Drummond M., et al. 2005]. Существуют 3 основных типа оксигенаторов, используемых для ИК. Первые два представляют собой перфузионное устройство, обеспечивающее газообмен при помощи контакта крови с атмосферой, насыщенной кислородом (дисковые оксигенаторы) или путем вдувания кислорода непосредственно в кровь (пузырьковые оксигенаторы). В настоящее время используются мембранные оксигенаторы, которые обеспечивают газообмен крови через полупроницаемую мембрану [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007]. Поверхность мембранного

оксигенатора может представлять собой пластину с микропорами, покрытую полипропиленом или силиконом. Поры имеют диаметр 50-300 мкм и обеспечивают прямое взаимодействие газа с кровью, что способствует потере плазмы в газовой фазе. Силиконовые мембраны считаются истинными и препятствуют утечке плазмы в газовую фазу [Machin D., Allsager C., 2006].

Магистралы – это трубки, связывающие различные функциональные элементы экстракорпорального контура между собой и сам контур с пациентом. Контакт крови с магистралями аппарата ИК в наибольшей степени способствует активации системы комплемента [Scarola C., 2010]. Магистралы производят из различных материалов в зависимости от функциональной нагрузки, которую они несут. Покрытие поверхности магистралей играет роль в снижении взаимодействия между кровью и контуром аппарата ИК. Чаще всего используется гепариновое покрытие [Murphy G.S. et al., 2009].

Несмотря на вполне достаточную заместительную функцию аппарата ИК, он создает нефизиологические условия для циркуляции крови. В пределах экстракорпорального контура действуют различные факторы, приводящие к деструкции эритроцитов.

1.3.2. Патогенетические факторы гемолиза при искусственном кровообращении

В целом причины гемолиза во время ИК были определены еще E. Reigse в 1969 г. – это воздействие насоса и сил поверхностного натяжения в пузырьковых оксигенаторах; сил сдвига, возникающих благодаря внезапным изменениям площади поперечного сечения канюль и трубок; струйных сил, которые имеют место при высокой скорости движения клеток крови. Позже J. Mulholland и соавт. [2000], И.И. Дементьева и соавт. [2008] перечислили основные динамические силы, приводящие к травме клеток крови: положительное или отрицательное давление, напряжение сдвига, силы

гидродинамического удара, контакт с неэндотелиальной поверхностью, интерфейса «кровь-газ».

Было также высказано предположение относительно повреждения клеток крови за счет турбулентного потока. Эта теория основывалась на том, что клеточные мембраны разрушаются при воздействии выраженного напряжения сдвига. Последнее может происходить в тех частях экстракорпорального контура, где регистрируются высокие линейные скорости потока, например в катетерах и канюлях с нарушением ламинарного потока и его переходом в турбулентный. Именно поэтому поддержание ламинарного потока при высоких объемных скоростях возможно только в канюлях и катетерах большого диаметра [Дементьева И.И. и соавт., 2010].

Экспериментальные исследования показали, что гемолитическая стойкость эритроцитов зависит от напряжения сдвига в большей степени, чем от времени экспозиции данного фактора [Wurzinger I.J. et al., 1986]. Во время перфузии красные клетки крови подвергаются влиянию резких перепадов давления, что имеет различную продолжительность в зависимости от модели насоса [Vieira F.U. J., 2009].

Считается, что кардиотомный отсос является основным источником гемолиза, поступления плотных и газовых микроэмболов, капель жира и клеточных агрегатов. Причина данных неблагоприятных эффектов связана с количеством воздуха, которое аспирируется вместе с кровью. Серьезная травма эритроцитов в кардиотомном отсосе объясняется тем, что воздух имеет более низкую вязкость, чем кровь, и поэтому вентиляционные потоки засасываются быстрее [Vercaemst L., 2008].

Существуют и другие точки зрения. Так, согласно данным J.W. Mulholland и соавт. [2000], повреждение клеток крови за счет кардиотомного отсоса не имеет основного значения. Наибольший прирост свободного гемоглобина в их исследованиях отмечался при воздействии на кровь сочетания интерфейсы «воздух-кровь» и отрицательного

давления. Меньший прирост свободного гемоглобина был зарегистрирован при раздельном воздействии на кровь этих факторов. Исследователи предположили, что скорость движения клеток крови в линии отсоса небольшая, поэтому напряжение сдвига в линии отсоса меньше по сравнению с напряжением сдвига в основной части экстракорпорального контура. Однако скорость движения клеток крови не является ведущим фактором в развитии травмы форменных элементов. Решающее значение имеет высокая скорость поступления воздуха в линию отсоса [Wright G., 2001].

Активация комплемента при ИК происходит, главным образом, через альтернативный путь и индуцируется контактом крови с поверхностью экстракорпорального контура. Так как эндотелиальные клетки кровеносных сосудов содержат ингибиторы, которые ограничивают активацию C3, то в неэндотелизированном экстракорпоральном контуре C3-компонент комплемента активизируется и запускает альтернативный путь, что приводит к формированию мембраноатакующего комплекса и альтерации эритроцитов [Scarola C.M., 2010]. Назначение протамина и в дальнейшем формирование гепарин-протаминовых комплексов активируют комплемент через классический путь активации. Однако степень активации комплемента зависит от сложности операции и развития последующих осложнений [Bruins P. et al., 2008].

Активация лектинового пути комплемента происходит в результате взаимодействия маннозо-связывающего лектина с ишемизированной и травмированной тканью [Bilgin Y.M. et al., 2008; Hoedemackers C. et al., 2010]. Активированные компоненты комплемента являются вазоактивными и цитотоксическими анафилактоксинами (C3a, C4a и C5a). Анафилактоксические пептиды вызывают повреждение тканей с помощью привлечения из кровотока нейтрофилов, тучных клеток, базофилов и эозинофилов [Soulika A.M. et al., 2000].

Системная или локальная интраоперационная гипотермия также вызывает ряд нежелательных эффектов: снижение температуры тела сопровождается вазоспазмом и централизацией кровотока; за счет холодого диуреза и вытеснения жидкости в интерстиций возрастает вязкость крови, что усугубляет нарушение микроциркуляции. Возникновение спазма периферических сосудов в совокупности со сдвигом кривой диссоциации оксигемоглобина влево приводит к тканевой гипоксии, нестабильности клеточных мембран, повышению травматизации форменных элементов крови и проницаемости гематоэнцефалического барьера [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007]. В период согревания – реперфузии – резко повышается потребность в кислороде, развивается гипоксия тканей, нарастает метаболический ацидоз. Кроме того, нормализация температуры после гипотермии требует удлинения времени ИК, что увеличивает продолжительность контакта крови с чужеродными субстанциями и усугубляет системный воспалительный ответ [Агеева М.В. и соавт., 2011].

Гипероксия усиливает образование активных форм кислорода: супероксид-аниона (O_2^-), гидроксил-радикала (OH^\cdot), пероксида водорода (H_2O_2). Данные агенты взаимодействуют с системой антиоксидантных ферментов, опосредуя тем самым их истощение [Martins G.F. et al., 2011]. В итоге это приводит к усилению липидной пероксидации в мембране клеток, а также к снижению концентрации эндогенных антиоксидантов в цитоплазме клеток крови [Hawkins J., 2006].

Совокупность перечисленных факторов обуславливает перфузионное повреждение эритроцитов во время ИК и поступление в кровоток свободного гемоглобина, который обладает токсическим влиянием на организм и, в конечном итоге, является причиной возникновения органных дисфункций у пациентов в интра- и послеоперационном периоде.

1.4. Негативное влияние свободного гемоглобина на организм кардиохирургических больных

Одним из наиболее грозных осложнений сердечно-сосудистых операций, выполняемых в условиях ИК, является сочетание недостаточности функций различных органов и систем – синдром полиорганной недостаточности. Наиболее часто данный синдром характеризуется нарушением оксигенирующей функции легких, печеночно-почечной недостаточностью, постгипоксическим повреждением центральной нервной системы, нарушением в системе гемостаза, угнетением иммунитета [Бабаев М.А., 2011]. Часто полиорганные нарушения обусловлены высоким уровнем свободного гемоглобина, негативно влияющим на организм человека [Rother R.P. et al., 2005].

Показано, что растворы гемоглобина индуцируют повышение артериального давления и кровотока даже в малых дозах [Cohn S.M., Farrell T.J., 1995]. Клинически это может проявляться в виде легочной гипертензии. Механизм, посредством которого происходит вазоконстрикция, заключается в связывании и инактивировании гемоглобином монооксида азота (NO). Так как NO является ключевым медиатором, который осуществляет физиологическую регуляцию вазодилатации сосудов, то его инактивация приводит к спазму сосудов легкого [Figueiredo I.F.P. et al., 1997]. Кроме того, A. Schäfer и коллеги [2007] показали, что монооксид азота, продуцируемый NO-синтазой, ингибирует активацию тромбоцитов и может полностью изменять агонист-индуцированную активацию гликопротеина IIb/IIIa (рецептора к фибриногену).

Гемоглинурия является одним из ведущих клинических признаков выраженного внутрисосудистого гемолиза. Продукт распада эритроцитов, содержащийся в плазме, фильтруется через почечные клубочки и активно реабсорбируется в эпителиоцитах проксимальных канальцев с последующим формированием в них гемосидерина. При превышении реабсорбирующей способности почек наблюдается клинически значимая гемоглинурия. Острая почечная недостаточность может возникнуть во время тяжелых эпизодов гемоглинурии [Rother R.P. et al., 2005].

Редким, но грозным осложнением гемоглобинемии является энцефалопатия. Распад большого количества свободного гемоглобина в крови ведет к высвобождению железа, которое длительное время накапливается и опосредует активацию перекисного окисления липидов в головном мозге. Эти реакции потенцируются аскорбиновой кислотой и блокируются хелатором железа – дефероксамином [Sadrzadeh S.M.H., Vozorgmehr J., 2004].

Возникновение энцефалопатии связано также с гипербилирубинемией за счет непрямого билирубина, который обладает нейротоксическим действием. Показано, что ранняя послеоперационная гипербилирубинемия после ИК сопряжена с высоким уровнем смертности больных [Vercaemst L., 2008].

Таким образом, влияние гемоглобинемии на организм пациентов является сложным, многоплановым и определяет функционирование многих органов и систем в послеоперационном периоде, от чего зависят сроки реабилитации пациентов и, в конечном счете, успех хирургического вмешательства. При этом главная роль в модуляции степени выраженности интраоперационного гемолиза отводится типу перфузиологического оборудования и особенностям ведения экстракорпоральной перфузии. Между тем, исходное морфофункциональное состояние клеток красной крови у кардиохирургических больных может также влиять на интенсивность гемолиза, учитывая, что пациенты вступают в интраоперационный период уже с имеющейся дисфункцией периферического звена эритрона. Следует отметить, что среди нозологий, хирургическое лечение которых проводится в условиях ИК, в настоящее время лидирует ишемическая болезнь сердца (44%); приобретенные и врожденные пороки сердца занимают второе (29,2%) и третье (26,8%) место соответственно [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007].

1.5. Патология эритроцитов при ишемической болезни

1.5.1. Краткие сведения об ишемической болезни сердца и методах ее лечения

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) представляет собой нарушение функции сердца, возникшее под влиянием недостаточного кровоснабжения органа [Карпов Р.С. и соавт., 2004]. Основной причиной возникновения ИБС является наличие атеросклеротической бляшки в просвете коронарной артерии, что приводит к ограничению кровоснабжения сердца. В меньшей степени возникновение ИБС обусловлено спазмом сосудов и тромбозом коронарных артерий [Thames M.D. et al., 2004].

Патогенез ИБС связан с прогрессирующим снижением коронарной перфузии и последующей гипоксемией, приводящими к нарушению миокардиального метаболизма, продукции активных форм кислорода и клеточной гибели [Wattanapitauacul S.K., Bauer J.A., 2001]. По данным литературы, повреждение клеток миокарда, индуцированное циклами ишемии и реперфузии, может быть связано с образованием таких реактивных форм кислорода, как супероксид-радикал, перекись водорода и гидроксильные радикалы. Источниками образования реактивных форм кислорода являются как внутриклеточные структуры (митохондрии, ксантиноксидаза), так и внеклеточные — нейтрофилы и макрофаги [Сыровая А.О. и соавт., 2012].

Во время ишемии миокарда образуется лактат, накопление которого приводит к внутриклеточному ацидозу. В условиях ацидоза кардиомиоциты не используют всю энергию, освобождающую при распаде АТФ для сократительной работы, поскольку часть энергии расходуется на поддержание кальциевого гомеостаза. Увеличение потребления молекул АТФ связано с интенсивной работой саркоплазматического Ca^{2+} -насоса [Gerstenblith G., 2004].

ИБС может иметь разнообразные клинические проявления. Выделяют несколько клинических форм заболевания: стабильная стенокардия напряжения и покоя; острый коронарный синдром (нестабильная

стенокардия и инфаркт миокарда); безболевого ишемия миокарда; вариантная стенокардия; стенокардия, обусловленная нарушением или дисфункцией микрососудов (синдром Х); нарушения сердечного ритма; сердечная недостаточность; внезапная смерть [Фролова Е.В., 2008].

В лечении ИБС используются немедикаментозная терапия, фармакологическое воздействие и хирургические вмешательства. Немедикаментозная терапия заключается в проведении различного вида физических тренировок и психотерапии [Самородская И.В., 2003].

Фармакологическое лечение ИБС включает следующие группы препаратов: **липидоснижающие/антиатеросклеротические** препараты (статины, фибраты, никотиновая кислота); **антиагреганты** (ацетилсалициловая кислота, клопидогрель, тиклопидин, дипиридамо, индобуфен); **антиангинальные** препараты (β -адреноблокаторы, блокаторы кальциевых каналов и нитраты), а также некоторые **метаболические** средства (триметазидин, ранолазин) [Лутай М.И., Лысенко А.Ф., 2004].

Хирургическое лечение больных с ИБС осуществляется путем коронарного шунтирования на остановленном или работающем сердце, транслюминальной баллонной ангиопластики со стентированием коронарных артерий или без него, трансмиокардиальной лазерной реваскуляризации миокарда [Голухова Е.З., Какучая Т.Т., 2007].

Техника операции транслюминальной подкожной ангиопластики заключается в подведении нераскрытого баллона к стенозированному участку с последующим его раздуванием. В результате происходит механическое растяжение сосудистой стенки [Постоялко А.С., Тараканов Ю.П., 2006], которое может сопровождаться стентированием – введением стентов (металлических эндопротезов) в просвет коронарной артерии, чаще всего при помощи баллона-катетера [Соколов Ю.Н и соавт., 2005].

Трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация миокарда – метод, основанный на образовании с помощью лазерного луча множества отверстий

в миокарде, сообщающихся с полостью левого желудочка, что обеспечивает непосредственное кровоснабжение миокарда [Работников В.В., 1999].

Техника коронарного шунтирования заключается в наложении ниже стеноза коронарной артерии шунта, соединяющего ее с аортой, что обеспечивает оптимальную перфузию миокарда в обход пораженного участка венечного русла [Wijns W. et al., 2010]. В настоящее время операции с коронарным шунтированием выполняются как на остановленном сердце с применением ИК, так и на работающем сердце без использования локальных стабилизаторов миокарда [Угрюжников В.В., 2010].

В целом, ИБС является сложным, неуклонно прогрессирующим заболеванием с большой вариабельностью тактик лечения. Одним из наиболее существенных метаболических расстройств в процессе развития ИБС признано формирование дисбаланса липидного состава крови, что оказывает модифицирующее влияние на мембрану эритроцитов и потенцирует прогрессирование атеросклеротических процессов в сосудах миокарда и явлений ишемии.

1.5.2. Модификация мембраны эритроцитов при ишемической болезни сердца и атеросклерозе

В патогенезе ИБС существенную роль играют нарушения структуры клеточных мембран, что, в конечном счете, определяет функциональные свойства форменных элементов крови и эндотелиальных клеток, принимающих активное участие в атерогенезе. Важное значение имеет избыточное накопление в мембране ХЛ и его этерифицированных фракций, приводящее к увеличению коэффициента ХЛ/ФЛ, отражающего степень микровязкости липидного бислоя мембраны [Солоха Л.Н., Пушников А.А., 2007]. Кроме того, увеличение удельного веса ХЛ в мембране эритроцитов оказывает опосредованное влияние на активацию процессов липопероксидации, что способствует накоплению детергентных фракций

ФЛ, а также запуску реакций арахидонового каскада, нарушению трансмембранного транспорта [Нгуен Т.Х., 2012].

Было показано, что у пациентов с ИБС увеличивается вязкость плазматической мембраны эритроцитов в поверхностных слоях, что происходит, вероятно, вследствие увеличения содержания ХЛ в мембране. Кроме того, обнаружено изменение активностей Na^+/H^+ -обмена и Ca^{2+} -АТФазы, коррелирующее с содержанием ХЛ в плазме крови [Шилов А.М., 2007]. При ИБС регистрируется также снижение содержания оксигемоглобина, при этом количество комплексов гемоглобина в плазме, связанного с оксидом азота, остается неизменным. Уменьшение количества оксигемоглобина в эритроцитах может быть вызвано нарастанием микровязкости их плазматической мембраны и, как следствие, недостаточным поступлением O_2 в цитоплазму. Подобные нарушения в эритроцитах ведут к изменению свойств плазмолеммы, что способствует интенсификации гемолиза [Кленова Н.Г., 2003].

Показано, что увеличение уровня общего ХЛ и коэффициента ХЛ/ФЛ в липидном бислое мембраны эритроцитов происходит параллельно росту степени риска возникновения ИБС. Избыточное накопление общего ХЛ в клеточных мембранах изменяет подвижность жирнокислотных цепей, увеличивает «жесткость» мембраны, в связи с чем уменьшается деформируемость эритроцитов, повышается их агрегационная активность [Солоха Л.Н., Пушников А.А., 2007].

Морфологическим проявлением изменений структурно-функциональных характеристик мембраны эритроцитов при ИБС является увеличение числа видоизмененных эритроцитов с нарушенным поверхностным рельефом, выявленное при сканирующем электронно-микроскопическом исследовании биоптатов периферической крови больных с ишемией сердечной мышцы. Возрастание числа трансформированных эритроцитов происходит за счет увеличения численности как переходных, так и необратимо измененных предгемолитических и дегенеративных форм

эритроцитов [Кодин А.Г. и соавт., 2009]. Среди трансформированных клеток часто обнаруживаются дискоциты с гребнем, эритроциты с выростом, эхиноциты, стоматоциты и сфероциты. Содержание двояковогнутых дисков, обладающих оптимальной деформируемостью, напротив, снижается. При этом имеет место очевидная склонность дискоцитов к planoцитозу [Новицкий В.В. и соавт., 2004].

Подобные морфологические аномалии эритроцитов объясняются конформационной перестройкой белкового и липидного компонентов их мембраны, повреждением катион-транспортных систем, нарушением ионного гомеостаза клеток, изменением активности гликолиза и пентозофосфатного цикла, нарушением свойств гемоглобина [Новицкий В.В. и соавт., 2000].

Ухудшение гемореологических показателей при ИБС тесно связано с изменением структурно-функциональных особенностей эритроцитов [Ослякова А.О., Тихомирова И.А., 2012]. Дегенеративные формы красных клеток крови являются менее полноценными, чем дискоциты, с точки зрения микроциркуляции и способности к деформации, поэтому увеличение их числа расценивают как неблагоприятный признак. От цитоархитектоники эритроцитов зависит их способность обеспечивать оксигенацию и регенерацию тканей организма. Гиперагрегация эритроцитов нарушает нормальную структуру кровотока в микрососудах и приводит к повышению вязкости крови, блоку микроциркуляции, тканевой гипоксии [Аникеева Т.Б., 2010].

Таким образом, нарушения структурно-метаболического статуса эритроцитов, и в частности их мембраны, при ИБС приводят к снижению деформируемости и резистентности клеток к различным факторам внешней среды. Сложный комплекс экзогенных воздействий, неизбежно сопровождающий выполнение ИК, индуцирует метаболические перестройки в эритроцитах, исходно модифицированных процессом атерогенеза. Очевидно, что состояние мембраны эритроцитов у кардиохирургических

больных на момент хирургического вмешательства может определенным образом влиять на выраженность гемоглобинемии во время ИК, однако сведения, касающиеся этой проблемы, в доступной литературе отсутствуют.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика обследованных больных ишемической болезнью сердца

Обследовано 100 больных (88 мужчин и 12 женщин) в возрасте от 46 до 68 лет с ишемической болезнью сердца (ИБС), страдающих стенокардией напряжения III-IV функционального класса и перенесших операцию коронарного шунтирования в условиях искусственного кровообращения (ИК). Пациенты были госпитализированы в отделение сердечно-сосудистой хирургии ФБГУ «НИИ кардиологии» СО РАМН г. Томска (директор — академик РАМН Р.С. Карпов, руководитель отделения — 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 устанавливали на основании жалоб и анамнеза больного, данных электрокардиографии, ультразвукового исследования сердца, кардиовентрикулографии, 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 проводили операцию коронарного шунтирования.

Экстракорпоральную перфузию проводили на аппарате ИК «Stokert» (Германия), оснащенном роликовыми насосами, с применением одноразовых мембранных оксигенаторов «Quadrox» (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 устанавливали 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.

Все манипуляции по наложению дистальных анастомозов (основной этап операции) выполнялись на остановленном сердце в условиях нормотермии и антеградной кровяной кардиopleгии. Последняя осуществляли начальным введением 400 мл холодного (4°C) раствора (кристаллоидный раствор госпиталя St. Thomas 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).

Из исследования исключали больных с обострением хронической сопутствующей патологии или с патологией гематологического профиля (анемии, хронические лейкозы); лиц, перенесших острое респираторное заболевание менее чем за 1 месяц до хирургического вмешательства; пациентов, которым были выполнены сочетанные с коронарным шунтированием операции (резекция аневризмы аорты или левого желудочка, коррекция пороков сердца, удаление миксомы, операции по восстановлению кровотока через сонные артерии или артерии нижних конечностей), а также пациентов, с продолжительностью ИК более 3-х часов.

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, 68 человек) и с выраженным гемолизом (гемоглобинемия 40

мг/дл и более, 32 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 зрелого возраста (от 45 до 59 лет) составили 79,55%, пациенты старшего возраста (от 60 до 74 лет) — 20,45%. Соотношение мужчин и женщин равнялось 7:1. Длительность ИБС варьировала в пределах от 8 месяцев до 17 лет. У большинства пациентов диагностировались недостаточность кровообращения I-II степени (по NYHA), постинфарктный кардиосклероз, атеросклероз аорты, магистральных артерий конечностей и головного мозга. Среди сопутствующих заболеваний наиболее часто встречались гипертоническая болезнь II-III степени и сахарный диабет II типа, а также язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, хронический холецистит, хронический бронхит, хроническая венозная недостаточность и недостаточность мозгового кровообращения, хронический пиелонефрит, остеохондроз различных отделов позвоночника (табл. 1).

Терапия больных ИБС на дооперационном этапе заключалась в применении антиангинальных, противоаритмических и гипотензивных средств (моночинкве, корвитола, конкора, кордарона, эгилока, эфокс-лонга, эналаприла, лотензина), антиагрегантов (аспирина) и антикоагулянтов (гепарина), миокардиальных метаболических цитопротекторов (предуктала). При сахарном диабете 2 типа назначались гипогликемические препараты (глибенкламид, диабетон).

Нарушение мозгового кровообращения обуславливало назначение ноотропов (пирацетам, ноотропил) и сосудорасширяющих средств (винпоцетин). При этом лечение не имело принципиальных отличий в группах обследованных лиц.

Таблица 1

Клиническая характеристика больных ишемической болезнью сердца и результаты анализа показателей красной крови до (числитель) и после (знаменатель) операции в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Характеристики клинического статуса обследованных больных	Больные ИБС с умеренным гемолизом	Больные ИБС с выраженным гемолизом
Количество больных	68	32
Мужчины/женщины, %	88,2/11,8	87,5/12,5
Средний возраст больных, лет	59,35±1,12	59,46±1,55
Длительность ишемической болезни сердца, лет	5,13±0,98	3,92±0,85
Функциональный класс стенокардии напряжения	2,82±0,09	2,64±0,15
Функциональный класс недостаточности кровообращения (по NYHA)	1,94±0,11	2,09±0,16
Гипертоническая болезнь III ст., %	89,71±4,41	93,75±6,25
Сахарный диабет 2 типа, %	14,71±5,88	12,50±6,25
Содержание эритроцитов в крови, $10^{12}/л$	<u>4,92±0,07</u> 3,51±0,06 #	<u>4,65±0,06*</u> 3,16±0,07 #,*
Содержание гемоглобина в крови, г/л	<u>150,49±2,68</u> 103,82±2,13 #	<u>143,72±1,6</u> 97,05±2,81 #,*
MCV, фл	<u>92,71±1,11</u> 83,10±0,86 #	<u>91,59±1,53</u> 86,54±0,90 #,*
MCHC, г/дл	<u>33,58±0,20</u> 35,18±0,70	<u>34,20±0,28</u> 36,65±0,54

Примечание: ИБС – ишемическая болезнь сердца, NYHA – New York Heart Association Functional Classification, MCV – mean corpuscular volume, MCHC – mean corpuscular hemoglobin concentration, фл – фемтолитры, # – достоверность различий по сравнению с показателями у кардиохирургических больных до операции (при уровне статистической значимости $p < 0,001$), * – достоверность различий между показателями у больных ИБС с умеренным и выраженным постперфузионным гемолизом (при уровне статистической значимости $p < 0,05$).

В интраоперационном периоде больным ИБС проводили внутривенные инфузии наркотических препаратов (кетамин), опиоидных наркотических анальгетиков (фентанила, промедола, морфина), седативных средств с миорелаксирующим эффектом (седуксена, сибазона, димедрола, реланиума или медазолама), холинолитических препаратов (атропина, пентамина), миорелаксантов (ардуана, листенона), нейролептиков (дроперидола, галоперидола), местных анестетиков (лидокаина), антикоагулянтов (гепарина), гемостатических средств с ангиопротективным действием (этамзилата, аминокaproновой кислоты), кортикостероидов (преднизолон), антибиотиков (цефтриабола), диуретиков (лазикса).

Продолжительность ИК, необходимого для обеспечения основного этапа операции на фоне ишемии миокарда, зависела от количества шунтированных артерий и скорости восстановления нормальной сердечной деятельности у пациентов после завершения кардиopleгии. Фактическая скорость объемной перфузии определялась расчетным путем и корректировалась индивидуально в зависимости от показателей кислотно-основного состояния крови и ее газотранспортной функции у конкретного пациента. Медикаментозное влияние на организм во время операции в группах обследованных лиц было сопоставимым по спектру и дозе применяемых препаратов.

В контрольную группу вошли 30 человек, находившихся в состоянии относительного здоровья и сопоставимых по полу и возрасту с больными ИБС. Обязательным условием включения доноров в группу контроля было отсутствие патологии кардиоваскулярной системы и острого воспалительного процесса во время исследования и в течение 3-х недель до него. Учитывая возраст, допускали наличие хронических заболеваний в стадии ремиссии в соотношении, аналогичном таковому в группах больных ИБС. Показатели крови у здоровых доноров: содержание эритроцитов в крови – $(3,9-5,5) \times 10^{12}/л$, содержание гемоглобина в крови – 132-173 г/л, MCV – 80-95 фл, MCHC – 30-38 г/дл.

2.2. Материал исследования

Изучение структурно-метаболического статуса эритроцитов у больных ИБС проводили до операции и после завершения ИК, но не ранее чем через 1 ч после нейтрализации гепарина адекватной дозой протамина сульфата. Материалом для исследования служила гепаринизированная (50 Ед/мл) венозная кровь кардиохирургических больных в количестве 10 мл, доставленная в лабораторию в течение часа с момента ее получения.

2.3. Методы исследования

2.3.1. Приготовление взвеси эритроцитов

Гепаринизированную венозную кровь (50 Ед/мл) в количестве 10 мл разделяли на 2 аликвоты: 0,5 мл цельной крови использовали для приготовления мазков и подсчета ретикулоцитов; 9,5 мл центрифугировали при 1400 g в течение 10 мин. Лейкоцитарную пленку удаляли, плазму использовали для определения концентрации свободного гемоглобина, эритроцитарную взвесь в количестве 0,4 мл отбирали для определения содержания аденозинтрифосфата (АТФ). Оставшийся объем эритроцитомассы подвергали трехкратной отмывке 10 mM трис-HCl буфером (pH=7,4), центрифугируя каждый раз в течение 10 мин при 3000 об/мин и удаляя надосадок.

Апирогенную сыворотку крови для определения в ней концентрации терминального комплекса комплемента получали путем взятия крови в сухие стерильные пробирки и после центрифугирования в течение 15 мин при 1400 g отбирали 0,5 мл сыворотки в стерильные емкости и хранили при температуре не выше -70°C не более 3 месяцев.

2.3.2. Определение концентрации свободного гемоглобина в плазме крови бензидиновым методом

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

Для определения свободного гемоглобина в плазме крови/супернатанте (при изучении механической резистентности эритроцитов) в пробирку вносили 8 мл реакционной смеси: 4 мл ацетатного буфера (pH=4,6), 2 мл 0,1% раствора бензидина на ацетатном буфере, 2 мл 0,3% раствора перекиси водорода. Добавляли 0,04 мл исследуемой плазмы/надосадочной жидкости (при изучении механической резистентности эритроцитов). Содержимое пробирок перемешивали и оставляли стоять при комнатной температуре точно 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 вместо исследуемой жидкости).

Результат представляли в мг/дл.

2.3.3. Подсчет ретикулоцитов в суправитально окрашенных мазках периферической крови

Принцип метода. Фрагменты органелл ретикулоцитов, содержащих рибонуклеиновую кислоту, способны воспринимать витальный краситель бриллиантовый крезильный синий и, в отличие от зрелых эритроцитов,

лишенных этих структур, окрашиваться в виде зернисто-сетчатой субстанции синего цвета [Меньшиков В.В., 1987].

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 $\times 7$, объектив $\times 90$) подсчитывали количество ретикулоцитов, встретившихся при подсчете 1000 эритроцитов.

Результат выражали в %.

2.3.4. Метод выделения мембран эритроцитов

Выделение мембран эритроцитов осуществляли на базе сектора биохимии и спектрального анализа (глава сектора – д-р мед. наук А.Э. Сазонов) ЦНИЛ ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (руководитель – д-р мед. наук, профессор А.Н. Байков).

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

Ход определения. 1 мл эритроцитов, отмытых изотоническим 10 мМ трис-НСl-буфером (рН=7,4), гемолизировали в течение 30 мин при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, добавляя 20-кратный объем гемолизирующей среды (10 мМ трис-НСl-буфером (рН=7,4), содержащий 40 мМ ЭДТА). Гемолизат центрифугировали при 30000 g и $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин, используя центрифугу «Beckman J2-21», надосадок удаляли. Затем мембранную взвесь трижды отмывали 10 мМ трис-НСl-буфером (рН=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 мМ трис-НСl-буфера (рН=7,4).

Полученную мембранную суспензию использовали в дальнейшем для изучения липидного состава и активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны

эритроцитов, предварительно определив содержание белка микробиуретовым методом (п. 2.3.5).

2.3.5. Определение белка микробиуретовым методом

Принцип метода. Метод основан на появлении фиолетового окрашивания при добавлении щелочного раствора меди к раствору белка, при этом развитие окраски обусловлено наличием 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). Смесь 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.

2.3.6. Изучение липидного состава мембраны эритроцитов

2.3.6.1. Получение липидного экстракта мембран эритроцитов

Принцип метода. Экстракция липидов мембран эритроцитов хлороформ-метаноловой смесью по методу J. Folch et al. [1957] основана на разрушении липид-белковых связей полярным растворителем (метанол) с последующим экстрагированием липидов неполярным растворителем (хлороформ).

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 оставляли на 12 ч.

Затем верхний слой удаляли пастеровской пипеткой и дважды наслаивали "верхнюю фазу" смеси хлороформ : метанол : 0,74% КС1 (в соотношении 8:4:3). Очищенный экстракт доводили до первоначального объема и использовали для определения содержания общего холестерина, фосфолипидов и их фракций.

2.3.6.2. Определение содержания общего холестерина в липидном экстракте мембран эритроцитов

Принцип метода. Эфиры холестерина под действием фермента холестеролэстеразы преобразуются в холестерол и жирные кислоты. Холестерол в присутствии воды, кислорода и холестеролоксидазы превращается в холестенон и перекись водорода, которая образует окрашенное соединение с 4-аминоантипирином и фенолом. Интенсивность окраски реакционной смеси, образующейся в ходе реакции, прямо пропорциональна концентрации холестерина в пробе.

Ход определения. В пробирку добавляли 0,2 мл липидного экстракта эритроцитов, выпаривали хлороформ при температуре 40°C и к полученному осадку добавляли 2,0 мл рабочего реагента (раствора лиофильно высушенных ферментов в фосфатном буфере), предварительно нагретого до 37°C. В калибровочную пробу вносили 2,0 мл рабочего реагента и 20 мкл калибровочного реагента. Пробы перемешивали, выдерживали 10 мин при температуре 37°C и при длине волны 500 нм измеряли экстинкцию опытных и калибровочных проб против рабочего реагента в кювете с шириной слоя 5 мм. Концентрацию холестерина рассчитывали по следующей формуле:

$$C \text{ (ммоль/л)} = 4,65 \cdot A_{\text{оп}} / A_{\text{к}} \quad (1),$$

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 суспензии эритроцитарных мембран, определенного микробиуретовым методом, и выражали в ммоль/мг белка.

2.3.6.3. Определение общей концентрации фосфолипидов в липидном экстракте мембран эритроцитов по содержанию липидного фосфора

Принцип метода. С целью разрушения органических веществ липидного экстракта в присутствии хлорной кислоты осуществляли термический гидролиз, определяя затем содержание липидного фосфора в реакции с молибденовым реактивом, и по его концентрации судили об уровне общих фосфолипидов в экстракте [Камышников В.С., 2000].

Ход определения. В пробирки, предварительно обработанные хромовой смесью, вносили 2 мл экстракта. После выпаривания хлороформа в осадок липидного экстракта вносили 1 мл 40% концентрированного раствора HClO_4 . Реакционную смесь прогревали в песчаной бане при температуре 180°C до ее обесцвечивания смеси, добавляя затем по 5 мл дистиллированной воды. Параллельно готовили контрольную пробу на реактивы, которая содержала 0,8 мл 40% концентрированного раствора HClO_4 , и три стандартные пробы, содержавшие 2,0 мл рабочего стандартного раствора фосфора (1 мл раствора KH_2PO_4 содержит 0,01 мг фосфора), 0,8 мл концентрированного раствора HClO_4 . Далее объем контрольной и стандартных проб доводили дистиллированной водой до 6 мл.

В каждую пробирку вносили по 1,0 мл 4% раствора молибдата аммония, смесь перемешивали и приливали по 1,0 мл 1% раствора аскорбиновой кислоты, доводили объем раствора до 10 мл дистиллированной водой, перемешивали. Через 20 мин пробы фотометрировали в кювете с шириной слоя 10 мм при красном светофильтре против контрольной пробы. Расчет содержания липидного фосфора проводили по следующей формуле:

$$C_{\text{оп}} \text{ (ммоль/л)} = 3,23 \cdot A_{\text{оп}} / A_{\text{ст}} \quad (2),$$

где: $C_{\text{оп}}$ – концентрация ФЛ в опытной пробе, выраженная в ммоль/л липидного фосфора, $A_{\text{оп}}$ – оптическая плотность опытной пробы, $A_{\text{ст}}$ – оптическая плотность стандарта.

Результат относили к содержанию белка в суспензии эритроцитарных

мембран, определенного микробиуретовым методом, и выражали в ммоль/мг белка.

2.3.6.4. Изучение фосфолипидного спектра мембраны 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., Туликова З.Н., 1965].

Ход определения. Для разделения фракций фосфолипидов мембраны эритроцитов методом тонкослойной хроматографии сухой липидный остаток 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 фосфорномолибденовой кислоты, проявляли в сушильном шкафу.

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

Конечный результат выражали в %.

2.3.7. Определение активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов

Принцип метода. Определение активности Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов основано на оценке концентрации накопленного неорганического фосфора (Pi) в среде, содержащей АТФ, в результате его гидролиза под действием АТФазы [Казеинов А.М. и соавт., 1984]. В кислой среде молибденовокислый аммоний и фосфорная кислота (и ее соли) вступают в реакцию с образованием фосфомолибдата аммония,

восстановление которого приводит к образованию смеси различных окислов молибдена, имеющих синюю окраску.

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, трис-HCl - 50 (pH 7,4). Инкубацию проводили при 37°C в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением 0,2 мл 20% раствора трихлоруксусной кислоты. Осажденный белок отделяли центрифугированием при 1400 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 10 N раствора H₂SO₄) и 0,25 мл 2% раствора свежеприготовленной аскорбиновой кислоты. По истечении 20 мин пробы фотометрировали при длине волны 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 125мМ KCl.

Результат выражали в мкмоль Pi/час • мг белка.

2.3.8. Определение содержания аденозинтрифосфата в эритроцитах

Принцип метода. Принцип метода основан на различной хроматографической подвижности аденозинмонофосфата (АМФ), аденозиндифосфата (АДФ) и аденозинтрифосфата (АТФ) в системе растворителей диоксан : изопропанол : аммиак : вода [Захарова Н.Б., Рубин В.И., 1980].

Ход определения. Готовили хроматографическую камеру, для чего в широкий стеклянный сосуд помещали систему растворителей диоксан : изопропанол : аммиак : вода в соотношении 4:2:1:4, герметично закрывали и

оставляли для насыщения парами растворителя на 1,5-2 ч. Непосредственно после взятия крови эритроциты осаждали с помощью центрифугирования при 1400 g в течение 10 мин. Из середины осадка отбирали 0,3 мл эритроцитарной массы и растирали в охлажденной фарфоровой ступке в присутствии 0,6 мл холодной 10% трихлоруксусной кислоты в течение 10 мин. Экстракт эритроцитов получали центрифугированием при 1400 g в течение 10 мин. Трихлоруксусную кислоту в составе экстракта нейтрализовали добавлением 5,0 М КОН до pH=5,0. Полученный супернатант наносили на хроматографическую пластинку фирмы «Сорбфил» (Россия) в количестве 40 мкл на расстоянии 1,5 см от нижнего края и помещали в хроматографическую камеру. После достижения фронтом растворителя верхнего края пластинки ее извлекали, просушивали на воздухе и под источником ультрафиолетового излучения регистрировали места положения адениловых нуклеотидов: первым от старта определялся АТФ, далее АДФ, потом АМФ. Участок хроматограммы, соответствующий АТФ, соскабливали и проводили элюацию в течение 1 ч в 3,0 мл 0,01 н HCl. Оптическую плотность надосадка измеряли на спектрофотометре при длине волны 260 нм против элюата из нефлуоресцирующего участка хроматограммы. Концентрацию нуклеотида рассчитывали по формуле:

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

где: C – содержание АТФ в мкмоль/мгHb, D – экстинкция опытной пробы; V_1 – объем хлорной кислоты и КОН, необходимых для экстрагирования (мл), K – концентрация гемоглобина в эритроmasсе (мг/мл, определяли гемиглобинцианидным методом в гемолизате 1:10 с последующим умножением результата на 10), 3,0 – объем элюата (мл), 0,04 – объем, наносимый на хроматографическую пластинку (мл), 0,3 – объем эритроmasсы, из которого осуществлено экстрагирование (мл).

Результат выражали в мкмоль/мгHb.

2.3.9. Определение содержания гемоглобина в гемолизате гемиглобинцианидным методом

Принцип метода. Принцип метода основан на окислении Fe^{2+} -гемоглобина в Fe^{3+} -метгемоглобин (HbMet, гемиглобин), индуцированном железосинеродистым калием (красной кровяной солью). Ацетонциангидрин способствует превращению HbMet в цианметгемиглобин (CNmetHb, гемиглобинцианид – окрашенное стабильное соединение железопорфиринового комплекса), концентрация которого определяется фотометрически.

Ход определения. В пробирку с 5 мл трансформирующего раствора (ацетонциангидрин – 0,5 г, калий железосинеродистый – 0,2 г, натрия гидрокарбонат – 1,0 г, дистиллированная вода – до 1 л) добавляли 20 мкл предварительно приготовленного 10-кратного гемолизата. Содержимое пробирки тщательно перемешивали в течение 10 мин. Измерения проводили с помощью фотоколориметра при длине волны 520-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с толщиной слоя 1 см против холостой пробы – трансформирующего раствора. Расчет содержания гемоглобина в гемолизате производили по формуле:

$$\text{Гемоглобин (г/л)} = \frac{E_{\text{оп}}}{E_{\text{ст}}} \cdot C \cdot K \cdot 0,01 \quad (4),$$

где: $E_{\text{оп}}$ – экстинция опытной пробы,

$E_{\text{ст}}$ – экстинкция стандартного раствора CNmetHb,

C – концентрация CNmetHb в стандартном растворе (мг/100 мл),

K – коэффициент разведения гемолизата в реакционной смеси (250),

0,01 – коэффициент для пересчета миллиграмм-процентов в г/л.

Результат выражали в г/л.

2.3.10. Исследование поверхностных структур мембраны эритроцитов (CD35, CD55, гликофорины А и В)

Определение экспрессии CD (cluster of differentiation) 35, CD55, гликофоринов А и В на мембране эритроцитов проводили с помощью метода прямой поверхностной иммунофлуоресценции, используя комплементарные моноклональные антитела фирмы «Santa Cruz Biotechnology, INC» (США), меченные изотиоцианатом флуоресцеина (ФИТЦ).

Принцип метода. Принцип метода заключается в специфическом связывании поверхностных молекул эритроцитов с соответствующими моноклональными антителами, маркированными флуоресцентной меткой, интенсивность свечения которых регистрируется с помощью люминесцентной микроскопии.

Ход определения. Процедуру выполнения метода прямой поверхностной иммунофлуоресценции осуществляли согласно инструкции фирмы-производителя (разведение антител 1:50, соотношение – 1 мкг антител на 10^6 клеток), в соответствии со стандартным протоколом по иммунофлуоресценции, изложенном на сайте фирмы «Santa Cruz Biotechnology, INC». Для этого производили трехкратную отмывку эритроцитов гепаринизированной крови 1/15 М фосфатным буфером (рН=7,4), содержащим 0,5% бычьего сывороточного альбумина. Затем готовили 250 мкл суспензии эритроцитов в отмывающей среде с концентрацией клеток 25×10^6 /мл, вносили 5 мкл раствора моноклональных антител, после чего инкубировали в течение 60 мин в темноте при $+4^\circ\text{C}$ и регулярном перемешивании (каждые 10 мин). После инкубации эритроциты осаждали центрифугированием при 1400 g, надосадок извлекали и клетки трижды отмывали 1,5 мл 1/15 М фосфатного буфера (рН=7,4), содержащего 0,5% бычьего сывороточного альбумина. После третьей отмывки и удаления супернатанта в пробирку добавляли 250 мкл отмывающей среды, встряхивали и заполняли полученной взвесью эритроцитов камеру Горяева. Через 3-4 мин производили микроскопию препарата с использованием люминесцентного микроскопа «МИКИМЕД-2» «Ломо» (Россия),

оснащенного светофильтром с длиной волны пропускания возбуждающего света 450-480 нм и отсекающим светофильтром с длиной волны 515 нм. При анализе 100 эритроцитов (несущих и не несущих метку) позитивными считали клетки, светящиеся по периферии (в форме кольца).

Результаты выражали в %.

2.3.11. Оценка проницаемости мембраны эритроцитов для низкомолекулярных гидрофильных веществ

Принцип метода. В физиологических условиях мембрана клеток красной крови практически непроницаема для мочевины. Механизм гемолитического действия мочевины обусловлен быстрым проникновением вещества в клетку через поврежденную мембрану, что создает гипертоническую концентрацию мочевины во внутриклеточной среде, индуцируя перемещение воды из экстрацеллюлярного пространства в эритроциты, и их последующее набуханию и лизис [Михайлович В.А., Марусанов В.Е., 1993].

Ход определения. Для исследования готовили суспензию эритроцитов (0,8 мл физиологического раствора + 0,2 мл эритроцитарной массы), 0,1 мл которой вносили в 7 пробирок, содержащих по 5 мл рабочих смесей 1,8% изотонического раствора мочевины и физиологического раствора в различных соотношениях: 1-ая пробирка – 40:60, 2-ая – 45:55, 3-ая – 50:50, 4-ая – 55:45, 5-ая – 60:40, 6-ая – 65:35, 7-ая пробирка содержала чистый раствор мочевины (эталон 100% гемолиза). После инкубации пробирок при комнатной температуре в течение 3 мин, производили центрифугирование содержимого при 350 g в течение 7 мин. Далее осуществляли спектрофотометрию надосадка при длине волны 540 нм, (кювета 1 см) против физиологического раствора, оценивая во всех пробирках степень гемолиза эритроцитов (в %), принимая за 100% гемолиз экстинкцию раствора в пробирке, содержащей 1,8% изотонического раствора мочевины. Исходя из полученных данных строили график, отражающий зависимость процента

гемолиза эритроцитов от концентрации мочевины в растворе, с помощью которого устанавливали ее величину, необходимую для гемолиза 50% клеток.

Результат выражали в % содержания мочевины в растворе.

2.3.12. Определение концентрации терминального комплекса комплемента в сыворотке крови

Для измерения концентрации терминального комплекса комплемента (ТКК) в сыворотке крови применяли твердофазный иммуноферментный метод. Взятие крови осуществляли в сухие стерильные пробирки, которые спустя 20 мин центрифугировали при 1400 g в течение 10 мин. Сыворотку отбирали в стерильные пластиковые микропробирки по 300 мкл и хранили до начала иммуноферментного анализа при температуре не выше 70°C.

Принцип метода. Концепция иммуноферментного анализа заключается в связывании молекулы человеческого белка с мышиными моноклональными антителами (МКАТ-1), сорбированными на твердой фазе микропланшета. Внесение растворимых моноклональных антител другого типа (МКАТ-2), специфичных против независимого эпитопа той же молекулы и конъюгированных с биотином, приводит к фиксации этого вещества в лунках микропланшета. После отмывания избытка МКАТ-2 образовавшийся комплекс «антитело-белок-антитело» выявляется путем добавления пероксидазы хрена, конъюгированной со стрептовидином, который имеет высокое сродство к биотину. Дальнейшее внесение субстрата (перекись 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 инструкции, предлагаемой производителем тест-системы «Human terminal complement complex (ТСС)» («НВТ», Нидерланды). Предварительно в семи пластиковых пробирках готовили различные разведения растворенного перед исследованием лиофилизированного ТКК (9000 мЕд/мл) с концентрациями: 3000, 1000, 333, 111, 37, 12,3 и 4,1 мЕд/мл. Разведения ТКК использовали в качестве стандартов, а буфер для разведения – в качестве контроля («0 дозы»). Сыворотку также разводили аналогичным буфером в 10 раз. Все пробы и стандарты до внесения в лунки (ячейки) хранились при температуре не выше +4°C (на льду). Остальные реагенты набора перед исследованием были доведены до комнатной температуры (18-25°C).

В первую лунку планшета вносили 100 мкл «0 дозы», в последующие 7 лунок – по 100 мкл приготовленных стандартов по мере увеличения концентрации ТКК в них (от 4,1 до 3000 мЕд/мл). В оставшиеся лунки помещали 100 мкл разведенной сыворотки крови в дублях. Планшет инкубировали 1 ч при температуре +4°C.

По окончании инкубации содержимое лунок удаляли и после четырехкратной отмывки буфером (по 200 мкл на одну ячейку) в лунки вносили по 100 мкл растворимых биотинилированных моноклональных антител к ТКК человека и инкубировали 1 час при комнатной температуре (18-25°C) и непрерывном встряхивании.

По истечении времени инкубации содержимое лунок удаляли и четырехкратно промывали ячейки аналогичным образом. Затем вносили по 100 мкл раствора конъюгата стрептовицина с пероксидазой хрена, инкубировали еще 1 ч при комнатной температуре и непрерывном встряхивании.

После этого содержимое лунок удаляли и четырехкратно промывали ячейки буфером. Затем добавляли во все лунки по 100 мкл раствора

субстрата (перекись водорода) с красителем (тетраметилбензидин). Инкубировали стрипы 20-30 мин при комнатной температуре (18-25°C) в защищенном от прямых солнечных лучей месте, наблюдая развитие окраски. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл раствора лимонной кислоты в каждую лунку.

Учет результатов производили по оптической плотности содержимого лунки с использованием автоматического фотометра для микропланшетов «АИФ-Ц-01С» (Россия) при длине волны 450 нм, устанавливая нулевое поглощение по лунке с «0 дозой», т.е. контрольным реагентом (буфером).

Результаты выражали в виде концентрации ТКК в сыворотке крови (мЕд/мл).

2.3.13. Определение Резус-фенотипа эритроцитов

Резус-фенотип эритроцитов определяли стандартным гематологическим методом с помощью реакции прямой гемагглютинации на плоскости, используя коммерческие цоликлоны анти-D, анти-E, анти-e, анти-C, анти-c Супер (ООО «Гематолог», Россия) и руководствуясь инструкцией производителя.

Ход определения. В лунки пластинки вносили по 2 капли цоликлонов (анти-D, анти-E, анти-e, анти-C, анти-c). Рядом с каждым реактивом помещали по 2 капли исследуемой крови. Смешивали кровь с реагентом стеклянной палочкой. Спустя 10-15 с покачивали пластинку в течение 20-25 с. Через 3 мин визуально отмечали реакцию агглютинации в лунках на пластинке. Наличие агглютинации свидетельствовало о присутствии на эритроцитах антигенов D, E, e, C, c.

2.4. Статистическая обработка результатов

Обработку полученных результатов проводили на основе общепринятых статистических методов с помощью пакета программ Statistica for Windows (2000, версия 6.0) фирмы «Statsoft Inc.» и пакета

программ «Microsoft Excel» корпорации «Microsoft». Результаты исследований представляли как $\bar{X} \pm m$, где \bar{X} – среднее арифметическое, m – ошибка среднего арифметического. Для проверки гипотезы о нормальном распределении выборочных данных 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 (уровень статистической значимости $p < 0,05$). Для оценки статистической значимости отличий между независимыми выборками с ненормальным распределением использовали непараметрический критерий Манна-Уитни (уровень статистической значимости $p < 0,05$). При исследовании динамики показателей в попарно связанных выборках, имеющих ненормальное распределение, применяли тест Вилкоксона (уровень статистической значимости $p < 0,01$). С целью установления взаимосвязей между изучаемыми показателями вычисляли коэффициент корреляции Спирмена.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Содержание свободного гемоглобина и ретикулоцитов в крови у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Результаты проведенного исследования показали, что у больных ишемической болезнью сердца (ИБС), оперированных с применением искусственного кровообращения (ИК), концентрация свободного гемоглобина в плазме крови превышала его уровень у здоровых доноров как до, так и после операции (табл. 2). После хирургического вмешательства уровень гемоглобинемии возрастал по отношению к дооперационному этапу у пациентов обеих групп исследования, но в разной степени: у больных с умеренным послеоперационным гемолизом – в 2 раза ($p_1 < 0,001$), а при выраженной гемоглобинемии – в 5 раз ($p_1 < 0,001$). При этом концентрация свободного гемоглобина после операции у пациентов с выраженным гемолизом превышала данный показатель у больных альтернативной группы ($p_2 < 0,001$) (табл. 2).

Определение числа ретикулоцитов в крови у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом выявило достоверное его увеличение (по отношению к таковому у здоровых доноров) в дооперационном периоде ($p_k < 0,05$). При этом до операции у больных с выраженным гемолизом определялось более высокое содержание ретикулоцитов в крови, чем у пациентов группы сравнения (в 1,2 раза, $p_2 < 0,05$). После экстракорпоральной перфузии число ретикулоцитов у пациентов обеих групп возрастало по сравнению с таковым на дооперационном этапе, но если при умеренном гемолизе – в 1,9 раза ($p_1 < 0,05$), то при выраженной гемоглобинемии – в 1,4 раза ($p_1 < 0,05$).

3.2. Содержание гликофорин А⁺, гликофорин В⁺, CD35⁺, CD55⁺ эритроцитов в периферической крови у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Определение количества гликофорин А⁺, гликофорин В⁺ эритроцитов у кардиохирургических больных с умеренным гемолизом выявило достоверное снижение исследуемого показателя до операции по сравнению с группой контроля ($p_k < 0,05$ и $p_k < 0,01$ соответственно) (табл. 3).

Таблица 2

Содержание свободного гемоглобина в плазме и ретикулоцитов в крови у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операции в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n=30)	Кардиохирургические больные с умеренным постперфузионным гемолизом (n=68)	Кардиохирургические больные с выраженным постперфузионным гемолизом (n=32)
Содержание свободного гемоглобина в плазме крови, мг/дл	7,67±0,43	10,31±0,65 $p_k < 0,05$	13,47±0,88 $p_k < 0,001$ $p_2 < 0,05$
		24,55±5,76 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,001$	57,41±3,69 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,01$ $p_2 < 0,001$
Содержание ретикулоцитов в крови, ‰	7,41±0,44	10,00±0,42 $p_k < 0,001$	11,88±0,44 $p_k < 0,001$ $p_2 < 0,05$
		18,72±0,76 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	16,69±1,34 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,01$

Примечание. Здесь и далее в таблицах 3, 4, 5, 6 и 7: p_k – уровень статистической значимости различий по сравнению с показателями у здоровых доноров (в контроле); p_1 – у кардиохирургических больных до операции; p_2 – между показателями у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом на соответствующем этапе исследования.

После операции количество экспрессирующих гликофорины А и В эритроцитов у кардиохирургических больных с умеренной гемоглобинемией возрастало по отношению к их числу на дооперационном этапе ($p_1 < 0,01$). Количество гликофорин А⁺ и гликофорин В⁺ эритроцитов у

кардиохирургических больных с выраженным гемолизом на двух этапах исследования достоверно не различалось (табл. 3).

Таблица 3

Содержание гликофорин А⁺, гликофорин В⁺, CD35⁺, CD55⁺ эритроцитов и терминального комплекса комплемента в крови у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операции в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n=12)	Кардиохирургические больные с умеренным постперфузионным гемолизом (n=40)	Кардиохирургические больные с выраженным постперфузионным гемолизом (n=18)
Гликофорин А ⁺ эритроциты, %	93,70±1,21	87,4±1,47 p _к <0,05	91,82± 2,55
		95,22±1,20 p ₁ <0,01	92,33±1,13
Гликофорин В ⁺ эритроциты, %	79,60±1,90	68,86±1,54 p _к <0,01	73,37± 2,73
		77,29±1,43 p ₁ <0,01	75,61±1,21
CD35 ⁺ эритроциты, %	72,18±10,23	58,09±9,34	52,83±11,21
		65,15±8,90	57,24±10,36
CD55 ⁺ эритроциты, %	81,45±4,93	74,18±5,82	60,09±5,22 p _к <0,05
		79,31±6,10	62,15±4,77 p _к <0,05
Терминальный комплекс комплемента, ×10 ⁻³ Ед/мл	235,12±26,31	302,12±32,43 p _к <0,05	385,66±40,00 p _к <0,01 p ₂ <0,05
		1872,51±358,84 p _к <0,001 p ₁ <0,001	1794,86±351,09 p _к <0,001 p ₁ <0,001

Количество экспрессирующих гликофорины А и В эритроцитов у кардиохирургических больных с выраженной гемоглобинемией не имело статистически значимых различий по сравнению с их числом в группе контроля (табл. 3).

Численность CD (cluster of differentiation) 35⁺ эритроцитов у больных с умеренным и выраженным гемолизом не имела достоверных различий по сравнению с их содержанием у здоровых доноров. При этом величина исследуемого показателя оказалась сопоставимой у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом на обоих этапах исследования (табл. 3).

Численность CD55⁺ эритроцитов у больных с выраженным гемолизом была достоверно ниже по сравнению с их количеством у здоровых доноров: до операции – в 1,35 раза ($p_k < 0,05$), после операции – в 1,31 раза ($p_k < 0,05$). Количество их у пациентов с умеренным гемолизом достоверно не отличалось от такового в группе контроля (табл. 3).

Определение содержания терминального комплекса комплемента в сыворотке крови до операции выявило достоверное его увеличение (по отношению к таковому у здоровых доноров) у кардиохирургических больных обеих групп исследования, но в большей степени у пациентов ИБС с выраженным интраоперационным гемолизом – в 1,64 раза ($p_k < 0,01$) по сравнению с нормой и в 1,27 раза ($p_2 < 0,05$) – у больных ИБС с умеренной постперфузионной гемоглобинемией. После экстракорпоральной перфузии содержание терминального комплекса комплемента в сыворотке крови у кардиохирургических больных обеих групп наблюдения возрастало по отношению к дооперационному этапу: у пациентов с умеренной гемоглобинемией – в 6,2 раза ($p_1 < 0,001$), у пациентов с выраженным гемолизом – в 4,7 раза ($p_1 < 0,001$).

3.3. Показатель мочевинового гемолиза, активность Na⁺/K⁺-АТФазы и содержание АТФ в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Изучение показателя 50%-гемолиза эритроцитов в растворе мочевины у больных с умеренной гемоглобинемией выявило его соответствие норме до операции и снижение после хирургического вмешательства ($p_k < 0,05$, $p_1 < 0,05$)

(табл. 4). У пациентов с выраженной гемоглобинемией данная величина была исходно пониженной ($p_k < 0,05$) и после завершения ИК оставалась на дооперационном уровне (табл. 4).

Таблица 4

Уровень мочевинового гемолиза, активность Na^+/K^+ -АТФазы и содержание АТФ в эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операции в условиях искусственного кровообращения ($\bar{X} \pm m$)

Показатель и	Здоровые доноры (n=12)	Кардиохирургические больные с умеренным постперфузионным гемолизом (n=24)	Кардиохирургические больные с выраженным постперфузионным гемолизом (n=18)
Уровень мочевинового гемолиза 50% эритроцитов, % мочевины	1,026±0,012	1,003±0,008	0,971±0,014 $p_k < 0,05$
		0,984±0,008 $p_k < 0,05$ $p_l < 0,05$	0,981±0,013 $p_k < 0,05$
Активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране 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 $p_k < 0,05$ $p_l < 0,05$
Содержание АТФ в эритроцитах, мкмоль/мг Нб	2,95±0,22	2,71±0,21	2,24±0,18 $p_k < 0,05$
		2,46±0,18	2,08±0,27 $p_k < 0,05$

Активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов у пациентов с умеренной гемоглобинемией была достоверно ниже контрольных значений как до, так и после операции ($p_k < 0,05$). В группе больных с выраженным гемолизом активность исследуемого фермента на дооперационном этапе

оказалась достоверно выше соответствующих значений в группе сравнения ($p_2 < 0,05$); при этом она варьировала в пределах нормы и до операции была выше, чем после хирургического вмешательства ($p_k < 0,05$), что обуславливалось достоверным понижением активности фермента в послеоперационном периоде ($p_1 < 0,05$) (табл. 4).

Содержание АТФ в эритроцитах у пациентов с умеренной гемоглобинемией практически не отличалось от такового у здоровых доноров, а у больных с выраженным гемолизом оказалось ниже нормальных значений ($p_k < 0,05$).

3.4. Содержание холестерина, фосфолипидов и их отдельных фракций в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

На основании исследования общего содержания холестерина, фосфолипидов в мембране эритроцитов у больных ИБС обеих групп исследования было изучено у них соотношение холестерол/фосфолипиды в мембране красных клеток крови.

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

Измерение содержания холестерина (ХЛ) в мембране красных клеток крови у кардиохирургических больных обнаружило достоверное его увеличение по сравнению с нормой у пациентов обеих групп исследования как до, так и после операции, при этом более низкий его уровень до операции определялся у больных с выраженным гемолизом ($p_2 < 0,05$) (табл. 5).

Определение соотношения ХЛ/ФЛ в мембране клеток красной крови у больных ИБС, прооперированных в условиях ИК, показало снижение величины данного параметра при умеренном гемолизе по сравнению с предыдущим этапом исследования ($p_1 < 0,05$). Величина данного показателя

у пациентов с выраженной гемоглобинемией после операции, напротив, возрастала по сравнению с дооперационным его значением ($p_1 < 0,05$), при этом превышала соответствующие значения у больных с умеренным гемолизом ($p_2 < 0,05$) (табл. 5).

Таблица 5

Общее содержание холестерина, соотношение «холестерол/фосфолипиды» в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца до (числитель) и после (знаменатель) операции с искусственным кровообращением ($\bar{X} \pm m$)

Показатели	Здоровые доноры (n=15)	Кардиохирургические больные с умеренным постперфузионным гемолизом (n=18)	Кардиохирургические больные 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 $p_k < 0,05$
Соотношение холестерол/фосфолипиды	0,95±0,04	1,38±0,03 $p_k < 0,001$	1,24±0,06 $p_k < 0,01$ $p_2 < 0,05$
		1,25±0,03 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$	1,40±0,06 $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

3.4.2. Общее содержание фосфолипидов и их фракций в мембране эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца, оперированных в условиях искусственного кровообращения

Изучение общего содержания фосфолипидов (ФЛ) в мембране эритроцитов у кардиохирургических больных обеих групп наблюдения выявило достоверное снижение величины этого показателя по сравнению с таковой в группе контроля на обоих этапах ($p_k < 0,05$) (табл. 6).

Оценка содержания фракций ФЛ в мембране эритроцитов у больных ИБС, прооперированных в условиях ИК, выявила различные изменения в фосфолипидном спектре мембраны эритроидных клеток (табл. 6).

Таблица 6

Содержание фосфолипидов и их отдельных фракций в мембране эритроцитов (%) у больных 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
Фосфолипиды общие, $\times 10^{-3}$ ммоль/мг белка		520,18 \pm 21,02	471,53 \pm 19,84 $p_k < 0,05$ 489,79 \pm 10,12 $p_k < 0,05$	460,28 \pm 20,57 $p_k < 0,05$ 432,13 \pm 22,05 $p_k < 0,05$
Лизофосфатидилхолин	%	2,92 \pm 0,15	6,10 \pm 0,68 $p_k < 0,05$ 4,64 \pm 0,41 $p_k < 0,05$	2,72 \pm 0,41 $p_2 < 0,05$ 4,55 \pm 0,69 $p_1 < 0,05$
	$\times 10^{-3}$ ммоль/мг белка	15,28 \pm 1,06	26,33 \pm 1,95 $p_k < 0,01$ 23,14 \pm 1,40 $p_k < 0,05$	13,21 \pm 1,89 $p_2 < 0,01$ 19,57 \pm 2,17 $p_1 < 0,05$
Фосфатидил-инозитол	%	10,55 \pm 0,64	7,92 \pm 0,30 $p_k < 0,05$ 8,46 \pm 0,58	9,47 \pm 0,96 7,83 \pm 0,56 $p_k < 0,05$
	$\times 10^{-3}$ ммоль/мг белка	52,90 \pm 2,60	37,22 \pm 3,83 $p_k < 0,05$ 44,12 \pm 2,89	42,80 \pm 2,96 33,67 \pm 3,27 $p_k < 0,01$
Фосфатидил-холин	%	26,76 \pm 1,07	24,55 \pm 1,25 25,36 \pm 1,02	26,33 \pm 1,46 20,66 \pm 0,59 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
	$\times 1$	140,92 \pm 4,10	115,39 \pm 4,50	121,12 \pm 2,90

			$p_k < 0,01$ $124,26 \pm 3,04$ $p_k < 0,05$	$p_k < 0,05$ $88,95 \pm 5,67$ $p_k < 0,001$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,001$
--	--	--	---	--

Продолжение табл. 6

1		2	3	4
Сфингомиелин	%	15,20±0,26	14,17±0,99 <hr/> 13,61±0,58	14,29±1,31 <hr/> 14,62±0,70
	×10 ⁻³ ммоль/ мг белка	74,13±2,30	68,06±3,08 <hr/> 67,58±2,71	66,73±3,62 <hr/> 65,87±3,10
Фосфатидил-серин	%	6,37±0,68	9,24±1,29 <hr/> 7,20±1,10	5,69±1,30 <hr/> 5,43±1,13
	×10 ⁻³ ммоль/ мг белка	32,43±1,95	41,43±2,58 <hr/> 35,28±1,41	27,14±2,60 <hr/> 23,35±3,40
Фосфатидил-этаноламин	%	23,61±0,53	21,40±1,61 <hr/> 21,77±0,60	24,23±0,91 <hr/> 24,92±1,71
	×10 ⁻³ ммоль/ мг белка	124,07±3,30	100,58±3,22 $p_k < 0,001$ <hr/> 106,67±2,65 $p_k < 0,001$	110,03±2,82 $p_k < 0,05$ <hr/> 107,16±5,13 $p_k < 0,05$
Фосфатидная кислота	%	14,42±1,06	15,48±1,74 <hr/> 19,56±1,60 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$	16,14±1,73 <hr/> 20,43±1,00 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$

	$\times 10^{-3}$ ммоль/ мг белка	75,02±1,10	72,76±3,48	74,24±3,46
			93,18±1,75 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$	89,35±3,01 $p_k < 0,05$ $p_1 < 0,05$

Так, относительное содержание лизофосфатидилхолина в мембране эритроцитов у пациентов с умеренным гемолизом превышало таковое в контроле ($p_k < 0,05$); при выраженной гемоглобинемии величина данного показателя варьировала в пределах нормы и была ниже, чем в группе сравнения на дооперационном этапе ($p_2 < 0,05$), возрастая при этом после операции ($p_1 < 0,05$) (табл. 6).

Доля фосфатидилхолина в мембране красных клеток крови у кардиохирургических больных определялась в пределах нормы, за исключением понижения его концентрации после операции у пациентов с выраженным гемолизом (по сравнению с таковым на дооперационном этапе, нормой и показателем у больных с умеренным гемолизом на аналогичном этапе исследования: $p_k < 0,05$, $p_1 < 0,05$, $p_2 < 0,05$) (табл. 6).

Относительное содержание фосфатидилинозитола в мембране эритроцитов у кардиохирургических больных была ниже контрольных значений – у больных с умеренным гемолизом на дооперационном этапе ($p_k < 0,05$), у пациентов с выраженной гемоглобинемией после операции ($p_k < 0,05$) (табл. 6).

Вне зависимости от выраженности гемолиза доля фосфатидной кислоты в мембране эритроцитов у кардиохирургических больных до операции соответствовала контрольным значениям, а после ИК возрастала по отношению к таковой на дооперационном этапе ($p_1 < 0,05$) (табл. 6).

Динамика абсолютного содержания различных фракций ФЛ в эритроцитарной мембране была аналогичной таковой при оценке относительного их количества за исключением уровня фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина: абсолютное их содержание в плазмолемме у

больных ИБС было ниже значений у здоровых доноров до и после операции с ИК независимо от выраженности постперфузионного гемолиза (табл. 6).

Содержание сфингомиелина и фосфатидилсерина в мембране красных клеток крови у кардиохирургических больных не имело достоверных различий по сравнению с соответствующими показателями у здоровых доноров и оказалось сопоставимым у больных в сравниваемых группах исследования как до, так и после операции (табл. 6).

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

Исследование частоты встречаемости антигенов системы Резус эритроцитов и Резус-фенотипов у кардиохирургических больных с умеренной и выраженной гемоглобинемией обнаружило достоверное ($p_2 < 0,05$) увеличение частоты встречаемости С-антигена у пациентов с умеренным гемолизом по сравнению с альтернативной группой исследования. Вместе с этим, у больных с выраженной гемоглобинемией значительно чаще обнаруживался сс-фенотип эритроцитов по сравнению с группой больных с умеренным гемолизом ($p_2 < 0,05$) (табл. 7).

Таблица 7

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

Показатели	Кардиохирургические больные с умеренным постперфузионным гемолизом (n=51)	Кардиохирургические больные с выраженным постперфузионным гемолизом (n=31)
1	2	3
С-антиген	80,39±5,62	61,29±6,00 $p_2 < 0,05$
с-антиген	72,5±7,1	77,4±7,2

D-антиген	85,4±8,3	83,3±8,2
Отсутствие D-антигена (d)	14,5±1,2	16,6±1,3
E-антиген	23,5±2,2	35,5±3,3
e-антиген	84,3±8,1	77,4±7,4
СС-фенотип	27,4±2,7	22,5±2,1
Сс-фенотип	47,0±4,3	38,7±3,9

Продолжение табл. 7

1	2	3
сс-фенотип	19,61±5,62	38,71±6,89 $p_2 < 0,05$
EE-фенотип	15,6±1,5	22,5±2,4
Ee-фенотип	7,8±0,6	12,9±1,2
ee-фенотип	76,4±7,3	64,5±6,3

Частоты встречаемости других антигенов и фенотипов системы Резус эритроидных клеток у кардиохирургических больных с умеренной и выраженной послеоперационной гемоглобинемией были сопоставимыми (табл. 7).

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время искусственное кровообращение (ИК) является эффективной методикой кардиохирургии, используемой при ишемической болезни сердца (ИБС) и других видах патологии сердечно-сосудистой системы. Однако ИК сопровождается травмой форменных элементов крови, в первую очередь, эритроцитов, связанной с нефизиологическим воздействием экстракорпорального контура в аппарате ИК. Распад эритроцитов приводит к гемоглобинемии, оказывающей негативное влияние на организм, в связи с этим гемолиз является серьезным неблагоприятным явлением, приводящим к возникновению послеоперационных осложнений у пациентов, оперируемых с применением ИК.

Причинами гемолиза во время проведения ИК являются механическая травма форменных элементов крови, контактная активация комплемента в экстракорпоральном контуре, гипероксия и гипотермия [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007]. Показано, что при ИК прежде всего повреждаются эритроциты, а также (но в меньшей степени) другие клетки крови – тромбоциты, нейтрофилы, моноциты и лимфоциты [Morariu A.M. et al., 2004].

Активация комплемента при проведении ИК обусловлена контактом крови с поверхностью неэндотелизированного контура и газовой средой оксигенатора [Nilsson B. et al., 2007]. Гипероксия приводит к активации перекисного окисления липидов (ПОЛ), дестабилизирующего мембраны клеток крови [Reber A. et al, 2000]. Кроме того, гипотермия имеет важное значение в патогенезе повреждения форменных элементов крови, способствуя возникновению гипоксии при централизации кровотока, сопровождающейся травмой клеток крови [Лобачёва Г.В. и соавт., 2011].

Согласно полученным в результате проведенного исследования данным, уровень свободного гемоглобина в плазме крови у больных ИБС до операции был повышенным по сравнению с таковым у здоровых доноров (табл. 2). Установленный факт повышения содержания свободного

гемоглобина в плазме крови у кардиохирургических больных связан, по всей видимости, с особенностью патогенеза ИБС, сопровождающейся усилением ПОЛ и изменениями мембраны красных клеток крови, приводящими в итоге к гемоглобинемии [Ройтман Е.В. и соавтр., 2001]. Продемонстрировано, что наличие анемии на дооперационном этапе у кардиохирургических больных ассоциировано с повышенным риском возникновения послеоперационных осложнений и высокой смертностью больных [Özkan S. et al., 2010].

После операции у больных ИБС уровень свободного гемоглобина в крови, как показало проведенное исследование, оказался еще выше контрольных значений, чем до операции. В зависимости от степени постперфузионной гемоглобинемии больные ИБС были разделены на две группы – с умеренной (до 40 мг/дл) и выраженной (40 мг/дл и более) послеоперационной гемоглобинемией (табл. 2) – группы 1 и 2 соответственно.

Увеличение содержания свободного гемоглобина в крови во время проведения операций с применением ИК, сочетающееся, как известно, со снижением концентрации гаптоглобина в плазме крови, свидетельствует о массивном разрушении эритроцитов в аппарате ИК [Vercaemst L., 2008]. По данным G. Wright et al. [2001], изучающих механизмы разрушения красных клеток крови на фоне ИК уже более 20 лет, гемолиз отмечался при каждой из более 1000 изученных ими операций. В настоящее время гемолиз рассматривается как универсальный феномен, сопровождающий выполнение операций с применением ИК [Windsant I.C.V. et al., 2010], однако предшествующие ему изменения структурно-функциональных свойств эритроцитов и их механизмы не до конца изучены.

Послеоперационное потенцирование гемоглобинемии у обследованных нами больных ИБС обеих групп наблюдения объясняется негативным воздействием факторов ИК на форменные элементы крови, о чем указывалось выше. Кроме того, в литературе увеличение уровня свободного гемоглобина в плазме крови при операциях с применением ИК объясняется

различными модификациями самого аппарата ИК. Подбор оптимальных компонентов аппарата позволяет, по мнению G.S. Murphy и соавт. [2009], существенно снизить травму форменных элементов, в том числе и клеток красной крови.

Между тем, в настоящем исследовании ИК проводились с использованием идентичного оборудования, соответственно различный уровень гемолиза в обеих группах пациентов нельзя объяснить особенностями экстракорпорального контура. Выраженный гемолиз у больных ИБС после операции был связан, вероятно, с исходными (предсуществующими) дефектами структурно-метаболического статуса эритроцитов, значительно снижающими их устойчивость к гемолизу в нефизиологических условиях экстракорпорального кровообращения. Основываясь на изучении морфологического статуса эритроцитов крови, полученной из кровеносных сосудов разного уровня – аорты, бедренной и сонной артерий, было предположено, что на уровне дуги аорты происходит сепарация красных клеток крови, благодаря которой молодые, функционально активные формы эритроидных клеток поступают преимущественно в головной мозг по сонной артерии, а более старые, с измененной мембраной эритроциты поступают в нисходящую аорту [Медведев М.А. и соавт., 2007]. Высокая скорость кровотока и сдвиговая деформация эритроцитов, наблюдающаяся при ИК в артериальной канюле, обуславливает повреждение, в первую очередь, функционально неполноценных красных клеток крови [Дементьева И.И. и соавт., 2010]. Поэтому эритроциты, поступающие в нисходящий отдел аорты во время физиологического кровообращения, в условиях ИК разрушаются в первую очередь.

Высокий уровень свободного гемоглобина в крови опосредует такие клинически значимые осложнения операций с применением ИК, как острая почечная недостаточность, легочная гипертензия, ДВС-синдром [Windsant I.C.V. et al., 2010]. В целом, высокий уровень свободного гемоглобина

является причиной повреждения множества органов и систем, проявляющегося возникновением синдрома полиорганной недостаточности [Бабаев М.А., 2011].

Общеизвестно, что разрушение красных клеток крови при гемолитических реакциях компенсируется мобилизацией их костномозгового резерва и выходом в циркуляцию молодых форм эритроцитов – ретикулоцитов [Воробьев А.И., 2005].

Именно такого рода реакция на дооперационном этапе отмечалась у больных ИБС, у которых среднее содержание ретикулоцитов в крови было существенно выше, чем у здоровых доноров. При этом у больных ИБС с выраженной послеоперационной гемоглобинемией количество ретикулоцитов в крови до операции было выше соответствующего показателя не только в группе контроля, но и у больных ИБС альтернативной группы, т.е. с умеренной послеоперационной гемоглобинемией (табл. 2). Это позволяет заключить, что реакция костного мозга у больных ИБС до операции, проявляющаяся стимуляцией эритропоэза в ответ на разрушение красных клеток и появлением молодых форм эритроцитов в крови, является адекватной [Riley R.S. et al., 2001].

После операции содержание ретикулоцитов в крови у больных ИБС в обеих группах исследования сохранялось выше нормы, однако у пациентов с выраженным послеоперационным гемолизом величина изучаемого показателя в динамике возрастала в меньшей степени, чем у больных группы сравнения. Данный факт может быть объяснен, на наш взгляд, истощением резервного пула молодых форм эритроцитов в костном мозге, что у больных с выраженной гемоглобинемией проявляется поступлением меньшего (нежели в случае умеренного интраоперационного гемолиза) количества ретикулоцитов в кровотоки. Увеличение содержания ретикулоцитов в крови при проведении операций с применением ИК отмечено также в работе S. Cirri et al. [2001].

Выявлено, что ускоренный эритропоэз способствует появлению в крови ранних форм ретикулоцитов с укороченным жизненным циклом, что опосредует их быстрое разрушение при гемолитических анемиях [Buttarelli M., Pleban M., 2008]. Изучение электрофоретической подвижности эритроцитов и ретикулоцитов выявило прогрессирующее снижение величины данного параметра по мере увеличения содержания последних в крови [Матюшичев В.Б., Шамратова В.Г., 2010].

Нарушение реологических свойств крови также усиливает интенсивность гемолитических реакций. Реологические свойства крови определяются в том числе агрегацией эритроцитов, сопряженной с вязкостью крови. Немаловажную роль в этом играют трансмембранные гликопротеины эритроцитов – гликофорины. Гликофорины являются гликозилированными и сиалосодержащими гликопротеинами, что обеспечивает их участие в формировании отрицательного поверхностного заряда красных клеток крови, обеспечивая взаимное отталкивание эритроцитов во время циркуляции [De Isla N.G. et al., 2003]. Соответственно, при снижении их содержания суммарный отрицательный поверхностный заряд эритроцитов уменьшается, что способствует агрегации клеток.

Согласно результатам проведенного исследования, в дооперационном периоде содержание гликофорин A^+ и гликофорин B^+ эритроцитов в крови у больных ИБС с умеренной послеоперационной гемоглобинемией (группа 1) оказалось достоверно ниже соответствующих значений в контроле, в то время как у пациентов с выраженным интраоперационным гемолизом (группа 2) на аналогичном этапе исследования изучаемый параметр был сопоставимым с группой здоровых доноров (табл. 3).

Пониженное содержание гликофорина А и гликофорина В в эритроцитах у больных ИБС группы 1 до операции не только обуславливает снижение отрицательного заряда их мембраны, но и способствует ее изменениям, является сигналом к разрушению данных клеток макрофагами селезенки. Так как сиаловые кислоты гликопротеинов на внешней стороне

мембраны эритроцитов выполняют функцию кальций-связывающих компонентов, то уменьшение их концентрации при старении клеток может быть причиной изменений проницаемости мембраны эритроцитов для ионов кальция [Bednarek-Skublewska A. et al., 2009]. Установлено также, что дефицит сиаловых кислот в мембране эритроцитов ассоциирован с повышенным содержанием триацилглицеролов и фибриногена в сыворотке крови и регистрируется у пациентов с гиперхолестеролемией [Hadengue A.L. et al., 1998].

У больных с выраженным интраоперационным гемолизом соответствующее норме содержание гликофорин А⁺ и гликофорин В⁺ эритроцитов, возможно, связано с выходом в кровь молодых форм клеток с нормальной экспрессией указанных гликопротеинов на мембране. Так, иммуноцитохимическими и серологическими исследованиями показано, что различные формы эритроцитарного гликофорина С, несущие разные антигены системы Гербиш, не ассоциированы с клинически значимым гемолизом [Chang S. et al., 1991]. По всей видимости, содержание гликофоринов А и В на мембране эритроцитов также не ассоциировано с интенсивным гемолизом у пациентов с выраженной послеоперационной гемоглобинемией. Показано, что взаимодействие гликофорина А с С3-компонентом комплемента крови существенно снижает деформируемость эритроцита и способствует его удалению из кровотока посредством внутриклеточного гемолиза в макрофагах печени и селезенки [Glodek A.M. et al., 2010].

После операции количество гликофорин А⁺ и гликофорин В⁺ эритроцитов в крови у больных с умеренным гемолизом достигало значений контроля, в то время как у пациентов с выраженной гемоглобинемией на данном этапе исследования достоверных изменений величины этого показателя по сравнению с таковой у здоровых доноров выявлено не было. По всей видимости, это объясняется мобилизацией в кровь ретикулоцитов из

костного мозга, что у больных группы 1 компенсировало дооперационный дефицит клеток, экспрессирующих гликофорины А и В.

По имеющимся данным, гликофорины могут усиливать и подавлять активацию системы комплемента. Сиаловые кислоты, содержащиеся на гликофоридах, повышают сродство фактора Н к компоненту комплемента С3b. Образование данной связи имеет два важных последствия: фактор В диссоциирует из комплекса С3bBb, что ингибирует конвертазу С3 альтернативного пути активации комплемента; фактор Н образует связь с фактором I, благодаря чему осуществляется расщепление и инактивация С3 альтернативного пути активации комплемента [Ollert M.W. et al., 1995]. Если же система комплемента преодолевает ингибирующий эффект, создаваемый сиаловыми кислотами гликофоринов эритроцита, то наличие последних на других эритроцитах может способствовать лизису клетки путем внедрения в ее мембрану мембраноатакующего комплекса [Marshall P. et al., 1996].

Поверхностный отрицательный заряд определяет продолжительность жизненного цикла эритроцитов. Уменьшение электрического заряда мембраны красных клеток крови выявляется при различных видах патологии [Пурло Н.В. и соавт., 2005]. Снижение содержания сиаловых кислот в мембране эритроцитов приводит к разрушению эритроидных клеток макрофагами печени и селезенки, сопровождается агрегацией эритроцитов и, как следствие, изменением реологических свойств крови в конкретном участке кровеносного русла [Nigam P.K. et al., 2006].

Учитывая, что в настоящем исследовании у больных ИБС с выраженным интраоперационным гемолизом до и после операции дефицита эритроцитов, экспрессирующих гликофорины А и В, не было выявлено, не исключено, что у них могло быть пониженным содержание молекул гликофоринов в мембране.

Наряду с гликофоридами, на мембране эритроцитов располагаются также гликопротеины, являющиеся групповыми антигенами, т.е. антигенами различных систем групп крови. К гликопротеинам относятся, к примеру,

антигены эритроцитов системы Резус, занимающие по иммуногенности второе место после системы АВ0 [Avent N.D., Reid M.E., 2000].

Частота встречаемости антигенов системы Резус D, C, c, E, e и отдельных Резус-фенотипов у больных ИБС в обеих группах наблюдения была сопоставимой (табл. 7).

Данные литературы свидетельствуют о склонности Резус-отрицательных (RhD^-) эритроцитов к агрегации, а Резус-положительные эритроциты (RhD^+), соответственно, легче поддаются дезагрегации и фрагментации [Кузник Б.И., 2010]. Однако результаты настоящего исследования не позволяют подтвердить влияние Резус-фенотипа на выраженность постперфузионного гемолиза. Возможно, при увеличении объема выборки больных ИБС подобная закономерность может быть установлена, но, учитывая, что цель настоящего исследования не ограничивалась определением только частоты встречаемости Резус-фенотипов и Резус-антигенов красных клеток крови, то выполнение всех методик, используемых в работе, на большой когорте пациентов не представлялось целесообразным.

Между тем, по данным А.П. Симчук и С. Гао [2012], сердечно-сосудистые заболевания чаще выявляются у женщин с Резус-отрицательным фенотипом эритроидных клеток. Известно также, что предрасположенность к атеросклерозу ассоциирована с Rh-отрицательным фенотипом (т.е. d-фенотипом или RhD^- или D^-), минимальный риск развития атеросклероза связан, соответственно, с RhD^+ -фенотипом (или D^+), однако у данных больных заболевание протекает более длительно и в более тяжелой форме [Суслова Е.Ю., 2007, 2009].

Показано также, что с RhD^- -фенотипом красных клеток крови сопряжен повышенный уровень холестерина (ХЛ) в сыворотке крови у пациентов с ИБС [Tarján Z. et al., 1995]. Кроме того, Z.H. Siddiqui и его коллеги [2011] установили, что стенокардия чаще встречается у больных с фенотипом эритроцитов RhD^- .

Таким образом, по данным литературы, ассоциация Резус-фенотипов эритроцитов с заболеваниями сердечно-сосудистой системы прослеживается. Тем не менее, факторы, объясняющие корреляцию Резус-фенотипов эритроидных клеток с развитием данных заболеваний или низкую частоту их встречаемости у лиц с сердечно-сосудистой патологией, авторами не выявлены и не поясняются.

Возвращаясь к обсуждению собственных результатов, следует заметить, что у больных ИБС с умеренным интраоперационным гемолизом была установлена несколько большая частота встречаемости С-антигена эритроцитов при более низкой частоте регистрации сс-фенотипа по сравнению с альтернативной группой исследования (табл. 7).

Что касается данных литературы, то у больных атеросклерозом сосудов нижних конечностей показано увеличение частоты встречаемости ссее-фенотипа эритроцитов, что отражает его негативное значение [Турбасова Н.В. и соавт., 2009]. Так как у больных с выраженным гемолизом отмечалось преобладание сс-фенотипа красных клеток крови и снижение частоты встречаемости С-антигена, то, возможно, сс-фенотип способствует снижению, а наличие С-антигена на эритроцитах, наоборот, - повышению гемолитической стойкости последних. Таким образом, можно предположить, что прогностически благоприятным является наличие на эритроцитах С-антигена, а сс-фенотип предрасполагает к интенсивному постперфузионному гемолизу. Приходится констатировать, что механизмы снижения гемолитической стойкости эритроцитов в отсутствие С-антигена и протективного влияния С-антигена при его наличии на эритроцитах в современной литературе не определены.

На поверхности мембраны эритроцитов помимо гликофоринов и групповых антигенов располагаются молекулы-ингибиторы системы комплемента, защищающие клетки от чрезмерной ее активации. Снижение экспрессии данных молекул приводит к разрушению эритроцитов комплементом, что наблюдается, в частности, при пароксизмальной ночной

гемоглобинурии в условиях ночного ацидоза. Возможно, низкая экспрессия данных молекул на мембране красных клеток крови также является причиной разрушения эритроидных клеток у больных ИБС во время перфузии в экстракорпоральном контуре аппарата ИК.

Согласно полученным данным, число CD (cluster of differentiation) 35-позитивных эритроцитов в крови у больных ИБС варьировало в пределах нормы в обеих группах сравнения и на обоих этапах исследования, т.е. как до, так и после операции (табл. 3). По-видимому, это обусловлено тем, что молекула CD35 ((CR1) complement receptor 1) является определяющим белком-регулятором системы комплемента, поскольку ингибирует C3- и C5-конвертазы всех трех путей ее активации: классического, альтернативного и лектинового [Yazdanbakhsh K. et al., 2003]. Известно, что кроме эритроцитов CR1 экспрессируется на моноцитах, нейтрофилах, эозинофилах и дендритных клетках. Выявлено также, что низкий уровень экспрессии CD35 на мембране эритроидных клеток у больных в терминальной стадии хронической почечной недостаточности приводит к повышению смертности данных пациентов в 1,6 раза по сравнению с больными с высоким уровнем экспрессии CR1 на эритроцитах [Glodek A.M. et al., 2010].

Комплексных данных о роли CR1 в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний в литературе практически нет. Показано, что назначение растворимой формы CD35 кардиохирургическим больным снижает негативные эффекты ИК на функциональную активность сердца [Chai P.J. et al., 2000]. Приводятся также данные о том, что активация комплемента повышает проницаемость сосудов, контракцию гладких мышц, вызывает активацию нейтрофилов и повышение содержания кальция в цитозоле кардиомиоцитов, что приводит к нарушению кооперативности микрофиламентов на уровне саркомера [Camous L. et al., 2011].

Исследование экспрессии другой ингибиторной молекулы системы комплемента – CD55 выявило снижение числа CD55-несущих эритроцитов у больных ИБС с выраженной послеоперационной гемоглобинемией по

сравнению со здоровыми донорами на обоих этапах исследования – как до, так и после операции с ИК (табл. 3).

Согласно данным литературы, при пароксизмальной ночной гемоглобинурии отмечается дефицит гликозилфосфатидилинозитол-связанных белков, к которым относится CD55 [Jasinski M. et al., 2004]. Согласно данным А. Griscelli-Bennaceur и коллег [1995], причина дефицита CD55 заключается в нарушении биосинтеза гликозилфосфатидилинозитол-связанных белков. С другой стороны, массивная гибель эритроцитов, отмечаемая при ИК, сопровождается не только мобилизацией костномозгового пула молодых эритроидных клеток в циркуляцию, но и активацией эритропоэза при сокращении генерационного времени эритроидных клеток-предшественниц, что сопряжено с нарушениями процессов белкового синтеза и поступлением в кровь клеток с дефицитом поверхностных белков [Воробьев А.И., 2005]. К подобным белковым молекулам относятся гликозилфосфатидилинозитол-связанные белки, в том числе и CD55.

В экспериментальной модели на мышах было показано, что дефицит молекулы CD59 на эндотелии, относящийся, как и CD55, к гликозилфосфатидилинозитол-связанным белкам, приводил к ускоренному развитию выраженного атеросклероза с окклюзией коронарных артерий [Wu G. et al., 2009]. Выявленный дефицит CD55 на мембране эритроцитов у пациентов с высоким уровнем гемоглобинемии (40 мг/дл и более) может быть связанным также с предположительно большей выраженностью у них атеросклеротических изменений. В литературе приводятся гипотезы о роли CD55 в механизмах дезактивации комплемента при развитии атеросклероза [Leung V.W.Y. et al., 2009]. Есть убедительные основания считать, что нарушение функционирования или снижение экспрессии белков-регуляторов комплемента на мембране красных клеток крови играет важную роль в атерогенезе [Oksjoki R. et al., 2007].

У пациентов с умеренным гемолизом количество CD55⁺ эритроцитов было сопоставимым с таковым у здоровых доноров как до, так и после операции. Это, вероятно, связано с отсутствием у них нарушений биосинтеза гликозилфосфатидилинозитол-связанных белков.

Логично предположить, что снижение экспрессии молекул-ингибиторов системы комплемента на мембране эритроцитов у кардиохирургических больных способствует активации комплемента. Как известно, все три пути активации комплемента (классический, лектиновый и альтернативный) завершаются образованием терминального комплекса комплемента (ТКК), который внедряется в мембрану клеток в виде мембраноатакующего комплекса [Glovsky M., et al., 2004].

Так, на дооперационном этапе содержание ТКК в сыворотке крови у больных ИБС в обеих исследованных группах было выше такового в контроле, при этом у пациентов с выраженной послеоперационной гемоглобинемией величина этого показателя оказалась более высокой, чем у пациентов альтернативной группы исследования (табл. 3).

По данным W.C. Speidl et al. [2011], усиление активности комплемента наблюдается при атеросклерозе. В процессе активации комплемента играет роль С-реактивный белок [Лутай М.И., 2004]. Последний распознает С1q, что потенцирует классический путь активации комплемента, заканчивающийся формированием мембраноатакующего комплекса [Perpys M.B., Hirschfield G.M., 2003]. Поскольку наиболее частой причиной ИБС является атеросклероз коронарных сосудов, повышение активности комплемента, выражающееся в увеличении концентрации ТКК в крови, у больных данным заболеванием является закономерным.

При ишемии миокарда активация комплемента происходит по классическому и альтернативному путям [Lucches B.R., Kilgore K.S., 1997], что приводит к расщеплению С5 до С5а, являющегося анафилотоксином и медиатором воспаления, и С5b, который индуцирует формирование ТКК или мембраноатакующего комплекса (С5b-9). Последний формирует в клетках

трансмембранный канал, вызывающий осмотический цитолиз [Testa L. et al., 2008].

После операции у кардиохирургических больных обеих исследуемых групп (1 и 2) содержание ТКК в сыворотке крови существенно повышалось в сравнении с дооперационными его значениями (табл. 3), что согласуется с данными литературы относительно изменений активности комплемента при проведении операций с применением ИК [Pintar T., Collard C.D., 2003; Nilsson B. et al., 2007]. У больных, оперированных в условиях ИК, зафиксировано встраивание ТКК в мембрану эритроцитов [Deppish R. et al., 1990]. При этом важно отметить, что только у больных с умеренным постперфузионным гемолизом (в отличие от пациентов группы сравнения) содержание ТКК в сыворотке крови положительно коррелировало с уровнем гемоглобинемии после операции ($r = 0,81$, $p < 0,01$) (рис. 1).

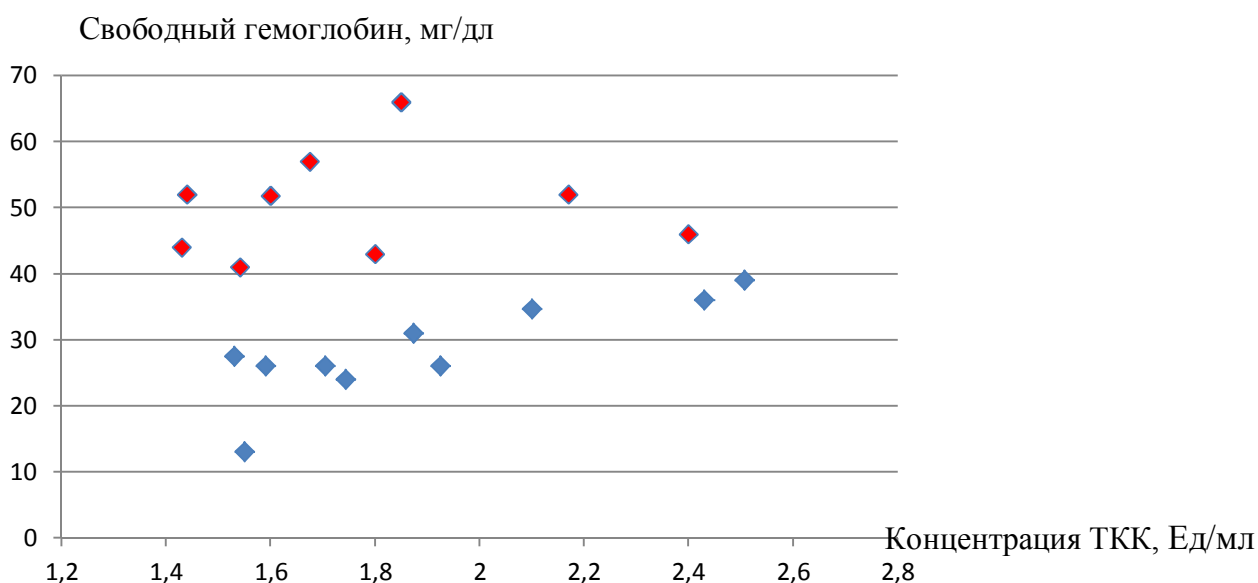


Рис. 1. Зависимость между концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови и количеством терминального комплекса комплемента (ТКК) в сыворотке крови у больных ишемической болезнью сердца (ИБС), оперированных в условиях искусственного кровообращения.

Примечание. ♦ - больные ИБС с умеренным гемолизом, ♦ - больные ИБС с выраженным гемолизом.

Анализируя данные, можно заключить, что формирование умеренной гемоглобинемии после ИК обусловлено комплемент-зависимым лизисом

эритроцитов во время перфузии, но данный механизм не играет ведущей роли в патогенезе выраженного гемолиза.

Существенное увеличение генерации мембраноатакующего комплекса могло быть связанным с негативным действием ИК, при котором усиливаются все три пути активации комплемента, что является причиной многочисленных органных нарушений. Однако, по данным M. Pekna et al. [1994], увеличение содержания ТКК в крови при ИК обусловлено в большей степени активацией комплемента по альтернативному пути. Другие авторы утверждают, что не только альтернативный, но и классический путь активации комплемента запускаются при проведении коронарного шунтирования [Gillinov A.M. et al., 1994]. Активация лектинового пути активации комплемента, очевидно, в меньшей степени приводит к наработке ТКК, что объясняется асептическими условиями проведения операций, предотвращающими контакт патогенов с организмом.

Мембраноатакующий комплекс комплемента при фиксации на мембране красных клеток крови, как указывалось выше, образует в ней поры, способствующие поступлению воды, Na^+ и Ca^{2+} в клетки с последующим цитолизом [Одинцов Ю.Н., Перельмутер В.М., 2007]. Поры, образованные мембраноатакующим комплексом, представляют собой полые цилиндры с внутренним радиусом 5-7 нм с гидрофильной областью внутри и гидрофобной – снаружи [Acosta J.A. et al., 1996]. Мембраноатакующий комплекс усиливает экспрессию тканевого тромбопластина, продукцию интерлейкина (IL) 8, стимулирующего нейтрофилы, и хемотаксического протеина, «привлекающего» моноциты [Sahu A., Lambris J.D., 2000], индуцирует экспрессию адгезивной молекулы Р-селектина на тромбоцитах и эндотелиальных клетках, что обеспечивает функциональное взаимодействие между тромбоцитами, эндотелиальными клетками и лейкоцитами. В комплексе это приводит к развитию системного воспалительного ответа [Fung M. et al., 2001].

В то же время эритроциты обладают системой защиты от комплемент-зависимого лизиса, которая представлена Ca^{2+} -активируемыми K^+ -каналами. Ионы Ca^{2+} проникают через поры в плазмолемме, образованные мембраноатакующим комплексом, активируют соответствующие каналы, что обеспечивает выход K^+ из внутриклеточной среды, снижая таким образом ее осмолярность, что в свою очередь препятствует набуханию клетки [Halperin J.A. et al., 1993]. Вместе с этим, образование пор в мембране эритроидных клеток сопровождается повышением ее проницаемости для катионов и воды.

Согласно полученным нами данным, уровень 50% гемолиза эритроцитов в растворе мочевины, по которому производилась оценка проницаемости мембраны красных клеток крови, соответствовал норме только у пациентов с умеренной гемоглобинемией и лишь в дооперационном периоде (табл. 4). У больных с выраженной гемоглобинемией на аналогичном этапе исследования величина данного параметра была ниже, чем у здоровых доноров (рис. 2), соответственно проницаемость мембраны клеток красной крови оказалась повышенной по сравнению с нормой (эритроциты лизировались уже при низкой концентрации мочевины в растворе). Более того, показатель мочевинового гемолиза 50% эритроцитов до операции отрицательно коррелировал с концентрацией свободного гемоглобина в плазме крови лишь у больных с выраженным гемолизом ($r = -0,54$, $p < 0,05$), указывая на важную роль повышенной проницаемости мембраны эритроцитов в механизмах их ускоренной гибели на фоне ИБС.

Нормальная проницаемость мембраны красных клеток крови у больных ИБС группы 1 до операции, по данным оценки мочевинового гемолиза, возможно, была связана с ингибированием мембраноатакующего комплекса CD55, уровень экспрессии которого на поверхности эритроцитов (согласно результатам анализа содержания в крови CD55^+ клеток) соответствовал норме. Ограничивая сборку мембраноатакующего комплекса на поверхности эритроцитов, CD55 обеспечивает защиту красных клеток крови от разрушения комплементом.

В то же время низкая устойчивость эритроцитов к гемолизу в растворе мочевины, сопряженная с повышенной проницаемостью мембраны эритроцитов, до операции у больных ИБС с выраженной гемоглобинемией была опосредованной, вероятно, дефицитом поверхностных молекул CD55. Согласно данным литературы, гипоэкспрессия CD55, ингибирующего C3- и C5-конвертазы классического и альтернативного путей, сопровождается активацией комплемента с образованием порообразующего ТКК [Liu J. et al., 2005], содержание которого в сыворотке крови у данной категории лиц было повышенным (табл. 3).

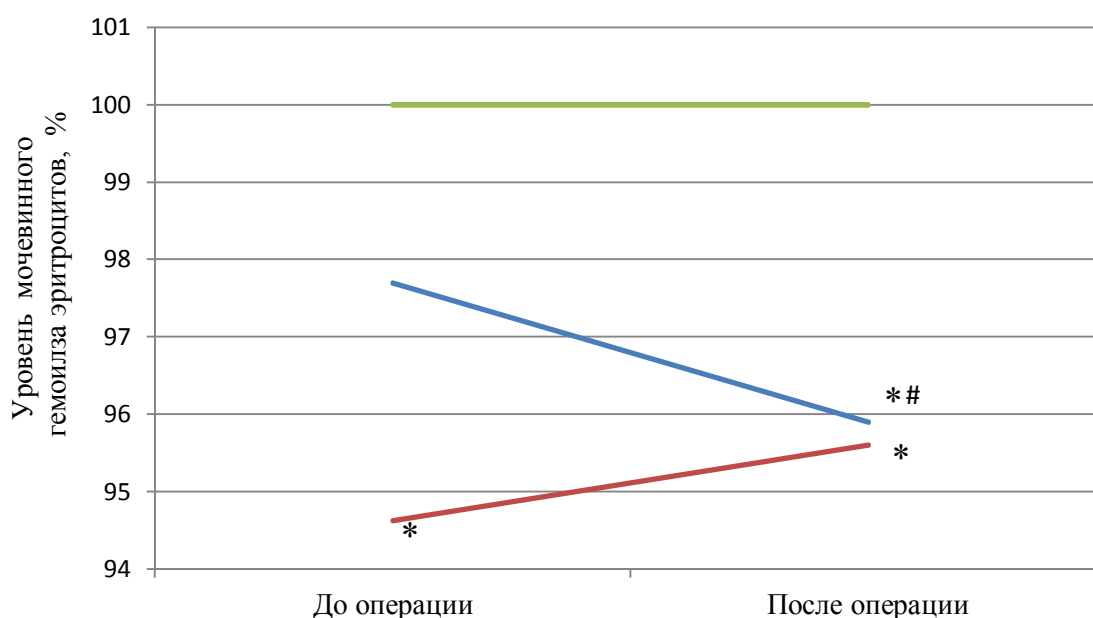


Рис. 2. Уровень мочевинового гемолиза эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца (ИБС), оперированных в условиях искусственного кровообращения, по отношению к здоровым донорам (100%).

Примечание. ■ - больные ИБС с умеренным постперфузионным гемолизом ■ - больные ИБС с выраженным постперфузионным гемолизом; ■ - здоровые доноры; * - статистически значимые различия по сравнению с показателями у здоровых доноров; # - по сравнению с показателями у больных ИБС до операции.

Кроме того, показано, что наличие единичного мембраноатакующего комплекса на мембране старых, метаболически инертных красных клеток крови оказывается достаточным для их осмотического лизиса. Соответственно, интенсивность, с которой происходит лизис эритроидных

клеток, зависит от количества мембраноатакующих комплексов на их мембране и от состава внеклеточной жидкости [Cole D.S., Morgan B.P., 2003].

В послеоперационном периоде у кардиохирургических больных группы 2 проницаемость мембраны красных клеток крови сохранялась выше нормы, а у больных ИБС группы 1 (т.е. с умеренной гемоглобинемией) – повышалась в сравнении с контролем и таковым до операции, о чем свидетельствовало статистически значимое снижение показателя 50% гемолиза в растворе мочевины. Вероятно, это было обусловлено активацией комплемента во время ИК, что подтверждается многократным увеличением содержания ТКК в сыворотке крови после операции у больных обеих групп исследования и, очевидно, сопровождается фиксацией данных комплексов на мембране эритроцитов, что приводит к эритролизису. Изменения ионной проницаемости мембраны эритроцитов также приводят к модификации структурных, биохимических и микрореологических характеристик эритроцитов, потенцируя механическую травму клеток в аппарате ИК [Baskurt O.K. et al., 2004].

Проницаемость мембраны эритроцитов, опосредованная активацией комплемента, зависит от количества и размера пор в мембране клетки, скорости их образования и работы регуляторных механизмов, поддерживающих объем клетки, к которым в большей степени относится активный транспорт катионов [Acosta J.A. et al., 1996].

Холестерол (ХЛ) оказывает непосредственное влияние на проницаемость мембраны красных клеток крови. Как известно, увеличение содержания ХЛ в мембране эритроцитов обуславливает снижение ее проницаемости для катионов [Новицкий В.В. и соавт., 2004].

На дооперационном этапе общее содержание ХЛ в мембране эритроцитов у больных ИБС обеих групп наблюдения было выше, чем у здоровых доноров. При этом у больных ИБС группы 2 данный показатель оказался ниже такового в группе сравнения (табл. 5).

Согласно данным литературы, при ИБС, действительно, отмечается повышение содержания ХЛ в мембране эритроцитов [Васильев А.П. и соавт., 2005; Солоха Л.Н., Пушников А.А., 2007; Рагино Ю.И. и соавт., 2009; Шевченко О.Г., 2010]. Как известно, течение ИБС характеризуется гиперлипидемией и гиперхолестеролемией [Мешков А.Н., 2010]. Поскольку эритроциты обладают способностью сорбировать ХЛ на поверхности мембраны [Смирнова И.П. и соавт., 2005], то его содержание в плазмолемме эритроцитов зависит от липидного состава сыворотки крови. Соответственно, увеличение общего содержания ХЛ в мембране эритроидных клеток связано с его сорбцией красными клетками крови во время циркуляции. По мнению L. Memon и соавт. [2003], повышенное содержание ХЛ в мембране красных клеток крови при атеросклерозе является предрасполагающим фактором к развитию данного заболевания, поскольку их анализ содержания ХЛ в мембране эритроцитов показал наличие прямой корреляции данного параметра с содержанием общего ХЛ, триацилглицеролов и ХЛ липопротеинов высокой и низкой плотности в сыворотке крови.

Показано, что сфингомиелин в мембране эритроцитов способствует связыванию незтерифицированного ХЛ плазмы крови и является ловушкой для последнего, поскольку прослеживается прямая ассоциация между содержанием сфингомиелина и ХЛ в мембране эритроидных клеток [Tziakas D.N. et al., 2010].

В мембране ретикулоцитов, согласно данным литературы, концентрация ХЛ ниже, чем в зрелых эритроцитах [Liu J. et al., 2010]. В связи с этим, более низкое содержание ХЛ в мембране эритроцитов до операции у больных ИБС группы 1 по сравнению с таковым у пациентов альтернативной группой исследования, по-видимому, определяется более выраженным ретикулоцитозом (табл. 2, 5).

На послеоперационном этапе содержание ХЛ в мембране эритроцитов сохранялось выше нормы как у пациентов с выраженным гемолизом, так и у

больных ИБС с умеренной гемоглобинемией, что могло быть связано, на наш взгляд, с процессами атерогенеза и гиперлипидемией, приводящими не только к увеличению данного показателя до операции, но и сохранению его на высоком уровне в послеоперационном периоде.

Избыточное накопление ХЛ сопряжено с изменением физико-химических свойств эритроцитарной мембраны: повышением ее микровязкости, ухудшением деформируемости клеток, их способности к прохождению по сосудам микроциркуляторного русла [Шевченко О.Г., 2010]. Высокое содержание ХЛ в мембране красных клеток крови также повышает ее стабильность, упорядочивая конформацию молекул липидного бислоя [Raffy S., Teissie J., 1999]. Вместе с тем, ХЛ оказывает протективное влияние на мембраны красных клеток крови, снижая скорость гидролиза фосфолипидов (ФЛ) фосфолипазой A_2 . Авторы предполагают, что увеличение содержания ХЛ в мембране эритроцитов способствует формированию доменов, устойчивых к гидролизу фосфолипазой A_2 [Raffy S., Teissie J., 1999]. В свою очередь, увеличение числа данных доменов ограничивает доступность ФЛ для фермента, что обуславливает снижение вероятности гидролиза последних [Heiner A.L. et al., 2008].

Основным структурно-функциональным компонентом мембраны эритроцитов помимо ХЛ являются ФЛ. Согласно полученным данным, общее содержание ФЛ в мембране красных клеток крови на дооперационном этапе в обеих исследуемых группах было пониженным по сравнению с их количеством у здоровых доноров (табл. 5).

Как известно, при ИБС отмечается интенсификация процессов свободнорадикального окисления, частным проявлением которого является активация ПОЛ [Воробьева Е.Н., Воробьев Р.И. 2005]. Выраженный окислительный стресс обычно индуцируется дисбалансом регуляции процессов свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты [Макишинович З.И. и соавт., 2010], что характерно для ИБС [Дерягин М.Н. и соавт., 2009]. Активация ПОЛ в мембране эритроидных клеток приводит

прежде всего к модификации ФЛ, нарушению их упаковки в бислое, что делает данные молекулы доступными для действия фосфолипаз, осуществляющих расщепление ФЛ с образованием лизофосфатидов [Нгуен Т.Х., 2012]. Расщепление ФЛ с их последующей деградацией приводит к нарушению микровязкости мембраны эритроцитов и изменению ее проницаемости [Ohvo-Rekilä Н. et al., 2002]. Реацилизация лизофосфатидилхолина (ЛФХ) в плазмолемме клеток крови происходит с затратой АТФ в два этапа: жирные кислоты из внеклеточного пространства включаются в синтез ацетил-СоА с помощью ацил-СоА–синтетазы, затем ацильная группа переносится на ЛФХ с помощью лизофосфатид-ацил-трансферазы с образованием фосфатидилхолина (ФХ) [Sourene E. et al., 2008].

В связи с этим, очевидно, что причиной снижения общего содержания ФЛ в мембране красных клеток крови у больных ИБС на дооперационном этапе исследования является их деградация в результате интенсификации ПОЛ [Новицкий В.В. и соавт., 2004]. Интересно, что у больных с окклюзией коронарной артерии более 50% общее содержание ФЛ в мембране эритроцитов выше, чем при окклюзии менее 50% [Jiménez J.A. et al., 2012].

Поскольку показанием к проведению операции коронарного шунтирования является окклюзия коронарных артерий более 50% [Takahashi S. et al., 2003], то это (т.е. одинаковая степень стенозирования) объясняет сопоставимость показателей содержания ФЛ в мембране эритроцитов у кардиохирургических больных сравниваемых групп наблюдения. Кроме того, ранее в нашей лаборатории было показано, что содержание продуктов ПОЛ в эритроцитах у больных ИБС до операции одинаково повышено как в случае формирования умеренного, так и выраженного постперфузионного гемолиза [Чумакова С.П. и соавт., 2012].

После операции содержание ФЛ в мембране эритроцитов у пациентов с ИБС обеих групп наблюдения оставалось по-прежнему ниже, чем в группе контроля (табл. 5). Между тем, после ИК при умеренном гемолизе

отмечалась тенденция к увеличению, а при выраженном гемолизе – напротив, к уменьшению величины данного показателя.

По данным Н.Л. Воронцовой и соавт. [2012], проведение коронарного шунтирования у больных ИБС сопровождается интенсификацией ПОЛ, которая связана с интраоперационной гипероксией, сопровождающейся образованием большого количества свободных радикалов [Аверина Т.Б., Самуилова Д.Ш., 2007]. Генерирование свободных радикалов обуславливается синдромом ишемии-реперфузии во время проведения операций с применением ИК. Свободные радикалы приводят к значительным структурным и функциональным повреждениям клеток крови, связанным, прежде всего, с деградацией липидов. При этом отмечается корреляция между активностью ПОЛ и жесткостью мембраны клеток крови [Ochoa J.J. et al., 2003], которая, в свою очередь, зависит от соотношения ХЛ/ФЛ в ней [Кононеко В.А., 2009]. По данным К.Н. Конторщиковой и соавт. [2004], структурная организация липидов мембраны красных клеток крови совместно с активностью антиокислительных ферментов (каталаза, супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза) определяет резистентность эритроцитов к свободнорадикальному окислению.

Надо заметить, что до операции соотношение ХЛ/ФЛ у больных ИБС обеих групп исследования было выше, чем в контроле, при этом у пациентов группы 1 величина исследуемого показателя была выше таковой у больных ИБС группы сравнения (табл. 5).

Увеличение соотношения ХЛ/ФЛ у больных ИБС было обусловлено повышением общего содержания ХЛ в мембране эритроцитов на фоне дефицита в ней ФЛ. Поскольку у пациентов с умеренной послеоперационной гемоглобинемией до операции содержание ХЛ в мембране эритроцитов было выше, чем у больных группы сравнения, соответственно и соотношение ХЛ/ФЛ у них также оказалось выше, чем у пациентов с ИБС в группе 2 (табл. 5).

Значительное снижение общего содержания ФЛ при увеличении соотношения ХЛ/ФЛ у пациентов с атеросклерозом коронарных артерий показано также в работе А.П. Васильева и соавт. (2005), установивших, что прогрессирование стеноза сосудов коронарного русла у больных ИБС сопровождается ростом соотношения ХЛ/ФЛ [Васильев А.П. и соавт., 2005].

Как показали результаты нашего исследования, в послеоперационном периоде у кардиохирургических больных обеих групп наблюдения соотношение ХЛ/ФЛ оставалось выше контрольных значений, однако у пациентов с выраженным гемолизом оно превышало соответствующие значения до операции и в группе сравнения в аналогичный период исследования (табл. 5). Выявленные различия были связаны с тем, что у пациентов с умеренным гемолизом после операции отмечалась отчетливая тенденция к нормализации содержания ХЛ в мембране эритроцитов, а у пациентов группы 2 оно еще более повышалось по сравнению с дооперационным этапом (табл. 5).

Возрастание соотношения ХЛ/ФЛ в мембране эритроцитов, по данным В.В. Новицкого и соавт. [2004], обуславливает повышение ее вязкости, нарушение проницаемости липидного бислоя, а также приводит к изменению активности мембраносвязанных ферментов. Соотношение ХЛ/ФЛ в мембране эритроцитов находится в обратной зависимости от общего количества ФЛ, которое распределяется между отдельными их фракциями.

Проведенное исследование показало, что процентное содержание сфиногомиелина (СФМ), фосфатидилсерина (ФС) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) в мембране эритроцитов у больных ИБС в обеих группах наблюдения на обоих этапах операции было сопоставимым с таковым у здоровых доноров (табл. 6).

По данным J.A. Jiménez et al. [2012], процентное содержание перечисленных ФЛ в мембране эритроцитов у пациентов с окклюзией коронарной артерии более 50% и менее 50% достоверно не различается. Вероятно, что при атеросклерозе и во время экстракорпоральной перфузии

СФМ, ФС и ФЭА в меньшей степени подвергаются гидролизу, чем фосфатидилхолин и фосфатидилинозитол.

Проведенная оценка содержания отдельных фракций ФЛ у больных ИБС с умеренным интраоперационным гемолизом до операции выявила увеличение содержания ЛФХ и дефицит фракции фосфатидилинозитола (ФИ) в мембране эритроцитов по сравнению с контрольными значениями (табл. 6).

Показано, что для атеросклероза действительно характерны снижение содержания ФИ и активация фосфолипазы A_2 с увеличением содержания лизофосфатидов в мембране эритроцитов и в сыворотке крови [Медведева И.В. и соавт., 2001; Смирнова И.П., и соавт., 2005; Солоха Л.Н., Пушкинов А.А., 2007; Colley K.J. et al., 2011]. По данным D. Küllenberg et al. [2012], избыточное содержание продуктов расщепления ФЛ в мембране красных клеток крови коррелирует с высоким риском сердечно-сосудистых заболеваний. Высокое содержание лизофосфатидов может быть обусловлено гиперактивацией фосфолипазы A_2 , гидролизующей ФЛ с образованием арахидоновой кислоты и лизофосфолипидов [Arrigo P.D., Servi S., 2010].

Показано, что эритроциты могут обратимо связывать ЛФХ, являясь переносчиком данного ФЛ. Активность фосфолипазы A_2 в отношении гидролиза мембранных ФЛ увеличивается в условиях дефицита кислорода и зависит от концентрации внутриклеточного кальция. Между тем, плазмогенные ФЛ являются субстратом для специфической кальций-независимой плазмогенной фосфолипазы. Данный механизм и интенсификация ПОЛ в условиях дефицита кислорода приводят к изменению концентрации ФЛ в составе мембраны эритроцитов [Осипенко А.Н. и соавт., 2012]. Увеличение содержания ЛФХ в клеточной мембране красных клеток крови может быть связано не только с его образованием, но и с сорбцией ЛФХ на плазмолемме эритроцитов [Matsumoto T. et al., 2007].

Содержание фосфатидилхолина (ФХ) в мембране эритроцитов до операции у больных ИБС с умеренным гемолизом было сопоставимым с таковым у здоровых доноров (табл. 6).

Известно, что эритроциты осуществляют сорбцию ФХ из плазмы крови, используя в качестве его источника липопротеины высокой плотности. Накопление ФХ особенно увеличивается в старых, длительно циркулирующих красных клетках крови [Selle H. et al., 1993].

В послеоперационном периоде у больных ИБС с умеренным гемолизом содержание ЛФХ в мембране эритроцитов, как показали результаты настоящего исследования, сохранялось выше нормы, отмечалось увеличение доли фосфатидной кислоты (ФК) по сравнению с дооперационным этапом и нормой, при этом содержание ФИ в мембране эритроцитов нормализовалось (табл. 6).

Подобные изменения фосфолипидного спектра мембраны могли быть связаны, по всей видимости, с поступлением в кровяной ток молодых форм эритроцитов, имеющих соответствующий норме фосфолипидный спектр мембраны.

Послеоперационное увеличение доли ФК в мембране эритроцитов, характерное для больных ИБС обеих групп исследования, было обусловлено, на наш взгляд, активацией фосфолипаз С и D. Как известно, фосфолипаза С расщепляет ФИ, образуя при этом вторичные мессенджеры – диацилглицерол и инозитолтрифосфат [Nogaroli L. et al., 2005]. Диацилглицерол может гидролизироваться с помощью диацилглицероллипазы в моноацилглицерол и свободные жирные кислоты, или подвергается фосфорилированию диацилглицеролкиназой с образованием фосфатидной кислоты [Luo B. et al., 2004]. Фосфолипаза D осуществляет гидролиз ФХ, при этом продуктами реакции являются фосфатидная кислота и холин [Liscotovich M. et al., 2000].

Несмотря на мобилизацию костномозгового пула ретикулоцитов, как предполагается, с нормальным фосфолипидным спектром клеточной

мембраны, у обследованных в настоящей работе больных ИБС повышения содержания ФИ и ФХ при анализе фосфолипидного состава мембраны эритроцитов не выявлялось (табл. 6), что, возможно, было связано с расщеплением данных ФЛ фосфолипазами С и D. При этом надо заметить, что ФХ способен влиять на микрореологические свойства эритроцитов. Так, к примеру, показано, что при проведении операций в условиях ИК с применением магистралей дренажных трубок, покрытых фосфатидилхолином, у кардиохирургических больных снижается агрегация эритроцитов по сравнению с пациентами, у которых применялись непокрытые перфузионные системы [Hunter S., Angelini G.D., 1993].

У больных с выраженной гемоглобинемией фосфолипидный спектр мембраны эритроцитов на дооперационном этапе, как показали результаты настоящего исследования, варьировал в пределах нормы, что могло быть, на наш взгляд, обусловлено поступлением в циркуляцию значительного числа молодых форм эритроцитов, т.е. более высоким содержанием ретикулоцитов в крови до операции (табл. 2), чем у больных с умеренным гемолизом, которое происходило в ответ на более интенсивное разрушение эритроцитов, предшествующее операции.

После хирургического вмешательства у пациентов с выраженным гемолизом были выявлены разнонаправленные изменения фосфолипидного спектра мембраны эритроцитов: отмечалось увеличение содержания ЛФХ, ФК и уменьшение доли ФХ и ФИ по сравнению с аналогичными показателями у здоровых доноров (табл. 6).

Повышение содержания ЛФХ и дефицит ФИ в мембране эритроцитов были обусловлены, возможно, активацией фосфолипазы A_2 , гидролизующей ФЛ (преимущественно ФХ) [Namgaladze D., Brüne B., 2006]. Данное предположение подтверждается в работе P. Bruins et al. [2000], которые при моделировании условий ИК показали увеличение содержания лизофосфатидов в мембранах липосом, что было обусловлено гидролизом ФХ фосфолипазой A_2 [Metcalf R.G. et al., 2010]. Кроме того, была

установлена активация данного фермента у кардиохирургических пациентов после ИК, коррелирующая с уровнем гидролиза ФЛ мембраны эритроцитов. Увеличение активности фосфолипазы А₂ авторы объясняют назначением высоких доз гепарина при проведении ИК [Nakamura H. et al., 1995].

В настоящем исследовании выявлена отрицательная взаимосвязь между уровнем постперфузионной гемоглобинемии и долей ФХ в мембране эритроцитов ($r = -0,66$, $p < 0,01$), что подчеркивает высокую значимость процессов интраоперационной дегградации ФХ и изменений фосфолипидного спектра плазмолеммы в механизмах развития постперфузионного гемолиза, которые наиболее характерны для пациентов с выраженной гемолобинемией (табл. 6).

Снижение концентрации ФХ также может быть связано с активацией ПОЛ, так как ФХ содержит в своей структуре большое количество ненасыщенных связей и легко подвергается окислению свободными радикалами [Wong-ekkabut J. et al., 2007]. В период реперфузии во время проведения ИК отмечается увеличение распада ФХ в мембране красных клеток крови [Frey B. et al., 2000]. Другой причиной уменьшения доли ФХ в клеточной мембране является активация фосфолипазы D, специфически гидролизующей данную молекулу [Krzystanek M. et al., 2010].

Увеличение содержания ФК в мембране эритроидных клеток, вызванное активацией фосфолипазы D, способствует перемещению фосфатидилсерина (ФС) во внешний слой мембраны красных клеток крови, что повышает агрегационную способность эритроцитов, способствует образованию тромбов, усугубляя течение сердечно-сосудистых заболеваний [Noh J.-Y. et al., 2010]. Вероятно, что активация фосфолипазы C, также сопровождающаяся образованием ФК [Nogaroli L. et al., 2005], потенцирует транслокацию ФС во внешний слой плазмолеммы эритроцитов. Кроме того, при атеросклерозе уже присутствует нарушение асимметрии мембранных ФЛ красных клеток крови, которая в норме характеризуется преимущественным расположением СФМ и ФХ во внешнем слое мембраны, а ФС и ФЭА – во

внутреннем ее слое, что приводит к изменению структурной организации мембраны [Jiménez J.A. et al., 2012].

При исследовании связывания везикул, состоящих из фосфолипидов ФХ, ФС, ФИ и ФК, с белками терминального комплекса комплемента наибольшая степень их связывания с C5b6 была выявлена для везикул, содержащих ФС, ФИ и ФК, по сравнению с везикулами, содержащими другие липиды. Связывание фосфолипидов ФХ, ФС, ФИ и ФК с C5b6 препятствует его взаимодействию с C7 и в дальнейшем – образованию терминального комплекса комплемента на мембране клетки [Marshall P. et al., 1996].

Возможно, что повышенное содержание ЛФХ в мембране эритроцитов, образующегося при активации фосфолипазы A₂, способствует интенсификации гемолиза у пациентов с выраженной гемоглобинемией. В работе L.M. Chi et al. [1990] показано, что увеличение содержания ЛФХ в мембране эритроцитов приводило к изменению формы клеток и трансформации их в эхиноциты, что способствовало развитию гемолиза. Вместе с тем, отмечено, что повышенные концентрации ЛФХ в клеточной мембране изменяют ее проницаемость и текучесть [Bing R. J. et al., 1993].

Результаты настоящего исследования показали, что абсолютное количество различных фракций ФЛ в мембране красных клеток крови повторяло динамику их относительного содержания, за исключением фракций ФХ и ФЭА: абсолютное содержание этих ФЛ в мембране эритроцитов было пониженным до и после операции, в то время как относительное их количество соответствовало норме (кроме формирования относительного дефицита ФХ у больных ИБС с выраженным гемолизом после ИК) (табл. 6).

В исследовании Л.Н. Солохи, А.А. Пушникова [2007] была продемонстрирована взаимосвязь низких значений ФХ и ФЭА в мембране красных клеток крови у больных ИБС с высоким уровнем триацилглицеролов в плазме. Как известно, атеросклероз сопровождается

усилением ПОЛ [Магеррамов А.М. и соавт., 2007]. Свободные радикалы, образующиеся в результате активации ПОЛ, окисляют ФХ, содержащий большое количество полиненасыщенных жирных кислот, что, безусловно, проявляется снижением абсолютного содержания ФХ [Matsumoto T. et al., 2007]. Кроме того, снижение ФХ и ФЭА в мембране эритроцитов у больных ИБС, очевидно, потенцируется естественным метаболизмом арахидоновой кислоты, входящей в состав данных ФЛ, при активации ФИ-сигнального каскада [Коновалова Т.Т., Смирнова И.П., 2005].

Общеизвестно, что липидное микроокружение и его состояние оказывают влияние на функционирование интегральных белков. К таковым относится Na^+/K^+ -АТФаза, принимающая участие в транспорте соответствующих ионов [Болдырев А.А., 2008].

Так, до операции активность Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов у пациентов с умеренным послеоперационным гемолизом (т.е. в группе 1) была ниже нормы, а у пациентов с выраженной гемоглобинемией варьировала в пределах таковой (табл. 4, рис. 3). Известно, что снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов характерно для сердечно-сосудистых заболеваний [Новицкий В.В. и соавт., 2004; Suhail M., 2010]. В исследовании И.Е. Ганелиной и соавт. [2000] также продемонстрировано снижение активности этого фермента у больных ИБС по сравнению со здоровыми донорами.

Как было показано в настоящем исследовании, у пациентов с умеренным гемолизом отмечалось увеличение общего содержания ХЛ и соотношения ХЛ/ФЛ в мембране эритроцитов до операции. По данным литературы, с увеличением тяжести ИБС соотношение ХЛ/ФЛ в мембране красных клеток крови увеличивается, при этом отмечается снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы [Смирнова И.П. и соавт., 2005].

Кроме того, вследствие активации свободнорадикального окисления у больных ИБС происходит окислительная модификация белковых молекул. Активные формы кислорода, запускающие механизмы образования

свободных радикалов, в первую очередь повреждают белки плазмолеммы, что приводит к инактивации ферментов, изменению структурной организации мембранных протеинов и лизису клетки [Коробейникова Э.Н. и соавт., 2006]. Следовательно, у пациентов с умеренным гемолизом понижению активности Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов до операции, по всей видимости, способствует не только высокое содержание ХЛ в липидном бислое, но и окислительная модификация белков мембраны красных клеток крови. У больных с выраженной гемоглобинемией сопоставимость активности фермента с нормой в дооперационном периоде,

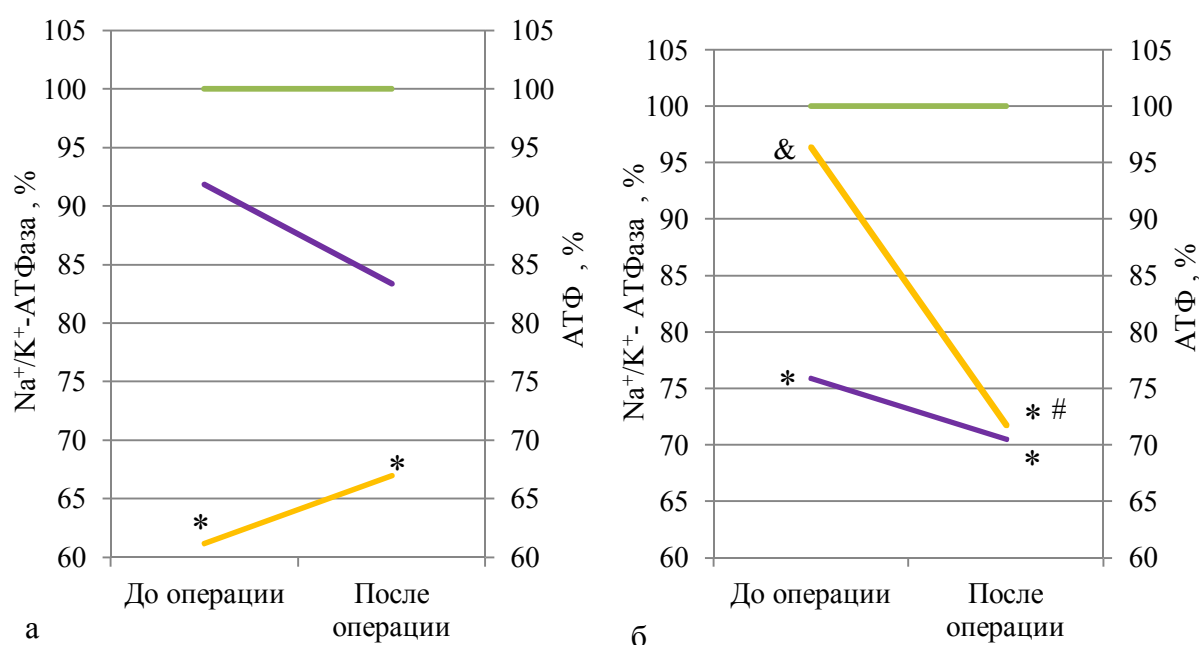


Рис. 3. Активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов и содержание АТФ в эритроцитах у кардиохирургических больных, оперированных в условиях ИК, по отношению к здоровым донорам (100%): а – пациенты с умеренным гемолизом, б – пациенты с выраженным гемолизом.

Примечание: ■ - активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов, %; ■ - содержание АТФ в эритроцитах, ■ - здоровые доноры, %; * - статистически значимые различия по сравнению с показателями у здоровых доноров; # - по сравнению с показателями у больных ИБС до операции, & - статистически значимые различия между показателями у кардиохирургических больных с умеренным и выраженным гемолизом на соответствующем этапе исследования

вероятно, была обусловлена достоверно большим содержанием молодых форм эритроцитов в крови, мембрана которых характеризуется невысоким

соотношением ХЛ/ФЛ и нормальным фосфолипидным спектром (табл. 5, 6). В целом, это свидетельствует о циркуляции в крови у больных с выраженным гемолизом более молодой популяции эритроцитов, что подтверждается наличием ретикулоцитоза до операции (табл. 2). Более того, при объединении в общую группу больных ИБС с умеренным и выраженным гемолизом, были установлены положительные взаимосвязи уровня гемоглобинемии до операции с активностью Na^+/K^+ -АТФазы мембраны эритроцитов ($r = 0,56$, $p < 0,05$) и относительным содержанием ФЭА в ней ($r = 0,73$, $p < 0,01$), а также негативные взаимосвязи – с величиной соотношения ХЛ/ФЛ ($r = -0,55$, $p < 0,05$) и долей СФМ ($r = -0,72$, $p < 0,01$) в мембране.

В исследованиях ряда авторов на экспериментальных животных было продемонстрировано, что активность Na^+/K^+ -АТФазы и доля СФМ в мембране ретикулоцитов была ниже, а содержание ФЭА, напротив, выше аналогичных показателей в эритроцитах [Van der Schaft P.H. et al., 1987; Mairbäurl H. et al., 2000]. В исследовании M. Simó et al. [2007] у пациентов с анемией был выявлен пониженный уровень содержания ХЛ в мембране ретикулоцитов по сравнению с аналогичным показателем в зрелых красных клетках крови.

С одной стороны, молодые формы эритроцитов образуются и поступают в кровоток как ответная реакция костного мозга на повышенное разрушение эритроцитов еще до операции. С другой стороны, установленные нами корреляционные взаимосвязи (см. выше) указывают на то, что интенсивнее гемолиз протекает у больных с выраженной постперфузионной гемоглобинемией, у которых интенсивному лизису подвергается более молодая популяция эритроцитов. Существенно измененные в условиях атерогенеза клетки у больных с умеренным гемолизом в меньшей степени подвергаются лизису.

В послеоперационном периоде у пациентов с умеренным гемолизом активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов оставалась на уровне

дооперационных значений, а у больных с выраженной гемоглобинемией снижалась по сравнению с исходными показателями и нормой (табл. 4).

Известно, что снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы при ИК коррелирует с повышением активности комплемента [Kurian G.A., Paddikkala J., 2007]. Активность данного фермента также изменяется в присутствии активных форм кислорода и интенсификации ПОЛ, при этом ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы при усиленной липопероксидации связано с повреждением сульфгидрильных групп этого фермента [Новицкий В.В. и соавт., 2004].

Сведения о влиянии ХЛ на активность Na^+/K^+ -АТФазы противоречивы. С одной стороны, понижение содержания ХЛ в мембране красных клеток крови приводит к модификации кинетических параметров фермента: сродство к внутриклеточному Na^+ уменьшается, максимальная скорость перемещения иона увеличивается и в то же время сродство к внеклеточному K^+ не изменяется [Bastiaanse E.M. et al., 1997]. Авторы предполагают, что снижение активности фермента может быть связано как с прямым воздействием ХЛ на активность фермента, так и с опосредованным эффектом: ХЛ повышает плотность упаковки ФЛ, снижая текучесть мембраны эритроидных клеток. Следовательно, увеличение концентрации ХЛ в мембране эритроцитов ингибирует активность Na^+/K^+ -АТФазы [Chen Y. et al., 2009].

Угнетение активности Na^+/K^+ -АТФазы приводит к изменению осмотического градиента, снижая осмотическую резистентность эритроцитов [Болдырев А.А., 2008]. Кроме того, ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы способствует снижению градиента ионов K^+ на мембране эритроцита, что, в свою очередь, может привести к ограничению выхода ионов K^+ через Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы, способные регулировать объем красных клеток крови, предотвращая их осмотический лизис [Трубачева О.А. и соавт., 2009].

Интенсивность функционирования системы активного транспорта в эритроците напрямую зависит от внутриклеточного содержания аденозинтрифосфата (АТФ). Содержание АТФ в красных клетках крови коррелирует с их жизнеспособностью, а повышение или снижение уровня этого макроэрга в клетках сочетается с развитием ряда заболеваний [Mikirova N. et al., 2005].

Согласно полученным нами данным, содержание АТФ в эритроцитах у больных ИБС группы 1 (с умеренным послеоперационным гемолизом) было сопоставимым с контрольными значениями на обоих этапах исследования (табл. 4). В работе Н.М. Елкиной и соавт. [2011] показано, что соотношение АТФ и фосфоенолпирувата в красных клетках крови у больных ИБС приближается к норме. Несмотря на усиление гликолитических реакций в результате окислительного стресса при ИБС, авторами выявлено сохранение определенного баланса в генерировании и расходовании АТФ в эритроцитах. В связи с этим можно думать, что нормальное содержание АТФ в эритроидных клетках у больных ИБС группы 1 после операции с ИК связано с меньшей выраженностью гемолиза до операции (табл. 2, 4).

Гемолиз сопровождается увеличением числа незрелых эритроцитов [Razzak M., et al., 2010]. В исследовании О.Н. Филипповой и соавт. [2005] отмечено, что развитие гемолитической анемии сопровождается образованием в костном мозге неполноценных эритроцитов, развивающихся в условиях напряженного эритропоэза, что отражается на снижении уровня АТФ, необходимого для работы Na^+/K^+ -АТФазы. Незрелые ретикулоциты по сравнению с более зрелыми их формами характеризуются повышенной деформируемостью и неправильной формой [Koury M.J. et al., 2005]. Возможно, у подобных ретикулоцитов имеет место также снижение уровня АТФ в клетке.

У больных ИБС с выраженным послеоперационным гемолизом на обоих этапах исследования содержание АТФ в эритроцитах было сниженным по сравнению с таковым у здоровых доноров (табл. 4).

Высокая степень гемолиза, как известно, способствует активации эритропоэза за счет сокращения генерационного времени эритрокариоцитов в костном мозге [Воробьев А.И., 2005], что, вероятно, приводит к снижению синтеза ферментов гликолиза и последующему дефициту АТФ в эритроцитах. Интересно, что у пациентов с гипотиреоидной кардиомиопатией выявлено значительное снижение содержания АТФ и повышение уровня аденозиндифосфата и аденозинмонофосфата в эритроцитах [Серебрякова О.В. и соавт., 2008]. Однако причины дефицита АТФ в красных клетках крови при данном заболевании авторами этой работы не обсуждаются.

Содержание АТФ в эритроцитах оказывает влияние на реализацию кислородтранспортной функции крови на уровне микроциркуляции, способствует агрегации и деформации красных клеток крови под действием напряжения сдвига. Способность эритроцитов к деформации в значительной степени зависит от внутриклеточного содержания АТФ: при снижении уровня АТФ в клетке деформируемость ее уменьшается, при повышении макроэрга – возрастает. С помощью АТФ осуществляется фосфорилирование, влияющее на образование связи между спектрином мембраны эритроцитов и актином [Li J. et al., 2007]. Снижение деформируемости эритроцитов в условиях энергодефицита подчеркивает ведущую роль АТФ в функционировании эритроцитов, поддержании их формы и способности проходить через капилляры [Овчинникова О.А., Тихомирова И.А., 2012].

Повышение интенсивности ПОЛ в мембране эритроидных клеток и низкое содержание АТФ в клетках неизбежно приводит к нарушению организации их цитоскелета, а также к уменьшению активности АТФаз, что обуславливает снижение осмотической резистентности красных клеток крови и приводит к повышению концентрации свободного гемоглобина в крови в результате осмотического гемолиза.

Патогенез умеренного гемолиза. В процессе атерогенеза при ИБС происходит активация системы комплемента, что сопровождается образованием в крови растворимого ТКК (рис. 4). Генерирование ТКК способствует образованию пор в мембране эритроцитов, однако нормальная экспрессия CD55 на их мембране обуславливает ограничение сборки ТКК на поверхности эритроцитов. Благодаря этому и высокому содержанию в мембране эритроцитов ХЛ, снижающего проницаемость липидного бислоя, в целом проницаемость мембраны эритроцитов остается нормальной.



Рис. 4. Схема патогенеза внутрисосудистого гемолиза у больных ишемической болезнью сердца с умеренной постперфузионной гемоглобинемией до операции.

Примечание. ХЛ – холестерол, ФЛ – фосфолипиды, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, ФИ – фосфатидилинозитол, АТФ – аденозинтрифосфат.

Кроме того, повышенное содержание ХЛ в мембране красных клеток крови оказывает ингибирующее действие на активность Na^+/K^+ -АТФазы в ней, что является причиной ионного дисбаланса в эритроцитах и вызывает повышенный их лизис до операции, компенсируемый активацией эритропоэза.

Во время операции контакт крови с нефизиологическим контуром аппарата ИК еще более активизирует систему комплемента, вызывая генерацию большого количества ТКК (рис. 5).

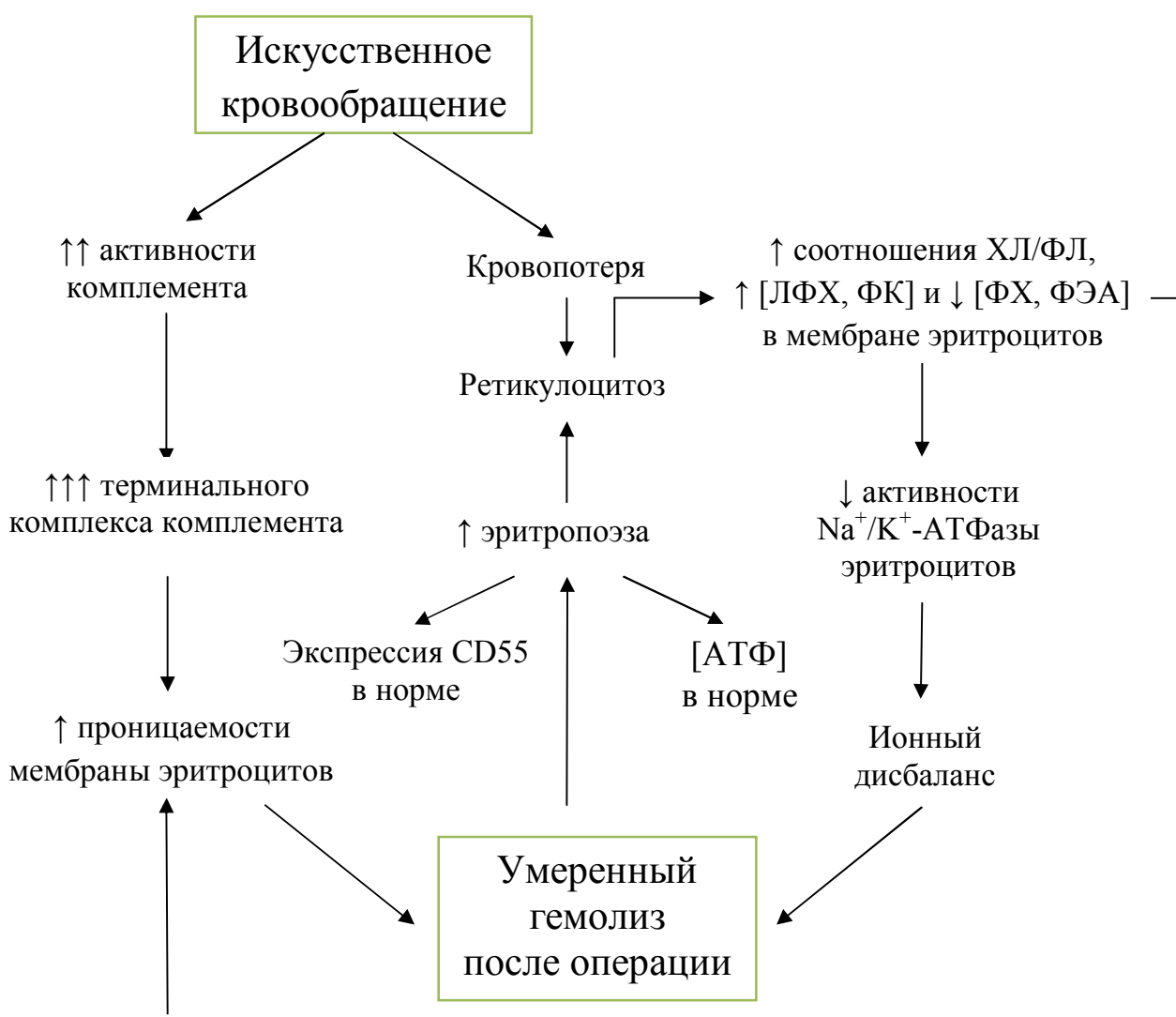


Рис. 5. Схема патогенеза умеренного постперфузионного гемолиза у больных ишемической болезнью сердца после операции с искусственным кровообращением.

Примечание. ХЛ – холестерол, ФЛ – фосфолипиды, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, АТФ – аденозинтрифосфат, ФК – фосфатидная кислота, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин.

Далее ТКК преобразуется в мембраноатакующий комплекс и фиксируется на мембране эритроцитов, образуя в ней поры, повышая проницаемость мембраны красных клеток крови и опосредуя умеренный постперфузионный гемолиз, преимущественно по комплемент-зависимому механизму. Ионный дисбаланс после операции, по-видимому, не усугубляется, так как активность Na^+/K^+ -АТФазы и содержание АТФ в эритроцитах остаются на уровне дооперационных значений.

Патогенез выраженного гемолиза. Механизм развития внутрисосудистого гемолиза до операции у больных с выраженной гемоглобинемией сходен с таковым у пациентов с умеренным гемолизом на аналогичном этапе исследования (рис. 6). По всей видимости, гемолиз сопровождается компенсаторным сокращением генерационного времени созревания эритрокариоцитов в костном мозге, что делает недостаточным синтез в клетках белковых структур (ферментов гликолиза и поверхностных антигенов), опосредует дефицит CD55 и снижение образования АТФ в красных клетках крови. Последнее связано с угнетением функционирования Na^+/K^+ -АТФазы, которое компенсируется выходом в кровь молодых форм эритроцитов, опосредуя, как и в первом случае, внутриклеточный ионный дисбаланс, но обусловленный другим механизмом (дефицитом макроэргов). Уменьшение экспрессии ингибиторной молекулы CD55 способствует активации системы комплемента и увеличению проницаемости мембраны.

Влияние ИК на развитие выраженного постперфузионного гемолиза связано с выраженной активацией эритропоэза до ее проведения (по сравнению с больными группы сравнения на соответствующем этапе исследования) и ПОЛ во время экстракорпоральной перфузии [Чумакова С.П. и соавт., 2012]. Интенсификация ПОЛ способствует окислению ФХ и последующему образованию ЛФХ, а также росту соотношения ХЛ/ФЛ, что приводит к нарушению структуры липидного бислоя и снижению гемолитической стойкости эритроцитов (рис. 7).

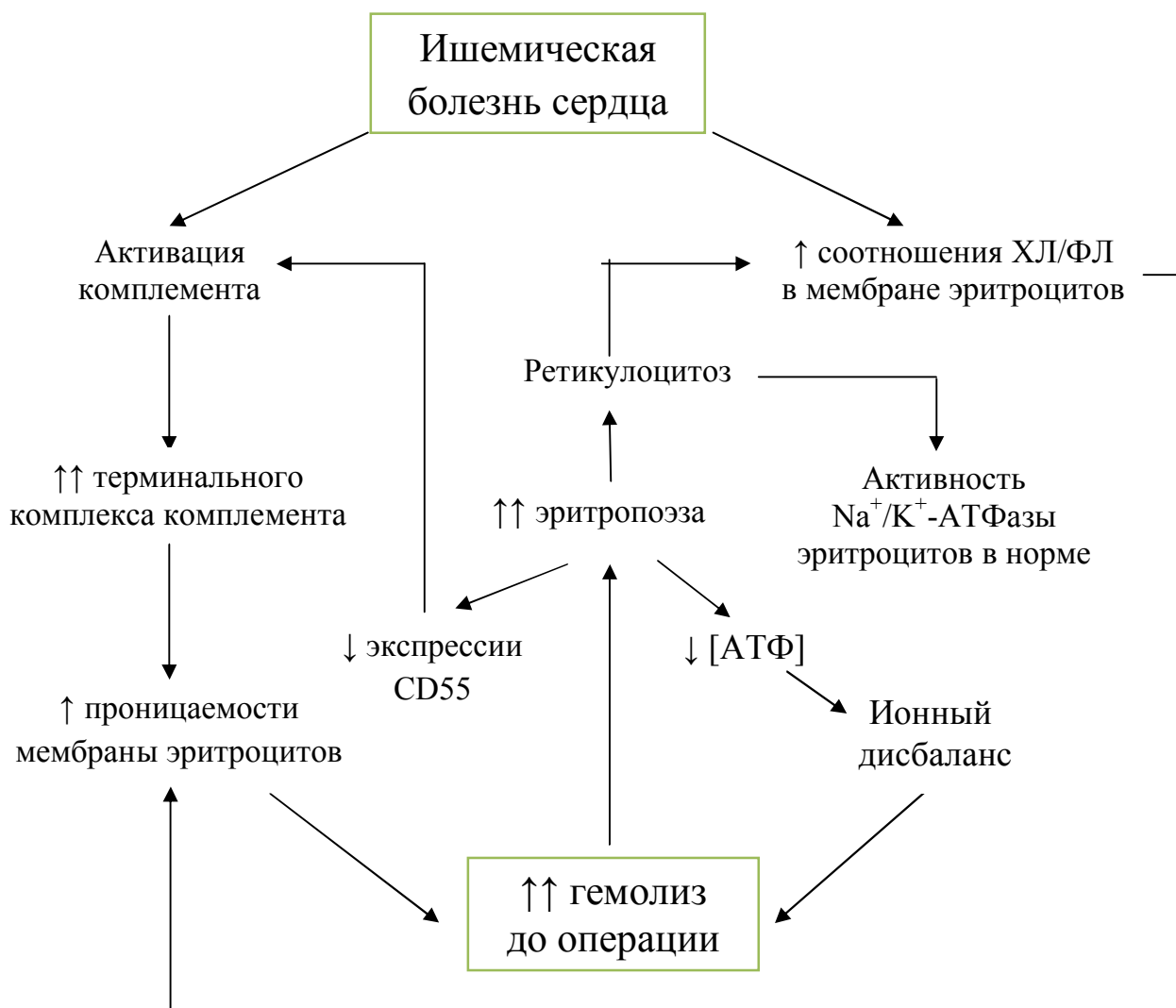


Рис. 6. Схема патогенеза внутрисосудистого гемолиза до операции у больных ишемической болезнью сердца с выраженной постперфузионной гемоглобинемией.

Примечание: ХЛ – холестерол, ФЛ – фосфолипиды, АТФ – аденозинтрифосфат.

Кроме того, это угнетает активность Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов, которая (в отличие от больных с умеренным гемолизом) функционирует теперь в условиях дефицита АТФ, что становится причиной выраженного ионного дисбаланса в клетке и ее ускоренной гибели. Роль дефицита поверхностных молекул CD55 в потенцировании сборки ТКК на эритроцитах в условиях ИК становится менее значимой в связи с интенсивной активацией комплемента в экстракорпоральном контуре.

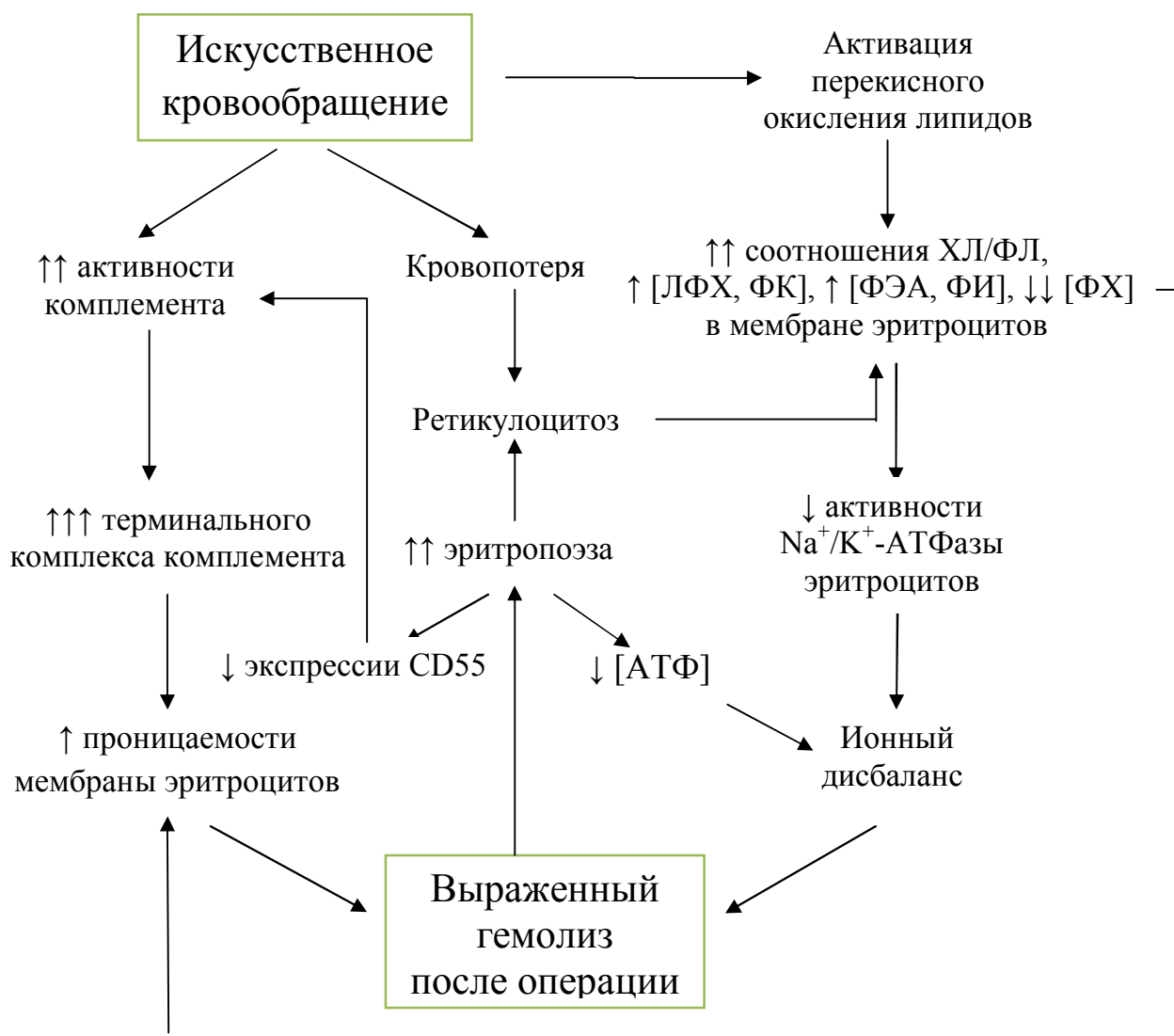


Рис. 7. Схема патогенеза выраженного постперфузионного гемолиза у больных ишемической болезнью сердца после операции с искусственным кровообращением.

Примечание. ХЛ – холестерол, ФЛ – фосфолипиды, ЛФХ – лизофосфатидилхолин, ФИ – фосфатидилинозитол, АТФ – аденозинтрифосфат, ФК – фосфатидная кислота, ФХ – фосфатидилхолин, ФЭА – фосфатидилэтаноламин.

Таким образом, ведущим патогенетическим фактором развития умеренного гемолиза в условиях ИК является активация системы комплемента во время операции. Развитие выраженного гемолиза в аналогичных условиях перфузии связано, прежде всего, с глубоким ионным дисбалансом в эритроцитах, формирующимся вследствие низкой активности Na^+/K^+ -АТФазы и недостатка АТФ в красных клетках крови. При этом ионный дисбаланс в эритроцитах – обязательное звено патогенеза

внутрисосудистого гемолиза до операции как у больных с умеренной, так и с выраженной гемоглобинемией. Между тем, экспрессия Резус-антигенов и содержание гликофоринов и CD35-молекул на мембране красных клеток крови не оказывают влияния на развитие гемолитических реакций при ИК.

Исходя из изложенного, становится очевидной ключевая роль дезорганизации структуры мембраны эритроцитов в патогенезе умеренного и выраженного гемолиза у кардиохирургических больных при ИК. Образование пор в мембране красных клеток крови, вызванное активацией системы комплемента, обуславливает развитие умеренного гемолиза в условиях ИК у кардиохирургических больных. Ионный дисбаланс, обусловленный нарушением функционирования Na^+/K^+ -АТФазы в мембране эритроцитов в сочетании с дефицитом АТФ определяет развитие выраженного гемолиза у больных ИБС, оперированных в условиях ИК.

В целом, результаты настоящего исследования позволили выявить факторы риска и ключевые звенья патогенеза умеренного и выраженного гемолиза в условиях ИК, что имеет важное фундаментальное значение. Кроме того, полученные данные, несомненно, несут в себе и прикладной аспект, поскольку могут служить основой для разработки системы первичной профилактики развития постперфузионных гемолитических реакций, что особенно важно для пациентов с выраженным гемолизом.

ВЫВОДЫ:

1. Уровень экспрессии молекул-ингибиторов комплемента CD35 на эритроцитах у больных ишемической болезнью сердца не влияет на интенсивность гемолиза во время операции в условиях искусственного кровообращения, в то время как исходный (до операции) дефицит молекул CD55 и высокая проницаемость мембраны эритроцитов обуславливают выраженный интраоперационный гемолиз.
2. Искусственное кровообращение потенцирует активацию системы комплемента у больных ишемической болезнью сердца во время операции аортокоронарного шунтирования, при этом исходно (до операции) она существенно выше у пациентов с выраженной послеоперационной гемоглобинемией, чем при умеренном интраоперационном гемолизе.
3. Фенотип *сс* Резус-системы эритроцитов у кардиохирургических больных предрасполагает к развитию выраженной постперфузионной гемоглобинемии. Исходный (до операции) дефицит эритроцитов, экспрессирующих гликофорины A⁺ и B⁺, у больных ишемической болезнью сердца с умеренной гемоглобинемией компенсируется после операции поступлением в кровотоки эритроцитарных клеток костномозгового резерва; у пациентов с выраженным гемолизом их количество сохраняется в пределах нормы в связи с ретикулоцитозом до и после операции.
4. При умеренной постперфузионной гемоглобинемии у больных ишемической болезнью сердца повышение концентрации холестерина и дефицит общих фосфолипидов в мембране эритроцитов до и после операции сочетаются с предшествующими перфузии изменениями ее фосфолипидного спектра – низким абсолютным содержанием фосфатидилинозитола, фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина при избытке лизофосфатидилхолина. В послеоперационном периоде они сохраняются на фоне нормализации концентрации фосфатидилинозитола и повышения содержания фосфатидной кислоты.

5. Выраженная постперфузионная гемоглобинемия у больных ишемической болезнью сердца после оперативного вмешательства в условиях искусственного кровообращения сопровождается аналогичными, как и при умеренном гемолизе, нарушениями спектра фосфолипидов мембраны эритроцитов (при исходном нормальном их долевым распределении), а также (в отличие от умеренного гемолиза) понижением относительного и абсолютного содержания фосфатидилинозитола и фосфатидилхолина при прогрессирующем увеличении соотношения «холестерол-фосфолипиды».
6. Низкая активность Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатазы мембраны эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца с выраженным гемолизом после экстракорпоральной перфузии ассоциирована с дефицитом внутриклеточного аденозинтрифосфата до и после операции, а при умеренном постперфузионном гемолизе – с нормальным его содержанием в эритроцитах.

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. 102–118.
2. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы в эритроцитах при гемолитической анемии / О.Н. Филиппова, И.А. Шперлинг, Н.В. Рязанцева и др. // Успехи современного естествознания. – 2005. – № 5. – С. 116–117.
3. Активные формы кислорода в живых системах / А.М. Магеррамов, И.А. Алиев, У.Ф. Аскерова и др. // Вестник Бакинского университета. Серия естественных наук. – 2009. – № 4. – С. 41–52.
4. Анализ смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в 12 регионах Российской Федерации, участвующих в исследовании «Эпидемиология сердечно-сосудистых заболеваний в России» / С.А. Шальнова, А.О. Конради, Ю.А. Карпов и др. // Российский кардиологический журнал. – 2012. – Т. 87, № 5. – С. 6–11.
5. Аникеева, Т.Б. Изменение реологических свойств при ишемической болезни сердца / Т.Б. Аникеева // Международный медицинский журнал. – 2010. – № 2. – С. 35–37.
6. Атеросклероз и окислительные процессы. Новые способы оценки окислительной модификации белков / Ю.И. Рагино, В.А. Баум, Я.В. Полонская и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – Т. 122, № 4. – С. 67–73.
7. Бабаев, М.А. Синдром полиорганной недостаточности после сердечно-сосудистых операций в условиях искусственного кровообращения: автореф. дис. ... д-ра мед. наук / М.А. Бабаев. – М., 2011. – 48 с.
8. Биологическая роль свободных радикалов в развитии патологических состояний / А.О. Сыровая, Ф.С. Леонтьева, И.В. Новикова, С.В. Иванникова // Международный медицинский журнал. – 2012. – № 3. – С. 98–104.
9. Биохимия человека: пер. с англ.: в. 2 т. Т. 2 / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. – М.: Мир, 1993. – 415 с.
10. Бойтлер, Э. Нарушение метаболизма эритроцитов и гемолитическая

анемия / Э. Бойтлер. – М.: Медицина, 1981. – 256 с.

11. Болдырев, А.А. Роль Na^+/K^+ -насоса в возбудимых тканях (обзор) / А.А. Болдырев // Журнал Сибирского федерального университета. Серия «Биология». – 2008. – Т. 1, № 3. – С. 206-225.

12. Васильев, А.П. Модификация липидной структуры клеточной мембраны у больных с ишемической болезнью сердца с различной степенью поражения коронарного русла / А.П. Васильев, Ю.Н. Сенаторов, Н.Н. Стрельцова // Кардиология. – 2005. – № 2. – С. 53–54.

13. Влияние механической резистентности эритроцитов на выраженность гемолиза после операций с искусственным кровообращением / С.П. Чумакова, В.М. Шипулин, О.И. Уразова, В.В. Новицкий и др. // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2012. – № 1. – С.65–69.

14. Влияние умеренной гипотермии на сывороточный уровень нейронспецифических белков, кислородное обеспечение и нейрокогнитивный статус пациентов при операциях реваскуляризации миокарда / М.В. Агеева, В.Г. Постнов, Л.Г. Князькова и др. // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2011. – № 1. – С. 35–40.

15. Воробьев, А.И. Руководство по гематологии: в 3 т. Т. 3 / А.И. Воробьев. – М.: Ньюдиамед, 2005. – 544 с.

16. Воробьева, Е.Н. Роль свободно-радикального окисления в патогенезе болезней системы кровообращения / Е.Н. Воробьева, Р.И. Воробьев // Бюллетень СО РАМН. – 2005. – Т. 118, № 4. – С. 24–30.

17. Гаврилюк, В.П. Структурно-функциональные нарушения эритроцитов и их коррекция у больных с легким и тяжелым течением острого панкреатита / В.П. Гаврилюк, П.М. Назаренко, А.И. Конопля // Курский научно-практический вестник "Человек и его здоровье". – 2007. – № 3. – С. 29-36.

18. Геннис, Р. Биомембраны: молекулярная структура и функции: пер. с англ. / Р. Геннис. – М.: Мир, 1997. – 624 с.

19. Генотипирование биологического материала по локусам HLA-DQA1, AB0, AMEL с помощью биочипов / Д.О. Фесенко, О.Н. Митяева, Т.В.

- Наседкина и др. // Молекулярная биология. – 2010. – Т. 44, № 3. – С. 456–462.
20. Голухова, Е.З. Клеточная терапия в кардиологии и сердечно-сосудистой хирургии: обзор рандомизированных исследований. Реалии и перспективы / Е.З. Голухова, Т.Т. Какучая // Креативная кардиология. – 2007. – № 1-2. – С. 55–74.
21. Гребенщикова, И.А. Эпидемиология ишемической болезни сердца и значение показателей периферического атеросклероза и функционального состояния почек в развитии коронарной болезни сердца у мужчин / И.А. Гребенщикова, М.В. Редькина, С.Ю. Левашов // Современные проблемы науки и образования: электронный журнал. – 2011. – № 5. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/99-4948>.
22. Дементьева, И.И. Интраоперационное повышение концентрации свободного гемоглобина в плазме крови (гемолиз) в кардиохирургии / И.И. Дементьева, Ю.А. Морозов, М.А. Чарная // Анестезиология и кардиореанимация. – 2008. – № 6. – С. 60–63.
23. Дефицит глюкозо-6-фосфат дегидрогеназы / Е.А. Скорнякова, А.Ю. Щербина, А.П. Продеус и др. // Трудный пациент. – 2007. – Т. 5, № 2. – С. 19–20.
24. Динамика показателей окислительного стресса в крови больных ишемической болезнью сердца до и после коронарного шунтирования / Н.Л. Воронцова, М.В. Богданов, А.С. Головкин и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2012. – № 4. – С. 13–17.
25. Донсков, С.И. Аллоиммунизация антигенами эритроцитов – глобальный популяционный процесс / С.И. Донсков, И.С. Липатова // Вестник службы крови России. – 2001. – № 3. – С. 18–24.
26. Дуткевич, И.Г. Тактика экстренной диагностики и лечения гемолитических гемотрансфузионных осложнений / И.Г. Дуткевич // Вестник хирургии им. И.И. Грекова. – 2007. – Т. 166, № 6. – С. 77–80.
27. Захарова, Н.Б. Тонкослойная хроматография нуклеотидов эритроцитов на пластинках Силуфол / Н.Б. Захарова, В.И. Рубин // Лабораторное дело. –

1980. – № 12. – С. 735-738.

28. 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.

29. Казарян, П.А. Мембранные аспекты патогенеза терминальной почечной недостаточности / П.А. Казарян, А.С. Баблюян, К.В. Егиазарян // Нефрология. – 2008. – Т. 12, № 4. – С. 59–61.

30. Казеннов, А.М. Исследование активности Na^+/K^+ -АТФ-азы в эритроцитах млекопитающих / А.М. Казеннов, М.Н. Маслова, А.Д. Шалабодов // Биохимия. – 1984. – № 7. – С. 1089–1094.

31. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. Т. 1. – Минск: Беларусь, 2000. – 463 с.

32. Карпов, Р.С. Сердце-легкие: патогенез, клиника, функциональная диагностика и лечение сочетанных форм ишемической болезни сердца и хронических обструктивных болезней легких / Р.С. Карпов, В.А. Дудко, С.М. Кляшев. – Томск: СТТ, 2004. – 606 с.

33. Кешилева, Р.К. Характер липидно-фосфолипидных нарушений у больных псориазом / Р.К. Кешилева, А.Б. Рахматов // Украинский журнал дерматологии, венерологии, косметологии. – 2010. – № 2 (37). – С. 51–56.

34. Кленова, Н.Г. Биохимические механизмы дезинтеграции эритроцитов человека в различных условиях функционирования: автореф. дис. ...д-ра биол. наук / Н.Г. Кленова. – Тюмень, 2003. – 37 с.

35. Кодин, А.В. Структурно-функциональная характеристика эритроцитов у больных прогрессирующей стенокардией на фоне различных схем медикаментозной терапии / А.В. Кодин, В.Ю. Полумисков, А.В. Лутай // Российский кардиологический журнал. – 2009. – Т. 76, № 2. – С. 49–53.

36. Коновалова, Т.Т. Роль липидов в структурно-функциональной организации клеточных мембран при атерогенезе и их коррекция у больных с ишемической болезнью сердца (сообщение 2) / Т.Т. Коновалова, И.П.

- Смирнова // Сибирский медицинский журнал. – 2005. – Т. 55, № 6. – С. 8-14.
37. Кононеко, В.А. Фликкер эритроцитов. Результаты экспериментальных исследований / В.А. Кононеко // Биологические мембраны. – 2009. – Т. 26, № 5. – С. 352–369.
38. Конторщикова, К.Н. Перекисная резистентность мембран эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца в процессе озонотерапии / К.Н. Конторщикова, Е.И. Кузьмина, И.Е. Окрут // Клиническая лабораторная диагностика. – 2004. – № 9. – С. 52–53.
39. Коробейникова, Э.Н. Окислительная модификация белков сыворотки крови у больных ишемической болезнью сердца и гипертонической болезнью с дислиппротеинемией и без нее / Э.Н. Коробейникова, Ю.В. Кудревич, Л.М. Яшина // Клиническая лабораторная диагностика. – 2006. – № 4. – С. 22–24.
40. Корчина, Т.Я. Ишемическая болезнь сердца при сахарном диабете: вопросы патогенеза, диагностики и хирургического лечения / Т.Я. Корчина. – Томск: STT, 2002. – 352 с.
41. Кузник, Б.И. Группы крови и система гемостаза / Б.И. Кузник // Гематология и трансфузиология. – 2010. – Т. 55, № 1. – С. 32–36.
42. Кузьмина, О.Ю. Клинико-эпидемиологические особенности метаболического синдрома у больных профессиональными заболеваниями автореф. дис. ...канд. биол. наук / О.Ю. Кузьмина. – Самара, 2009. – 25 с.
43. Лакомая, Л.А. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа при старении эритроцитов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Л.А. Лакомая. – Тюмень, 2006. – 52 с.
44. Липиды плазмы крови и реологические свойства эритроцитов у больных со стабильной стенокардией / И.Е. Ганелина, А.Д. Денисенко, Л.Н. Катюхин. и др. // Кардиология. – 2000. – № 8. – С. 62-63.
45. Липунова, Е.А. Система красной крови: Сравнительная физиология / Е.А. Липунова, М.Ю. Скоркина. – Белгород: Изд-во БелГУ, 2004. – 216 с.
46. Лобачёва, Г.В. Нитровазорегуляторы во время операций на сердце с

искусственным кровообращением. Нитроглицерин или нитропруссид натрия / Г.В. Лобачёва, М.М. Рыбка, Г.В. Юдин // Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2011. – Т. 8, № 6. – С. 48–52.

47. Локшин, Л.С. Искусственное и вспомогательное кровообращение в сердечно-сосудистой хирургии / Л.С. Локшин, Г.О. Лурье, И.И. Дементьева. – М.: Пресса, 1998. – 217 с.

48. Ломиворотов, В.Н. Гипотермическая защита мозга в кардиохирургии / В.Н. Ломиворотов // Патология кровообращения и кардиохирургия. – 2010. – № 3. – С. 7–10.

49. Лутай, М.И. Атеросклероз: современный взгляд на патогенез / М.И. Лутай // Украинский кардиологический журнал. – 2004. – № 1. – С. 22–34.

50. Лутай, М.И. Вторичная профилактика и медикаментозное лечение больных с ишемической болезнью сердца. Можно ли изменить прогноз? / М.И. Лутай, А.Ф. Лысенко // Украинский кардиологический журнал. – 2004. – № 3. – С. 9–20.

51. Луценко, М.Т. Дифференциальная диагностика устойчивости мембран эритроцитов периферической крови у беременных с герпес-вирусной инфекцией / М.Т. Луценко, И.А. Андриевская // Информатика и системы управления. – 2009. – № 4. – С. 71–77.

52. Матюшечев, В.Б. Влияние концентрации эритроцитов и ретикулоцитов на электрофоретическую подвижность эритроцитов / В.Б. Матюшечев, В.Г. Шамратова // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 3. Биология. – 2010. – № 1. – С. 99–102.

53. Медведев, М.А. Физиологическая сепарация эритроцитов на уровне дуги аорты / М.А. Медведев, Г.С. Коваль, Н.В. Рязанцева // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – № 4. – С. 37–40.

54. Медведева, И.В. Изменения клеточных мембран под воздействием факторов питания. Клинические и популяционные аспекты / И.В. Медведева, Е.Ф. Дороднева, И.Ф. Шоломов // Известия Челябинского научного центра УрО РАН. – 2001. – № 3. – С. 191–200.

55. Меньшиков, В.В. Лабораторные методы исследования в клинике / В.В. Меньшиков. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
56. Мешков, А.Н. Эффективность и безопасность терапии высокими дозами аторвастатина / А.Н. Мешков // Рациональная фармакотерапия в кардиологии. – 2010. – Т. 6, № 2. – С. 197–200.
57. Микашинович, З.И. Изменение активности ферментов антиоксидантной защиты у пациентов с разными формами ишемической болезни сердца / З.И. Микашинович, Е.В. Олемпиева, Р.А. Гридасова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 5. – С. 11–13.
58. 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.
59. 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. 62–69.
60. Морфологические особенности эритроцитов периферической крови у больных распространенным атеросклерозом / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, А.Г. Соколович, В.В. Михаленко // Клиническая лабораторная диагностика. – 2000. – № 11. – С. 19–21.
61. Нарушение активности натрий-калиевой АТФазы эритроцитов у пациентов с сахарным диабетом / З.М. Шамансурова, Ф.А. Мухамедова, А.Г. Цой и др. // Сахарный диабет. – 2009. – № 2. – С. 55–57.
62. Нгуен, Т.Х. Исследование структурного состояния мембран эритроцитов больных ишемической болезнью сердца разных возрастов / Т.Х. Нгуен // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2. – С. 97–103.
63. Новицкий, В.В. Физиология и патология эритроцита / В.В. Новицкий, Н.В. Рязанцева, Е.А. Степовая. – Томск: Изд-во Томского университета, 2004. – 202 с.

64. Оганов, Р.Г. Эпидемию сердечно-сосудистых заболеваний можно остановить усилением профилактики / Р.Г. Оганов, Г.Я. Масленникова // Профилактическая медицина. – 2009. – Т. 12, № 6. – С. 3–7.
65. Одинцов, Ю.Н. Биологические функции комплемента / Ю.Н. Одинцов, В.М. Перельмутер // Бюллетень сибирской медицины. – 2007. – № 2. – С. 72–83.
66. Оловникова, Н.И. Антигены эритроцитов человека / Н.И. Оловникова, Т.Л. Николаева // Гематология и трансфузиология. – 2001. – Т. 45, № 5. – С. 37–45.
67. Осипенко, А.Н. Жирные кислоты и их альдегиды как участники атеросклеротического процесса / А.Н. Осипенко // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 27, № 2. – С. 122–126.
68. Осипенко А.Н. Жирные кислоты крови в их взаимосвязи при атеросклерозом / А.Н. Осипенко, Н.В. Акулич, Ф.Н. Клишевич // Таврический медико-биологический вестник. 2012. – Т. 15, № 3. – С. 197–199.
69. Осипенко, А.Н. Жирные кислоты и жирные альдегиды крови как биохимический критерий полиорганной недостаточности / А.Н. Осипенко, Н.В. Акулич, А.В. Марочков // Клиническая лабораторная диагностика. – 2012. – № 10. – С. 29–31.
70. 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.
71. Отдаленные результаты перкутанных коронарных вмешательств у больных с хронической ишемической болезнью сердца / Ю. Н. Соколов, М.Ю. Соколова, А.В. Цыж и др. // Украинский кардиологический журнал. – 2005. - № 3. – С. 23-35.
72. Патогенетические факторы интраоперационного гемолиза в

кардиохирургии / С.П. Чумакова, О.И. Уразова, В.В. Новицкий, В.М. Шипулин // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2011. – № 4. – С. 22–28.

73. Перехристенко, И.М. Группоспецифические антигены системы АВ0 человека и современные методы их выявления (к 100-летию открытия групп крови) / И.М. Перехристенко, Р.М. Павлюк, Л.М. Исакова // Украинский медицинский журнал. – 2000. – № 5. – С. 5–8.

74. 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.

75. Пестов, Н.Б. Регуляция Ca^{2+} -АТФазы плазматических мембран / Н.Б. Пестов, Р.И. Дмитриев, М.И. Шахпоронов // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 43, С. 99–138.

76. Плотность и деформируемость эритроцитов больного аутоиммунной гемолитической анемией с антифосфолипидным синдромом в разные периоды болезни / Е.Н. Шурхина, Н.В. Цветаева, С.В. Колодей и др. // Гематология и трансфузиология. – 2003. – Т. 48, № 3. – С. 19–22.

77. Полиорганная недостаточность и окислительный стресс у больных ишемической болезнью сердца после ее хирургической коррекции / М.Н. Дерягин, В.В. Ломиворотов, В.Н. Ломиворотов и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2009. – Т. 135, № 1. – С.12–17.

78. Постоялко, А.С. Современное состояние проблемы инвазивного лечения стенозов коронарных артерий у больных ишемической болезнью сердца / А.С. Постоялко, Ю.П. Тараканов // Медицинские новости. – 2006. – Т. 2, № 8. – С. 18–26.

79. Прохорова, М.И. Большой практикум по углеводному и липидному обмену / М.И. Прохорова, З.Н. Туликова. – Ленинград: Изд-во ЛГУ, 1965. – 220 с.

80. Самородская, И.В. Диагностические критерии в практике врача / И.В.

- Самородская // Медицинская кафедра. – 2003. – № 3. – С. 49–55.
81. Северин, С.Е. Практикум по биохимии / С.Е. Северин, Г.А. Соловьева. – Москва: Изд-во МГУ, 1989. – 509 с.
82. Сибирна, Н.О. Гликопротеины мембран эритроцитов и строение их углеводных детерминант / Н.О. Сибирна, Т.В. Буслик // Биологическая студия. – 2009. – Т. 73, № 1. – С. 79–84.
83. Симонян, Л.Г. Изменение молекулярной организации эритроцитарных мембран при болезни Шенлейна-Геноха / Л.Г. Симонян // Медицинская наука Армении. – 2010. – № 1. – С. 90–97.
84. Симчук, А.П. Группы крови и Резус-фактор как маркеры предрасположенности к некоторым патологиям среди населения Крыма / А.П. Симчук, С. Гао // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2012. – Т. 25, № 2. – С. 151-155.
85. Смирнова, И.П. Перспективный мониторинг липидных спектров плазмы и липопротеидов высокой плотности у больных ишемической болезнью сердца в сочетании с артериальной гипертонией, сахарным диабетом типа 2 в процессе годовичного лечения ципрофибратом / И.П. Смирнова, Т.Т. Коновалова, В.Т. Манчук // Сибирский медицинский журнал. – 2005. – Т. 55, № 6. – С. 24–29.
86. Содержание адениловых нуклеотидов в эритроцитах крови у больных гипотиреоидной кардиомиопатией / О.В. Серебрякова, А.В. Говорин, В.И. Просяник, Е.В. Бакшеева // Дальневосточный медицинский журнал. – 2008. – № 1. – С. 28–30.
87. Соколова, Т.А. Генетические последствия наследственных гемолитических анемий (мембранопатий) / Т.А. Соколова // Успехи современного естествознания. – 2012. – № 10. – С. 26–33.
88. Солоха, Л.Н. Характеристика мембранных изменений в эритроцитах у лиц с высоким риском ишемической болезни сердца / Л.Н. Солоха, А.А. Пушкинов // Медицинская наука и образование Урала. – 2007. – № 6. – С. 47–

52.

89. Сравнительная оценка морфофункциональных свойств нативных и фиксированных эритроцитов / М.Ю. Скоркина, М.З. Федорова, С.Д. Чернявских и др. // Цитология. – 2011. – Т. 53, № 1. – С. 17–20.

90. Стандартизация оценки интраоперационного гемолиза при кардиохирургических операциях 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.

91. Сторожок, С.А. Молекулярные дефекты белков мембран эритроцита / С.А. Сторожок, А.Г. Санников // Вопросы медицинской химии. – 1996. – Т. 42. – С. 103–110.

92. Сторожок, С.А. Молекулярная структура мембран эритроцитов и их механические свойства / С.А. Сторожок, А.Г. Санникова, Ю.М. Захаров. – Тюмень: Изд-во Тюменского университета, 1997. – 140 с.

93. Сулова, Е.Ю. Клинико-генетические особенности различных вариантов течения: автореф. дис. ...канд. биол. наук / Е.Ю. Сулова. – Воронеж, 2007. – 23 с.

94. Сулова, Е.Ю. Современный взгляд диагностики развития атеросклероза и его осложнений / Е.Ю. Сулова // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2009. – Т. 12, № 2. – С. 41–46.

95. Турбасова, Н.В. Частота фенотипов групп крови системы АВ0 и Rhesus среди больных, имеющие некоторые патологии сосудистой системы / Н.В. Турбасова, М.В. Плотникова, С.А. Ильдебенева // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2009. – № 2. – С. 108–109.

96. Угрюжников, В.В. Реваскуляризация миокарда на работающем сердце в условиях параллельного искусственного кровообращения: автореф. дис. ... канд. мед. наук / В.В. Угрюжников. – М., 2010. – 14 с.

97. Участие активных форм кислорода в регуляции Ca^{2+} -активируемых K^{+} -каналов эритроцитов / О.А. Трубачева, С.В. Кремено, И.В. Петрова и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2009. – № 2. – С. 56–61.

98. Факторы риска хирургического лечения ИБС у женщин / В.С. Работников, М.М. Алшибая, О.А. Коваленко и др. // Грудная и сердечно-сосудистая хирургия. – 1999. – № 5. – С. 26–29.
99. Фролова, Е.С. Стабильная стенокардия: принципы диагностики и лечения / Е.С. Фролова // Российский семейный врач. – 2008. – Т. 12, № 1. – С. 4–29.
100. Характер изменения показателей обмена глюкозы в эритроцитах в зависимости от вида патологии / Н.М. Ёлкина, В.В. Казакова, И. Шашуа и др. // Таврический медико-биологический вестник. – 2011. – Т. 14, № 4. – С. 66–68.
101. Характеристика интенсивности гликолиза и образования гликозилированной формы гемоглобина в эритроцитах при кардиомиопатии / В.В. Казакова, Н.М. Ёлкина, Е.Г. Луцик и др. // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2011. – Т. 1, № 2(2). – С. 23–25.
102. 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.
103. Шилов, А.М. Некоторые особенности патогенеза ишемической болезни сердца / А.М. Шилов // Российский медицинский журнал. – 2007. – Т. 15, № 9. – С. 48–53.
104. 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.
105. Эллиот, В. Биохимия и молекулярная биология: пер. с англ. / В. Эллиот, Д. Эллиот. – М.: Изд-во НИИ биомедицинской химии РАМН, 1999. – 372 с.
106. A new model of centrifugal blood pump for cardiopulmonary bypass: design improvement, performance, and hemolysis tests / J. Leme, J. Fonseca, E. Bock et

- al. // *Artificial organs*. – 2011. – Vol. 35, N 5. – P. 443–447.
107. A novel mechanism of complement-independent clearance of red cells deficient in glycosyl phosphatidylinositol-linked proteins / M. Jasinski, P. Pantazopoulos, R.P. Rother et al. // *Blood*. – 2004. – Vol. 103, N 7. – P. 2827–2834.
108. A study association between AB0 and Rh blood group, sex, age and angina pectpris / Z.H. Siddiqui, M.A. Chaudhry, M. Nigar, H. Butt // *Science international (Lachore)*. – 2011. – Vol. 23, N 2. – P. 133–116.
109. Abnormal properties of red blood cells suggest a role in the pathophysiology of Gaucher disease / M. Franco, E. Collec, P. Connes et al. // *Blood*. – 2013. – Vol. 121, N 3. – P. 546–555.
110. Activation of the complement system during and after cardiopulmonary bypass surgery: postsurgery activation involves C-reactive protein and is associated with postoperative arrhythmia / P. Bruins, H. Velthuis, A.P. Yazdanbakhsh et al. // *Circulation*. – 1997. – Vol. 96, N 10. – P. 3542–3548.
111. Aging-related oxidative stress depends on dietary lipid source in rat postmitotic tissues / J.J. Ochoa, J.L. Quiles, S. Ibáñez, E. Martínez // *The journal of bioenergetics and biomembranes*. – 2003. – Vol. 35, N 3. – P. 267–275.
112. Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites/ N. Brouwers, C. van Cauwenberghe, S. Engelborghs, J.-C. Lambert et al. // *Molecular psychiatry*. – 2012. – Vol. 17. – P. 223–233.
113. Analysis of the hydrodynamic profile in different roller pumps models used in cardiopulmonary bypass/ F.U.J. Vieira, R.W. Vieira, N. Antunes et al. // *Revista brasileira de cirurgia cardiovascular*. – 2009. – Vol. 24, N 2. – P. 188–193.
114. Anstee, D.J. The functional importance of blood group-active molecules in human red blood cells / D.J. Anstee // *Vox sanguinis*. – 2011. – Vol. 100, suppl. 1 – P. 140–149.
115. Apell, H.-J. How do P-Type ATPases transport ions? / H.-J. Apell // *Bioelectrochemistry*. – 2004. – Vol. 63. – P. 149–156.

116. Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: search for a pathogenetic link / A. Griscelli-Bennaceur, E. Gluckman, M.L. Scrobohaci et al. // *Blood*. – 1995. – Vol. 85, N 5. – P. 1354–1363.
117. Arrigo, P.D. Synthesis of lysophospholipids / P.D. Arrigo, S. Servi // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15, N 3. – P. 1354–1377.
118. ATP-dependent mechanics of red blood cells / T. Betz, M. Lenz, J.-F. Joanny, C. Sykes // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2009. – Vol. 106, N 36. – P. 15320–15325.
119. Avent, N.D. The Rh blood group system / N.D. Avent, M.E. Reid // *Blood*. – 2000. – Vol. 95, N 2. – P. 375–387.
120. Baskurt, O.K. .Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage / O.K. Baskurt, M. Uyuklu, H.J. Meiselman // *Biorheology*. – 2004. – Vol. 41, N 2. – P. 79–89.
121. Bastiaanse, E.M. The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes / E.M. Bastiaanse, K.M. Höld, A. van der Laarse // *Cardiovascular research*. – 1997. – Vol. 33, N 2. – P. 272–283.
122. Biophysical correlates of lysophosphatidylcholine- and ethanol-mediated shape transformation and hemolysis of human erythrocytes. Membrane viscoelasticity and NMR measurement / L.M. Chi , W.G. Wu , K.L. Sung , S. Chen // *Biochimica et biophysica acta*. – 1990. – Vol. 1027, N 2. – P. 163–171.
123. Brodsky, R.A. Narrative review: paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: the physiology of complement-related hemolytic anemia / R.A. Brodsky // *Ann. Intern. Med.* – 2008. – Vol. 148. – P. 587–595.
124. Buttarello, M. Automated blood cell counts: state of the art / M. Buttarello, M. Pleban // *Hematopathology*. – 2008. – Vol. 130, N 1. – P. 104-116.
125. Cappellini, M.D. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency / M.D. Cappellini, G. Fiorelli // *Lancet*. – 2008. – Vol. 371, N 9606. – P. 64–74.
126. Chadburn, A. The spleen: anatomy and anatomical function / A. Chadburn // *Seminar in hematology*. – 2000. – Vol. 37, suppl. – P. 13–21.
127. Changes in erythrocyte membrane ATPases and plasma lipid peroxides in

- upper abdominal surgery under intravenous procaine-balanced anesthesia / W.-F. Tu, G.-F. Lin, J.-F. Shen, J.-G. Xu // *The world journal of gastroenterology*. – 1998. – Vol. 4, N 5. – P. 430–433.
128. Chasis, J.A. Red blood cells glykophorins / J.A. Chasis, N. Mohandas // *Blood*. – 1992. – Vol. 80, N 8. – P. 1869–1879.
129. Cholesterol dynamics in membranes / P.L. Yeagle, A.D. Albert, K. Boesze-Battaglia et al. // *The biophysical journal*. – 1999. – Vol. 57, N 3. – P. 413–424.
130. 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.
131. Classical complement pathway activation on nucleated cells. Role of factor H in the control of deposited C3b / M.W. Ollert, K. David, R. Bredehorst, C.-W. Vogel // *The journal of immunology*. – 1995. – Vol. 155, N 10. – P. 4955–4962.
132. Cohn, S.M. Diaspirin cross-linked hemoglobin resuscitation of hemorrhage: comparison of a blood substitute with hypertonic saline and isotonic saline / S.M. Cohn, T.J. Farell // *J. Trauma*. – 1995. – Vol. 39. – P. 210–216.
133. Cole, D.S. Beyond lysis: how complement influences cell fate / D.S. Cole, B.P. Morgan // *Clin. Sci. (Lond.)*. – 2003. – Vol. 104, N 5. – P. 455-466.
134. Colley, K.J. Lipoprotein associated phospholipase A(2): role in atherosclerosis and utility as a biomarker for cardiovascular risk / K.J. Colley, R.L. Wolfert, M.E. Cobble // *EPMA J*. – 2011. – Vol. 2, N. 1. – P. 27-38.
135. Combined spectrin and ankyrin deficiency is common in autosomal dominant hereditary spherocytosis / P. Savvides, O. Shalev, K.M. John, S.E. Lux // *Blood*. – 1993. – Vol. 82, N 10. – P. 2953–2960.
136. Complement activation during cardiopulmonary bypass: effects of immobilized heparin / M. Pekna, L. Hagman, E. Haldén et al. // *The annals of thoracic surgery*. – 1994. – Vol. 8, N 2. – P. 421–424.
137. Complement alternative pathway acts as a positive feedback amplification of neutrophil activation / L. Camous, L. Roumenina, S. Bigot et al. // *Blood*. – 2011. – Vol. 117, N 4. – P. 1340–1349.

138. Complement in atherosclerosis: friend or foe? / W.S. Speidl, S.P. Kastl, K. Huber, J. Wojta // *The journal of thrombosis and haemostasis*. – 2011. – Vol. 9, N 3. – P. 428–440.
139. 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.
140. Complement regulation at the molecular level: the structure of decay-accelerating factor / P. Lukacik, P. Roversi, J. White et al. // *Proceedings of the national academy of sciences*. – 2004. – Vol. 101, N 5. – P. 1279–1284.
141. 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.
142. Correlation between ABO and Rh blood groups, serum cholesterol and ischemic heart disease in patients undergoing coronarography / Z. Tarján, M. Tonelli, J. Duba, A. Zorándi // *Orvosi Hetilap*. – 1995. – Vol. 136, N 5. – P. 767–769.
143. Cytoskeletal dynamics of human erythrocytes / J. Li, G. Lykotrafitis, M. Dao, S. Suresh et al. // *The proceedings of the national academy of sciences*. – 2007. – Vol. 104, N 12. – P. 4937–4942.
144. Daniels, G. Structure and function of red cell surface antigens / G. Daniels // *ISBT. Science Series*. – 2006. – Vol. 1, N 1. – Suppl. – P. 3–8.
145. Dekkers, D.W. Transbilayer movement of NBD-labeled phospholipids in red blood cell membranes: outward-directed transport by the multidrug resistance protein 1 (MRP1) / D.W. Dekkers, P. Comfurius, A.J. Schroit et al. // *Biochemistry*. – 1998. – Vol. 37. – P. 14833–1483.
146. Detection of altered membrane phospholipid asymmetry in subpopulations of human red blood cells using fluorescently labeled annexin V / F.A. Kuypers, R.A. Lewis, M. Hua et al. // *Blood*. – 1996. – Vol. 87, N 3. – P. 1179–1187.
147. Determination of cholesterol in erythrocyte membrane / L. Memon, V. Spasojevi-Kalimanovska, P. Jovi et al. // *Jugoslav medical biochemistry*. – 2003. –

Vol. 122, N 3. – P. 213–219.

148. Dhaliwal, G. Hemolytic anemia / G. Dhaliwal, P.A. Cornett, L.M. Terney // American family physician. – 2004. – Vol. 69, N 11. – P. 2599–2606.

149. Diacylglycerol kinase activity in purified basolateral membranes of kidney tubules. I. Evidence for coupling with phospholipase C / L. Nogaroli, O.F. Silva, T.A. Bonilha et al. // The international journal of biochemistry and cell biology. – 2005. – Vol. 37, N 1. – P. 79–90.

150. Diacylglycerol kinases / B. Luo, D.S. Regier, S.M. Prescott, M.K. Topham // Cell signaling. – 2004. – Vol. 16, N 9. – P. 983–989.

151. Diakowski, W. Protein 4.1, a component of the erythrocyte membrane skeleton and its related homologue proteins forming the protein 4.1/FERM superfamily / W. Diakowski, M. Grzybek, A.F. Sikorski // Folia histochemica et cytodiologica. – 2006. – Vol. 44, N 4. – P. 231–248.

152. Differential tissue expression of the Lewis blood group antigens: enzymatic, immunohistologic, and immunochemical evidence for Lewis a and b antigen expression in Le(a-b-) individuals / T.F. Orntoft, E.H. Holmes, O. Johnson et al // Blood. – 1991. – Vol. 77, N 6. – P. 1389–1396.

153. Dimonte, D.M. Red blood cell antigens: structure and function / D.M. Dimonte, M. Pepe // Blood Transfusion. – 2004. – Vol. 2. – P. 233–246.

154. Dodge, J.T. The preparation and chemical characteristics of haemoglobin free ghosts of human erythrocytes / J.T. Dodge, C. Mitchell, D.J. Hanahan // Archives of biochemistry and biophysics. – 1963. – Vol. 100. – P. 119–130.

155. Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study / J. Wong-Ekkabut, Z. Xu, W. Triampo et al. // The biophysical journal. – 2007. – Vol. 3, N 12. – P. 4225–4236.

156. 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. // Biophysical journal. – 2008. – Vol. 94, N 8. – P. 3084–3093.

157. Erythrocyte deformability in anaemic patients with reticulocytosis

determined by means of ektacytometry techniques / M. Simó, M. Santaolaria, J. Murado, M.L. Pérez et al. // *Clinical hemorheology and microcirculation*. – 2007. – Vol. 37, N 3. – P. 263–267.

158. 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.

159. Evaluation of aortic cannula jet lesions in a porcine cardiopulmonary bypass (CPB) model / C. Schnürer, M. Hager, G. Györi et al. // *The journal of cardiovascular surgery (Torino)*. – 2011. – Vol. 52, N 1. – P. 105–109.

160. Evidence for direct interaction between actin and the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator / B. Chasan, N.A. Geisse, K. Pedatella, D.G. Wooster // *Eur. Biophys. J.* – 2002. – Vol. 30. – P. 617–624.

161. Exposure of the coronary artery using an ultrasonic scalpel / S. Takahashi, I. Fukuda, T. Kuga, M. Tanaka // *The journal of thoracic and cardiovascular surgery*. – 2003. – Vol. 125, N 6. – P. 1533–1534.

162. Fluid phase generation of terminal complement complex as a novel index of bioincompatibility / R. Deppish, V. Schmitt, J. Bommer et al. // *Kidney International*. – 1990. – Vol. 37, N 2. – P.696–706.

163. Fluorometric assay of oleate-activated phospholipase D isoenzyme in membranes of rat nervous tissue and human platelets / M. Krzystanek, H.I. Trzeciak, E. Krzystanek, A. Małecki // *Acta Biochimica Polonica*. – 2010. – Vol. 57, N 3. – P. 369–372.

164. Folch, J. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue (for brain, liver and muscle) / J. Folch, M. Lees, G.H. Sloan-Syanley // *The journal of biological chemistry*. – 1957. – Vol. 226, N 1. – P. 497–509.

165. Function and regulation of the complement system in cardiovascular diseases // R. Oksjoki, P.T. Kovanen, S. Meri, M.O. Pentikainen // *Frontiers in bioscience*. – 2007. – Vol. 12. – P. 4696–4708.

166. Gallagher, P.G. Red cell membrane disorders / P.G. Gallagher //

Hematology. – 2005. – Vol. 1. – P. 13–18.

167. Garratty, G. Immune hemolytic anemia associated with drug therapy / G. Garratty // Blood reviews. – 2010. – Vol. 24, N 4-5. – P. 143–150.

168. Gerstenblith, G. Derangements in cardiac metabolism in the ischemic state and consequences of reperfusion / G. Gerstenblith // Advanced study in medicine. – 2004. – Vol. 4, N 68. – P. 464–471.

169. Gladwin, M.T. Hemolysis and cell-free hemoglobin drive an intrinsic mechanism for human disease / M.T. Gladwin, T. Kanias, D.B. Kim-Shapiro // The journal of clinical investigation. – 2012. – Vol. 122, N 4. – P. 1205–1208.

170. Glovsky, M.M. Complement determinations in human disease / M.M. Glovsky, P.A. Ward, K.J. Johnson // The annals of allergy asthma and immunology. – 2004. – Vol. 93, N 6. – P. 513–522.

171. Gordon, S. Homeostasis: a scavenger receptor for haemoglobin / S. Gordon // Current Biology. – 2001. – Vol. 11, N 10. – P. 399–401.

172. Gov, N.S. Red blood cell membrane fluctuations and shape controlled by ATP-induced cytoskeletal defects / N.S. Gov, S.A. Safran // Biophysical journal. – 2005. – Vol. 88. – P. 1859–1874.

173. Guidelines on myocardial revascularization / W. Wijns, P. Kolh, N. Danchin et al. // European heart journal. – 2010. – Vol. 31, N 20. – P. 2501–2555.

174. Haemolysis due to active venous drainage during cardiopulmonary bypass: comparison of two different techniques / S. Cirri, L. Negri, M. Babbini, G. Latis et al. // Perfusion. – 2001. – Vol. 16, N 4. – P. 313-318.

175. Hawkins, J. The effects of hyperoxic management during cardiopulmonary bypass / J. Hawkins // Canadian perfusion canadienne. – 2006. – Vol. 16, N 2. – P. 72–76.

176. Health effects of dietary phospholipids / D. Küllenberg, L.A. Taylor, M. Schneider, U. Massing // Lipids in health and disease. – 2012. – Vol. 11, N 3. – doi: 10.1186/1476-511X-11-3.

177. Hemolysis is associated with acute kidney injury during major aortic surgery / I.C.V. Windsant, M.G. Snoeijs, S.J. Hanssen et al. // Kidney International. –

2010. – Vol. 77, N 10. – P. 913-920.

178. Hemolysis is associated with low reticulocyte production index and predicts blood transfusion in severe malarial anemia / R. Fendel, C. Brandts, A. Rudat et al. // Public library of science journal. – 2010. – Vol. 6, N 5(4). – P. 1038–1042.

179. 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 // The journal of clinical investigation. – 1995. – Vol. 95, N 3. – P. 1062–1070.

180. Heparin-protamine complexes and C-reactive protein induce activation of the classical complement pathway: studies in patients undergoing cardiac surgery and in vitro / P. Bruins, H. te Velthuis, A.J. Eerenberg-Belmer et al. // Thromb. Haemost. – 2000. – Vol. 84, N 2. – P. 237–243.

181. Holton, M. PMCA as a regulator of calcium/calmodulin-dependent signal transduction pathways: PhD thesis / M. Holton. – Wolverhampton, 2009. – 176 p.

182. Hosoi, E. Biological and clinical aspects of ABO blood group system / E. Hosoi // The journal of medical investigation. – 2008. – Vol. 55. – P. 174–182.

183. Hunter, S. Phosphatidylcholine-coated chest tubes improve drainage after open heart operation / S. Hunter, G.D. Angelini // The annals of thoracic surgery. – 1993. – Vol. 56, N 6. – P. 1339–1442.

184. In vitro maturation of nascent reticulocytes to erythrocytes / M.J. Koury, S.T. Koury, P. Kopsombut, M.C. Bondurant // Blood. – 2005. – Vol. 105, N 5. – P. 2168–2174.

185. Increase in fragmented phosphatidylcholine in blood plasma by oxidative stress / B. Frey, R. Haupt, S. Alms, G. Holzmann et al. // The journal of lipid research. – 2000. – Vol. 41, N 7. – P. 1145–1153.

186. Increased susceptibility of the sickle cell membrane Ca^{2+} + Mg^{2+} -ATPase to t-butylhydroperoxide: protective effects of ascorbate and desferal / R.B. Moore, T.M. Hulgan, J.W. Green, L.D. Jenkins // Blood. – 1992. – Vol. 79, N 5. – P. 1334–1341.

187. 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. // *The annals of thoracic surgery*. – 2008. – Vol. 86, N 5. – P.1570–1575.
188. Inhaled nitric oxide reverses cell-free hemoglobin-induced pulmonary hypertension and decreased lung compliance. Preliminary results / L.F.P. Figueiredo, M. Mathru, J.R. Jones, D. Solanki et al. // *The journal of critical care*. – 1997. – Vol. 1, N 3. – P. 111–116.
189. Inhibition of complement, neutrophil, and platelet activation by an anti-factor D monoclonal antibody in simulated cardiopulmonary bypass circuits / M. Fung, P.G. Loubser, A. Undar et al. // *The journal of thoracic and cardiovascular surgery*. – 2001. – Vol. 122, N 1. – P. 113–122.
190. Inhibition of heparin/protamine complex-induced complement activation by Compstatin in baboons / A.M. Soulika, M.M. Khan, T. Hattori et al. // *Clinical immunology*. – 2000. – Vol. 96, N 3. – P. 12-21.
191. Inhibition of neutrophil adhesion during cardiopulmonary bypass / A.M. Gillinov, J.M. Redmond, K.J. Zehr et al. // *The annals of thoracic surgery*. – 1994. – Vol. 57, N 1. – P. 126–133.
192. Inspired oxygen fraction after cardiopulmonary bypass: effects on pulmonary function with regard to endothelin-1 concentrations and venous admixture / A. Reber, B. Budmiger, M. Wenk, W.E. Haefeli // *The british journal of anaesthesia*. – 2000. – Vol. 84, N. 5. – P. 565–570.
193. Interaction between complement proteins C5b-7 and erythrocyte membrane sialic acid / P. Marshall, A. Hasegawa, E.A. Davidson, V. Nussenzweig // *The journal of experimental medicine*. – 1996. – Vol. 184, N 4. – P. 1225–1232.
194. Intravascular hemolysis in patients with normally functioning mechanical heart valves in mitral position / T. Shivakumaraswamy, P. Mishra, B. Radhakrishnan et al. // *The indian journal of thoracic and cardiovascular surgery*. – 2006. – Vol 23, N 6. – P. 215–218.
195. Ipsaro, J.J. Structures of the spectrin-ankyrin interaction binding domains / J.J. Ipsaro, L. Huang, A. Mondragón // *Blood*. – 2009. – Vol. 113, N 22. – P.

5385–5393.

196. Jilani, T. Does vitamin E have a role in treatment and prevention of anemia? T. Jilani, M.P. Iqbal // Pakistan journal of pharmaceutical sciences. – 2011. – Vol. 24, N 2. – P. 237–242.

197. Jong, K. de Phospholipid asymmetry in red blood cells and spectrin-free vesicles during prolonged storage / K. de Jong, Z. Belezny, P. Ott // Biochim. Biophys. acta. – 1996. – Vol. 1281, N 1. – P. 101–110.

198. Karlis, J.D. Investigating the energy transduction mechanism of P-type ATPases with Fe²⁺-catalyzed oxidative cleavage / J.D. Karlis // The annals of the New York academy of sciences. – 2003. – Vol. 988. – P. 39–49.

199. Kühlbrandt, W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases / W. Kühlbrandt // The nature reviews molecular cell biology. – 2004. – Vol. 5. – P. 282–295.

200. Kurian, G.A. Effect of intra-operative magnesium supplementation on plasma antioxidant levels, trace elements and electrolyte balance in serum of coronary artery bypass graft patient / G.A. Kurian, J. Paddikkala // The journal of clinical and basic cardiology. – 2007. – Vol. 10, N 1-4. – P. 11–15.

201. Lei, H. Quantifying the rheological and hemodynamic characteristics of sickle cell anemia / H. Lei, G.E. Karniadakis // Biophysical journal. – 2012. – Vol. 102, N 2. – P. 85–94.

202. Lezama Urtecho, C.A. .Coronary artery bypass grafting surgery with minimal extracorporeal circulation system / C.A. Lezama Urtecho, E. de León Lagunas, G. Careaga Reyna // Cirugía y cirujanos. – 2010. – Vol. 78, N 2. – P. 121–125.

203. Ligation of complement receptor 1 increases erythrocyte membrane deformability / A.M. Glodek, R. Mirchev, D.E. Golan, J.A. Khoory // Blood. – 2010. – Vol. 116, N 26. – P. 6063–6071.

204. Liposomes alter thermal phase behavior and composition of red blood cell membranes / C. Stoll, H. Stadnick, O. Kollas et al. // Biochimica et biophysica acta. – 2011. – Vol. 1801, N 1. – P. 474–481.

205. Lucches, B.R. Complement inhibitors in myocardial ischemia/reperfusion injury / B.R. Lucches, K.S. Kilgore // *Immunopharmacology*. – 1997. – Vol. 8, N 1-2. – P. 27–42.
206. Luzzatto, L. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency: from genotype to phenotype / L. Luzzatto // *Hematologica*. – 2006. – Vol. 91, N 10. – P. 1303–1306.
207. Machin, D. Principles of cardiopulmonary bypass / D. Machin, C. Allsager // *Continuing education in anaesthesia, critical care and pain*. – 2006. – Vol. 6, N 5. – P. 176–181.
208. Mairbäurl, H. Cation transport and cell volume changes in maturing rat reticulocytes / H. Mairbäurl, S. Schulz, J.F. Hoffman // *The american journal of physiology - cell physiology*. – 2007. – Vol. 279, N 5. – P. 1621–1630.
209. Mannose-binding lectin is involved in multiple organ dysfunction syndrome after cardiac surgery: effects of blood transfusions / Y.M. Bilgin, A. Brand, S.P. Berger et al. // *Transfusion*. – 2008. – Vol. 48, N 4. – P. 601–608.
210. Matsumoto, T. Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis / T. Matsumoto, T. Kobayashi, K. Kamata // *Current medicinal chemistry*. – 2007. – Vol. 14, N 30. – P. 3209-3920.
211. Mechanism of genetic complementation of ammonium transport in yeast by human erythrocyte Rh-associated glycoprotein / C.M. Westhoff, D.L. Siegel, C.G. Burd, J.K. Foskett // *The journal of biological chemistry*. – 2004. – Vol. 279, N 17. – P. 17443–17448.
212. Membrane function and vascular reactivity / R.J. Bing, A. Termin, A. Conforto, R. Dudek // *Bioscience reports*. – 1993. – Vol. 13, N 2. – P. 61–67.
213. Membrane remodeling during reticulocyte maturation / J. Liu, X. Guo, N. Mohandas et al. // *Blood*. – 2010. – Vol. 115, N 10. – P. 2021–2027.
214. Microheterogeneity of regional myocardial blood flows in low-perfused rat hearts evaluated by double-tracer digital radiography / T. Matsumoto, T. Asano, M. Takemoto et al. // *Applied radiation and isotopes*. – 2007. – Vol. 65, N 8. – P. 910–917.

215. Misgeld, B.J.E. Automatic control of the heart-lung machine PhD thesis / B.J.E. Misgeld. – Euskirchen, 2006. – 149 p.
216. Mohandas, N. Red cell membrane: past, present, and future / N. Mohandas, P.G. Gallaher // *Blood*. – 2008. – Vol. 112, N 10. – P. 3939–3948.
217. Molecular characterization of erythrocyte glycophorin C variants / S. Chang, M.E. Reid, J. Conboy et al. // *Blood*. – 1991. – Vol. 77, N 3. – P. 644–648.
218. Molecular cloning and primary structure of Kell blood group protein / S. Lee, E.D. Zambas, W.L. Marsh, C.M. Redman // *The medical sciences*. – 1991. – Vol. 88. – P. 6353–6357.
219. Monitoring of ATP levels in red blood cells and T cells of healthy and ill subjects and the effects of age on mitochondrial potential / N. Mikirova, H.D. Riordan, R.K. Kirby et al. // *The journal of orthomolecular medicine*. – 2005. – Vol. 20, N 1. – P. 50–58.
220. Mulholland, J.W. Investigation and quantification of the blood trauma caused by the combined dynamic forces experienced during cardiopulmonary bypass / J.W. Mulholland, W. Massey, J.C. Shelton // *Perfusion*. – 2000. – Vol. 15. – P. 485–494.
221. Murphy, G.S. Optimal perfusion during cardiopulmonary bypass: an evidence-based approach / G.S. Murphy, E.A. Hessel, R.C. Groom // *Anesthesia and analgesia*. – 2009. – Vol. 108, N 5. – P. 1394–1417.
222. Namgaladze, D. Phospholipase A₂ –modified low-density lipoprotein activates the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway and increases cell survival in monocytic cells / D. Namgaladze, B. Brüne // *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. – 2006. – Vol. 26, N 11. – P. 2510–2516.
223. Nguyen, D. Phosphatidylserine exposure in red blood cells: A suggestion for the active role of red blood cells in blood clot formation: PhD thesis / D. Nguyen. – Saarbrücken, 2010. – 144 p.
224. Nigam, P.K. Sialic acid in cardiovascular diseases / P.K. Nigam, V.S. Narain, A. Kumar // *Indian journal of clinical biochemistry*. – 2006. – Vol. 21, N 1. – P. 54–61.

225. Oral supplementation of vitamin E reduces osmotic fragility of RBC in hemolytic anemia patients with G6PD deficiency / N. Sultana, N. Begum, S. Begum et al. // *The Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2009. – Vol. 5, N 1. – P. 25–28.
226. Packman, C.H. Hemolytic anemia due to warm autoantibodies / C.H. Packman // *Blood Reviews*. – 2008. – Vol. 22. – P. 17–31.
227. Palacajornsuk, P. Detection of blood group genes using multiplex SNaPshot method / P. Palacajornsuk // *Transfusion*. – 2009. – Vol. 49, N 4. – P. 740–749.
228. Palacajornsuk, P. Review: molecular basis of MNS blood group variants / P. Palacajornsuk // *Immunohematology*. – 2006. – Vol. 22. – P. 171–182.
229. Pepys, M.B. C-reactive protein: a critical update / M.B. Pepys, G.M. Hirschfield // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2003. – Vol. 112, N 12. – P. 1805–1812.
230. 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. // *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. – 2008. – Vol. 36, N 4. – P. 884–893.
231. Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family / M. Liscovitch, M. Czarny, G. Fiucci, X. Tang // *The Biochemical Journal*. – 2000. – Vol. 345, Pt. 3. – P. 401–415.
232. Phospholipid asymmetry during erythropoiesis. A study on Friend erythroleukemic cells and mouse reticulocytes / P.H. Van der Schaft, B. Roelofsen, J.A. Op den Kamp, L.L. Van Deenen // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 1987. – Vol. 900, N 1. – P. 103–115.
233. Pintar, T. The systemic inflammatory response to cardiopulmonary bypass / T. Pintar, C.D. Collard // *Anesthesiology Clinics of North America*. – 2003. – Vol. 21, N 3. – P. 453–464.
234. Poole, J. Red cell antigens on band 3 and glycophorin A / J. Poole // *Blood Reviews*. – 2000. – Vol. 14. – P. 31–43.
235. Preoperative anemia in cardiovascular surgery patients / S. Özkan, M.

Kaplan, O. Tarçın et al. // The Turkish journal of thoracic and cardiovascular surgery. – 2010. – Vol. 19, N 1. – P. 110–115.

236. Prevalence of use and the risk of adverse effects associated with complementary and alternative medicine in a cohort of patients receiving warfarin / V.W. Leung, S.J. Shalansky, M.K. Lo, E.A. Jadusingh // The annals of pharmacotherapy. – 2009. – Vol. 3, N 5. – P. 875–881.

237. Procoagulant and prothrombotic activation of human erythrocytes by phosphatidic acid / J.Y. Noh, K.M. Lim, O.N. Bae et al. // The American journal of physiology - heart and circulator physiology. – 2010. – Vol. 299, N 2. – P. 347–355.

238. Protection of erythrocytes from human complement-mediated lysis by membrane-targeted recombinant soluble CD59: a new approach to PNH / A. Hill, S.H. Ridley, D. Esser et al. // Blood. – 2006. – Vol. 107, N 5. – P. 2131–2137.

239. 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, Iss. 8. – P. 1145-1152.

240. Raffy, S. Control of lipid membrane stability by cholesterol content / S. Raffy, J. Teissie // The biophysical journal. – 1999. – Vol. 6, N 4. – P. 2072–2080.

241. Rapid regulation of platelet activation in vivo by nitric oxide / A. Schäfer, F. Wiesmann, S. Neubauer, M. Eigenthaler et al. // Circulation. – 2004. – Vol. 109, N 15. – P. 1818–1822.

242. Razzak, M. Red blood cell fragility and reticulocyte count in hemolytic anemic patients with and without G-6PD enzyme deficiency / M. Razzak, N. Begum, D. Hossian // The Bangabandhu Sheikh Mujib Medical University journal. – 2010. – Vol. 3, N 1. – P. 23–26.

243. Red blood cell aggregation during cardiopulmonary bypass: a pathogenic cofactor in endothelial cell activation? / A.M. Morariu, Y.J. Gu, R.C. Huet et al. // European journal of cardio-thoracic surgery. – 2004. – Vol. 26, N 6. – P. 939–946.

244. Red blood cell distribution width: a strong prognostic marker in cardiovascular disease: is associated with cholesterol content of erythrocyte

- membrane / D.N. Tziakas, G. Chalikias, A. Grapsa et al. // *Clinical hemorheology and microcirculation*. – 2012. – Vol. 51, N 4. – P. 243–254.
245. Red cell membrane and cation deficiency in Rh null syndrome / S.K. Ballas, M.R. Clark, N. Mohandas, H.F. Colfer // *Blood*. – 1984. – Vol. 63, N 5. – P. 1046–1055.
246. Reduced invasion and growth of *Plasmodium falciparum* into elliptocytic red blood cells with a combined deficiency of protein 4.1, glycophorin C, and p55 / A.H. Chishti, J. Palek, D. Fisher, G.J. Maalouf // *Blood*. – 1996. – Vol. 87, N 8. – P. 3462-3469.
247. Regulation of intracellular cholesterol distribution by Na/K-ATPase / Y. Chen, T. Cai, H. Wang et al. // *The journal of biological chemistry*. – 2009. – Vol. 84, N 22. – P. 14881–14890.
248. Relation between blood and atrial fatty acids in patients undergoing cardiac bypass surgery / R.G. Metcalf, L.G. Cleland, R.A. Gibson et al. // *The American journal of clinical nutrition*. – 2010. – Vol. 91, N 3. – P. 528–534.
249. Reul, H.M. Blood pumps for circulatory support / H.M. Reul, M. Akdis // *Perfusion*. – 2000. – Vol. 15, N 4. – P. 295–311.
250. Riley, R.S. Reticulocyte enumeration: past and present / R.S. Riley, J.M. Ben-Ezra, A. Tidwell // *The journal of clinical laboratory analyses*. – 2001. – Vol. 15, N 5. – P. 267–294.
251. Robinson, Y. Intravascular hemolysis and mean red blood cell age in athletes / Y. Robinson, E. Cristanho, D. Boning // *Medicine and science in sports and exercise*. – 2006. – Vol. 38, N 3. – P. 480–483.
252. Saad, A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PD) deficiency / A. Saad, H. Cualing // *Laboratory Lines*. – 2002. – Vol. 8, N 3. – P. 23-25.
253. Sadrzadeh, S.M.H. Haptoglobin phenotypes in health and disorders / S.M.H. Sadrzadeh, J. Bozorgmehr // *The journal of clinical pathology*. – 2004. – Vol. 121. – P. 97–104.
254. Sahu, A. Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics / A. Sahu, J.D. Lambris // *Immunogenematology*. – 2000. – Vol. 9, N 1-

2. – P. 133–148.

255. Sanders, D.S.A. Lewis blood group and CEA related antigens; coexpressed cell–cell adhesion molecules with roles in the biological progression and dissemination of tumours / D.S.A. Sanders, M.A. Kerr // *Molecular pathologi.* – 1999. – Vol. 52, N 4. – P.174–178.

256. Sarnaik, S.A. Thalassemia and related hemoglobinopaties / S.A. Sarnaik // *The Indian journal of pediatric.* – 2005. – Vol. 72. – P. 319–324.

257. Scarola, C. Cardiopulmonary bypass and biocompatibility: a review / C. Scarola // *The journal of biomaterials applications reviews.* – 2010. – Vol. 4. – P. 42–59.

258. Selle, H. Glycerophosphocholine release in human erythrocytes. ¹H spin-echo and ³¹P-NMR evidence for lysophospholipase / H. Selle, B.E. Chapman, P.W. Kuchel // *The European journal of biochemistry.* – 1993. – Vol. 212, N 2. – P. 411–416.

259. Shear induced damage of red blood cells monitored by the decrease of their deformability / S.S. Lee, K.H. Ach, S.L. Lee et al. // *Korea-australia rheology journal.* – 2004. – Vol. 16, N 3. – P. 141–146.

260. Sialic acid content in erythrocyte membranes of patients on chronic hemodialysis / A. Bednarek-Skublewska, B. Jakubowska-Solarska, J. Solski, A. Ksiazek // *Polish archives of internal medicine.* – 2009. – Vol. 119, N 4. – P. 194–199.

261. 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.

262. Soupene, E. Mammalian acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes / E. Soupene, H. Fyrst, F.A. Kuypers // *Proceeding national academy of sciences.* – 2008. – Vol. 105, N 1. – P. 88–93.

263. Sowemimo-Coker, S.O. Red blood cell hemolysis during processing / S.O. Sowemimo-Coker // *Transfusion medical review.* – 2002. – Vol. 16, 1. – P. 46–60.

264. Spectrin-level modeling of the cytoskeleton and optical tweezers. stretching

- of the erythrocyte / J. Li, M. Dao, C.T. Lim, S. Suresh // *The biophysical journal*. – 2005. – Vol. 88, N 5. – P. 3707–3719.
265. 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, P. Landázuri et al. // *The open clinical chemistry journal*. – 2012. – Vol. 5. – P. 27–32.
266. Structure of the C3b Binding Site of CR1 (CD35), the Immune Adherence Receptor / B.O. Smith, R.L. Mallin, M. Krych-Goldberg et al. // *Cell*. – 2002. – Vol. 108. – P. 769–780.
267. Suhail, M. Na, K-ATPase: ubiquitous multifunctional transmembrane protein and its relevance to various pathophysiological conditions / M. Suhail // *The journal of clinical medicine research*. – 2010. – Vol. 2, N 1. – P. 1–17.
268. Technological evolution of membrane oxygenators / M. Drummond, D.M. Braile, A.P. Lima-Oliveira et al. // *The Brazilian journal of cardiovascular surgery*. – 2005. – Vol. 20, N 4. – P. 432–437.
269. Thames, M.D. Ischemic heart disease: an overview / M.D. Thames, D.R. Sease, A. Damian // *Advanced study in medicine*. – 2004. – Vol. 4, N 108. – P. 795–802.
270. The complement inhibitory protein DAF (CD55) suppresses T cell immunity in vivo / J. Liu, T. Miwa, B. Hilliard et al. // *The journal experimental medicine*. – 2005. – Vol. 201, N 4. – P. 567–577.
271. The impact of aortic/subclavian outflow cannulation for cardiopulmonary bypass and cardiac support: a computational fluid dynamics study / T.A. Kaufmann, M. Hormes, M. Laumen et al. // *Artificial organs*. – 2009. – Vol. 39, N 9. – P. 727–732.
272. The polymorphism of the Knops blood group system among five Chinese ethnic groups / Q. Li, S.-S. Han, Z.-H. Guo et al. // *Transfusion Medicine*. – 2010. – Vol. 20. – P. 369–375.
273. The role of complement in biomaterial-induced inflammation / B. Nilsson, K.N. Ekdahl, T.E. Mollnes, J.D. Lambris // *Molecular immunology*. – 2007. – Vol.

44, N 1-3. – P. 82–94.

274. The role of phospholipid asymmetry in calcium-phosphate-induced fusion of human erythrocytes / M. Schewe, P. Müller, T. Korte, A. Herrmann // *The journal biological chemistry*. – 1992. – Vol. 287, N 9. – P. 5910–5915.

275. The transient pore formed by homologous terminal complement complexes functions as a bidirectional route for the transport of autocrine and paracrine signals across human cell membranes / J.A. Acosta, L.R. Benzaquen, D.J. Goldstein, M.T. Tosteson et al // *Molecular medicine*. – 1996. – Vol. 2, N 6. – P. 755–765.

276. 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 // *The journal of the American medical association*. – 2005. – Vol. 293, N 13. – P. 1653–1662.

277. Three-dimensional map of the dimeric membrane domain of the human erythrocyte anion exchanger, Band 3 / D.N. Wang, V.E. Sarabia, R.A. Reithmeier, W. Kühlbrandt // *The European molecular biology organization journal*. – 1994. – Vol. 13, N 14. – P. 3230–3235.

278. Transient changes in erythrocyte membrane permeability are induced by sublytic amounts of the complement membrane attack complex (C5b-9) / J.A. Halperin, A. Taratuska, M. Rynkiewicz, A. Nicholson-Weller // *Blood*. – 1993. – Vol. 81, N 1. – P. 200–205.

279. Trimetazidine on ischemic injury and reperfusion in coronary artery bypass grafting / G.F. Martins, A.G. Filho, J.B.F. Santos et al. // *Arquivos brasileiros de cardiologia*. – 2011. – Vol. 97, N 3. – P. 209–216.

280. Umenishi, F. Molecular analysis of Rh polypeptides in a family with RhD-positive and RhD-negative phenotypes / F. Umenishi, E. Kajii, S. Ikemoto // *The biochemical journal*. – 1994. – Vol. 299. – P. 207–211.

281. Vercaemst, L. Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: a review in search of a treatment algorithm / L. Vercaemst // *The journal of extracorporeal technology*. – 2008. – Vol. 40 – P. 257–

- 267.
282. Walter, U. Evidence for a Na-K-ATPase-inhibitor in erythrocytes of patients with essential hypertension /U. Walter, S. Müller // *The European journal of clinical investigation*. – 1985. – Vol. 15, N 4. – P. 209–214.
283. Wattanapitauacul, S.K. Oxidative pathways in cardiovascular disease Roles, mechanisms, and therapeutic implications / S.K. Wattanapitauacul, J.A. Bauer // *Pharmacology and therapeutics*. – 2001. – Vol. 89, N 2. – P. 187– 206.
284. Weiner, I.D. Renal and hepatic expression of the ammonium transporter proteins, Rh B Glycoprotein and Rh C Glycoprotein / I.D. Weiner, J.W. Verlander // *Acta physiologica scandinavica*. – 2003. – Vol. 179. – P. 331–338.
285. Westhoff, C.M. The structure and function of the Rh antigen complex / C.M. Westhoff // *Seminar in hematology*. – 2007. – Vol.44, N 1. – P. 42–50.
286. Wood, K.C. Sickle cell disease: role of reactive oxygen and nitrogen metabolites / K.C. Wood, D.N. Granger // *Clinical and experimental pharmacology and physiology*. – 2007. – Vol. 34, N 9. – P. 926–932.
287. Wright, G. Haemolysis during cardiopulmonary bypass: update / G. Wright // *Perfusion*. – 2001. – Vol. 16, N 5. – P. 345–351.
288. Wurzinger, L.J. Mechanical blood trauma: an overview / L.J. Wurzinger, R. Optiz, H. Eckstein // *Angeiologie*. – 1986. – Vol. 38, N 3. – P. 81–97.
289. Zuwała-Jagiello, J. Haemoglobin scavenger receptor: function in relation to disease / J. Zuwała-Jagiello // *Acta biocimica polonika*. – 2006. – Vol. 53, N 2. – P. 257–268.