

Порядин Г.В.¹, Власов А.П.², Трофимов В.А.², Власова Т.И.²,
Камкина О.В.¹, Григорьев А.Г.², Власов П.А.²

Кислородтранспортная способность гемоглобина при хирургическом эндотоксикозе

¹ — ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, 117997, г.Москва, ул. Островитянова, д. 1

² — ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» Минобрнауки России, 430005, г.Саранск, ул. Большевикская, д. 68

При хирургическом эндотоксикозе кислородтранспортная способность гемоглобина эритроцитов (средство гемоглобина к лигандам: способность связывать и выделять лиганды) уменьшается и связана с тяжестью эндогенной интоксикации. Нарушение кислородтранспортной функции при эндоинтоксикации сопряжено с перераспределением гемоглобина в эритроците и конформационными перестройками его биомолекулы и может быть вызвано воздействием свободных радикалов и продуктов перекисного окисления липидов, что подтверждено в опытах *in vitro*: под влиянием аскорбата железа кислородсвязывающая способность гемоглобина ухудшается. Во многом аналогичные структурно-функциональные изменения гемоглобина возникают у больных с хирургическим эндотоксикозом.

Ключевые слова: эритроциты; гемоглобин; комбинационное рассеяние; перекисное окисление липидов; эндотоксемия

Для цитирования: Порядин Г.В., Власов А.П., Трофимов В.А., Власова Т.И., Камкина О.В., Григорьев А.Г., Власов П.А. Кислородтранспортная способность гемоглобина при хирургическом эндотоксикозе. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2016; 60(1): 23–27

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Poryadin G.V.¹, Vlasov A.P.², Trofimov V.A.², Vlasova T.I.², Kamkina O.V.¹, Grigoryev A.G.², Vlasov P.A.²

Hemoglobin oxygen transport capacity in surgical endotoxycosis

In surgical endointoxication hemoglobin oxygen transport capacity of red blood cells (hemoglobin affinity ligands: the ability to bind and release ligands) is reduced and is associated with the severity of endogenous intoxication. Violation of oxygen transport function of hemoglobin at endogenous intoxication is associated with conformational changes of a biomolecule, and its possible influence on reactive oxygen species, which confirmed in experiments *in vitro*: under the influence of oxygen-iron ascorbate ability of hemoglobin deteriorates. Largely similar structural and functional changes in hemoglobin occur in patients with surgical endotoxycosis.

Keywords: red blood cells; hemoglobin; Raman scattering; lipid peroxidation; endotoxemia

For citation: Poryadin G.V., Vlasov A.P., Trofimov V.A., Vlasova T.I., Kamkina O.V., Grigoryev A.G., Vlasov P.A. Hemoglobin oxygen transport capacity in surgical endotoxycosis. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimentalnaya terapiya*. 2016; 60(1): 23–27. (in Russian)

For correspondence: Vlasov A.P., e-mail: vap.61@yandex.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Эндотоксикоз представляет собой опасное осложнение различных острых воспалительных процессов, приводящее к развитию полиорганной недостаточности. В прогрессировании эндотоксикоза, как главного компонента системного воспаления, важная роль отводится нарушениям клеточных функций, обеспечи-

вающих выполнение жизненно важных процессов в организме и возникающих в ходе основного заболевания [1, 2]. Последовательное рассмотрение дисфункции специализированных клеток позволяет сформировать картину патогенеза эндотоксикоза с учетом возникающих патофизиологических наруше-

Для корреспонденции: Власов Алексей Петрович, доктор мед. наук, проф., зав. каф. факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева», e-mail: vap.61@yandex.ru

ний, в том числе и гипоксии. Ключевая роль эритроцитов в обеспечении клеточного дыхания определяет актуальность изучения изменений структурно-функционального состояния гемоглобина при эндотоксикозе как механизма противодействующего или способствующего формированию и развитию гипоксии — важнейшего патогенетического фактора различных заболеваний [3].

Цель исследования — изучение кислородтранспортной функции эритроцитов у пациентов с хирургическим эндотоксикозом.

Методика

Исследовали эритроциты венозной крови, стабилизированной глюцициром. Основную группу составили 45 больных острым аппендицитом осложненным перитонитом. В состав группы включено 29 мужчин (64%) и 16 женщин (36%) в возрасте от 25 до 53 лет. При оценке тяжести перитонита использован Мангеймский индекс. У 25 (56%) больных (1-я группа) индекс составил $13,1 \pm 1,22$, что соответствует I степени тяжести, во 2-й — 20 пациентов (44%), — $22,5 \pm 1,34$ — II степень тяжести перитонита. В соответствии с этим выделена легкая и тяжелая степень эндогенной интоксикации. Группу контроля составили 15 здоровых лиц, из них 10 мужчин (67%) и 5 женщин (33%) в возрасте от 29 до 49 лет. В опытах *in vitro* для индукции процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) применяли аскорбат железа (0,01 мМ $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ и 0,2 мМ аскорбиновой кислоты), который добавляли к 1 мл к суспензии эритроцитов (10^6 клеток в 1 мл). Эритроциты предварительно трижды отмывали, а затем концентрировали в среде трис-НСl-буфера (10 мМ, рН 7,4),

содержащего 150 мМ NaCl и 10 мМ глюкозы. Опытные и контрольные пробы (без добавления аскорбата железа) затем инкубировали при 37°C в CO_2 -инкубаторе в течение 60 мин.

Показатели эндогенной интоксикации определяли общепринятыми лабораторно-клиническими и биохимическими методами [4]. Определение маломолекулярного диальдегида проводили в кислой среде при нагревании в реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) спектрофотометрическим методом. Для исследования конформации и свойств гемоглобина интактных эритроцитов в мазках крови применяли метод спектроскопии комбинационного рассеивания [5—7]. Регистрацию спектров комбинационного рассеивания (КР) проводили с помощью рамановского спектрометра *in via Basis* фирмы Renishaw (UK) с лазером, генерирующим возбуждающий свет лазером с длиной 532 нм мощностью 1,5 мВт. Для анализа конформации и O_2 -связывающих свойств Нв использовали соответствующие полосы спектров КР эритроцитов с максимумами при 1355, 1375, 1548—1552, 1580—1588 cm^{-1} соответственно. Относительное количество оксигемоглобина в эритроцитах определяли как отношение интенсивностей $I_{1375}/(I_{1355}+I_{1375})$ (I). Относительная способность гемоглобина связывать лиганды рассчитывалась как отношение I_{1355}/I_{1550} (II), относительная способность гемоглобина выделять лиганды — отношение I_{1375}/I_{1580} (III), сродство гемоглобина к лигандам (O_2) — отношение $(I_{1355}/I_{1550})/(I_{1375}/I_{1580})$ (IV), конформационные изменения пирролов — отношение I_{1375}/I_{1172} (V).

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Таблица 1

Показатели эндогенной интоксикации у больных острым перитонитом (M ± m)

Показатель	Норма (контроль)	Эндотоксикоз	
		Легкой степени	Тяжелой степени
Молекулы средней массы ($\lambda = 280$ нм) усл. ед. ($\times 10^{-3}$)	$249,2 \pm 19,08$	$478,3 \pm 28,15^*$	$598,3 \pm 37,67^*$
Молекулы средней массы ($\lambda = 254$ нм) усл. ед. ($\times 10^{-3}$)	$296,4 \pm 22,17$	$523,1 \pm 32,14^*$	$689,8 \pm 33,78^*$
Общая концентрация альбумина, г/л	$50,04 \pm 2,17$	$46,5 \pm 3,12^*$	$39,1 \pm 3,34^*$
Эффективная концентрация альбумина, г/л	$45,09 \pm 2,46$	$28,3 \pm 2,82^*$	$18,0 \pm 2,45^*$
Резерв связывания альбумина, усл. ед.	$0,88 \pm 0,04$	$0,61 \pm 0,04^*$	$0,46 \pm 0,06^*$
Индекс токсичности плазмы по альбумину, усл. ед.	$0,13 \pm 0,01$	$0,63 \pm 0,08^*$	$1,17 \pm 0,12^*$
Молочная кислота, ммоль/г белка	$0,25 \pm 0,022$	$0,43 \pm 0,054^*$	$0,63 \pm 0,042^*$
Пировиноградная кислота, ммоль/г белка	$0,035 \pm 0,003$	$0,052 \pm 0,005^*$	$0,059 \pm 0,003^*$
ТБК (тиобарбитуровая кислота) — активные продукты, нмоль/мл	$4,5 \pm 0,5$	$7,2 \pm 0,6^*$	$9,9 \pm 0,5^*$
Индекс гипоксии	$7,11 \pm 0,05$	$8,24 \pm 0,03^*$	$10,65 \pm 0,04^*$

Примечание. — статистически значимые изменения по сравнению с нормой при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Лабораторно-клинические показатели и их величины, согласно которым обследуемых пациентов относили к группам с легкой (1-я группа) или тяжелой (2-я группа) степенью тяжести эндогенной интоксикации приведены в табл. 1.

Выраженность изменений показателей эндотоксикоза зависела от тяжести патологического процесса. Пропорционально тяжести эндотоксикоза у больных возрастала концентрация молекул средней массы, понижались величины общей и эффективной концентраций альбумина, повышался индекс токсичности плазмы. В эритроцитах с увеличением тяжести эндотоксикоза возрастала концентрация ТБК-активных продуктов ПОЛ, превышая при тяжелой форме патологического процесса показатели контроля более чем в 2 раза. Регистрировались явления общей гипоксии, что определялось значимым увеличением концентрации в плазме крови молочной и пировиноградной кислот, ростом индекса гипоксии, который при тяжелой форме эндотоксикоза возрастал более чем на 50% по сравнению с контролем.

Анализ спектров КР показал, что конформационная структура гемопорфирина и, как следствие, кислородсвязывающая способность гемоглобина в эритроцитах больных перитонитом изменяются пропорционально степени тяжести заболевания (рис. 1).

В эритроцитах больных с эндотоксикозом как легкой, так и тяжелой степени не выявлено статистически значимого увеличения содержания оксигемоглобина и уменьшения относительной способности гемоглобина выделять лиганды по сравнению с контрольной группой (табл. 2). Однако при этом в эритроцитах больных с эндотоксикозом тяжелой степени уменьшается относительная способность гемоглобина связывать лиганды на 26,1% ($p < 0,05$), при этом также понижается сродство гемоглобина к лигандам на 17,2% ($p < 0,05$) и возрастают колебания метиновых мостиков на 25,2% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

При легкой форме эндотоксикоза изменения величин параметров, характеризующих кислородтранспортную способность эритроцитов, по сравнению с контролем не достоверны. В эритроцитах больных с хирургическим эндотоксикозом происходят конфор-

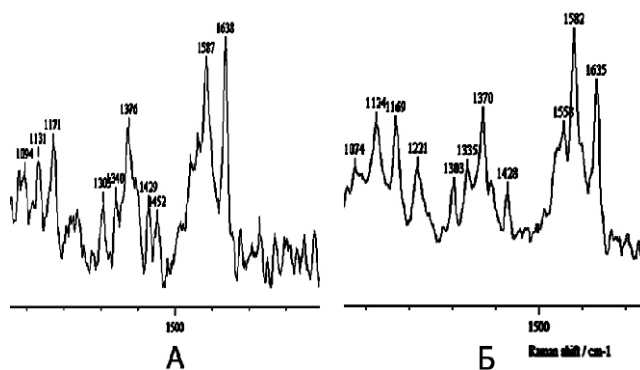


Рис. 1. Спектр комбинационного рассеяния гемоглобина эритроцитов в норме (А) и при эндотоксикозе тяжелой степени (Б). Числами обозначены положения максимумов наиболее выраженных пиков в спектрах комбинационного рассеяния

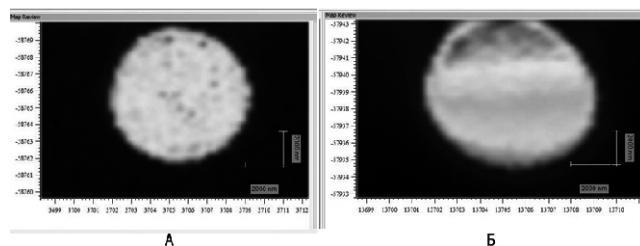


Рис. 2. Распределение гемоглобина в эритроцитах донора (А) и больного с эндотоксикозом тяжелой степени (Б). Изображения распределения гемоглобина по эритроциту получены с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния.

мационные изменения пирролов и в целом гемоглобина, которые предопределяют частичное ингибирование кислородтранспортной способности гемоглобина. Статистически значимые изменения по сравнению с контролем наблюдаются только у больных с эндотоксикозом тяжелой степени.

В крови пациентов с эндотоксикозом часто (71,1%) встречаются эритроциты измененной формы, что свидетельствует о частичном нарушении гемопоеза и о функциональных нарушениях, возникающих на организменном уровне. В эритроцитах у больных с эндотоксикозом зарегистрированы изменения компарментализации гемоглобина (рис. 2).

Таким образом, изменение кислородсвязывающей способности эритроцитов происходит на фоне усиле-

Таблица 2

Показатели спектра комбинационного рассеивания гемоглобина доноров и больных с эндотоксикозом ($M \pm m$)

Показатель	I	II	III	IV	V
Норма (контроль)	0,648 ± 0,003	0,634 ± 0,074	0,699 ± 0,070	0,931 ± 0,051	1,435 ± 0,077
Эндотоксикоз легкой степени	0,670 ± 0,027	0,589 ± 0,061	0,651 ± 0,033	0,912 ± 0,048	1,532 ± 0,060
Эндотоксикоз тяжелой степени	0,704 ± 0,056	0,469 ± 0,126*	0,622 ± 0,043	0,771 ± 0,068	1,798 ± 0,086*

Примечание. — статистически значимые изменения по сравнению с нормой при $p < 0,05$.

ния процессов ПОЛ и накопления вторичных ТБК-реактивных продуктов. В число последних входит малоновый диальдегид, способный образовывать ковалентные сшивки между функциональными группами белков с образованием высокомолекулярных аддуктов. Известно, что в результате образования крупных агрегатов гемоглобина, полученных путем сшивки глутаровым альдегидом нескольких десятков молекул друг с другом, изменяется сродство образующихся комплексов к кислороду [8].

В опытах *in vitro* нами показано, что под влиянием аскорбата железа, способствующего интенсификации процессов ПОЛ в 1,5—1,7 раза, изменяется кислородсвязывающая способность эритроцитов (рис. 3). При воздействии аскорбата железа в спектре КР гемоглобина эритроцитов индуцируются перестройки во многом похожие на изменения спектра КР гемоглобина эритроцитов при эндотоксикозе. В этих условиях по сравнению с нормой отмечаются существенные изменения конформации гемопорфирина, связанные с усилением колебаний метиновых мостиков гемоглобина на 24,3% по отношению к контролю, а также тенденция к уменьшению относительной способности гемоглобина связывать лиганды и понижению сродства к лигандам. При действии аскорбата железа в эритроцитах доноров происходит статистически значимое повышение (на 10,1% по отношению к контролю) относительного количества оксигемоглобина.

Изменение кислородсвязывающей способности гемоглобина эритроцитов под влиянием аскорбата железа может реализовываться посредством усиления процессов ПОЛ, благодаря способности Fe^{2+} взаимодействовать с гидроперекисями фосфолипидов и разлагать их, способствуя разветвлению цепей окисления.

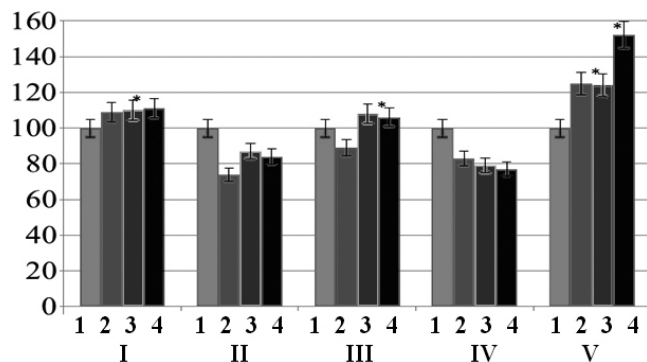


Рис. 3. Изменение показателей (%), характеризующих кислородсвязывающую активность гемоглобина эритроцитов при действии аскорбата железа. По оси ординат: %; по оси абсцисс: 1 — норма, 2 — эндотоксикоз, 3 — норма + аскорбат железа, 4 — эндотоксикоз + аскорбат железа, I—V — параметры. *

Гипоксия рассматривается в качестве важнейшего патогенетического звена развития различных воспалительных заболеваний, что способствует генерализации и хронизации патологического процесса, требующего своевременной коррекции. При гипоксии, вследствие образования в избыточных количествах активных форм кислорода, индуцируются процессы ПОЛ, реализуются мембранодеструктивные явления, провоцирующие развитие клеточных дисфункций. Кроме того, под влиянием активных форм кислорода модулируются гормональные эффекты на местном тканевом уровне [9], изменяется экспрессия многих генов, включая гены транскрипционных факторов — гипоксия-индуцибельного фактора (*HIF*), *NF-κβ*, *c-fos*, *c-jun* и др. [10]. В связи с этим исследование молекулярно-патогенетических основ формирования и развития гипоксии представляет актуальную задачу.

Нами выявлено, что в эритроцитах больных с эндотоксикозом существенно уменьшается относительная способность гемоглобина связывать лиганды и понижается сродство гемоглобина к кислороду, что однозначно свидетельствует о нарушении кислородтранспортной функции эритроцитов при тяжелой форме эндотоксикоза. Причиной этого могут выступать статистически значимые конформационные изменения пирролов и в целом гемоглобина, которые, по-видимому, обусловлены перераспределением гемоглобина внутри клетки. Существенные изменения по сравнению с контролем наблюдали только у больных с тяжелым эндотоксикозом.

Перераспределение гемоглобина, изменение его конформации и кислородсвязывающих свойств при хирургическом эндотоксикозе, вероятно, индуцируются хемомодифицированными молекулами, эндотоксинами накапливающимися в крови и взаимодействующими с клеточной мембраной эритроцита, модифицирующими ее и цитоскелет клетки, тем самым инициируя внутриклеточные перестройки гемоглобина и изменение его кислородтранспортных свойств.

При исследовании с помощью спектроскопии КР кислородтранспортной способности эритроцитов показано [6], что у больных ИБС и с недостаточностью кровообращения снижается содержание оксигемоглобина и увеличивается способность гемоглобина связывать кислород, снижается способность гемоглобина отдавать кислород и сродство гемоглобина к кислороду, увеличивается площадь эритроцитов. Полученные у больных ИБС и сердечной недостаточностью результаты отличаются по направленности от изменений аналогичных величин спектра КР гемоглобина доноров и больных с эндотоксикозом, включая способность связывать лиганды и сродство гемоглобина к лигандам.

Однако ранее у детей с сахарным диабетом 1-го типа в венозной крови отмечено увеличение содержания ком-

плексов гемоглобина с кислородом, причем значимое увеличение содержания оксигемоглобина происходило только при сроке заболевания более 1 года [5]. При этом существенно уменьшалось сродство гемоглобина к кислороду, и понижалась способность гемоглобина связывать кислород, а способность отдавать кислород не менялась. Отметим, что результаты данного исследования, во многом сходны с результатами исследований, полученными нами при исследовании выборки больных с эндотоксикозом тяжелой формы. По-видимому, происходящие при сахарном диабете и хирургическом эндотоксикозе изменения кислородтранспортных свойств гемоглобина эритроцитов, во многом обусловлены схожими причинами и отражают патогенетическую роль эндотоксического компонента заболевания.

Получены доказательства, что продукты перекисидации липидов прямо или косвенно влияют на кислородсвязывающую способность гемоглобина и, как следствие, во многом обуславливают развитие общей гипоксии. Этот факт подтвержден в опытах *in vitro*: под влиянием аскорбата железа кислородсвязывающая способность гемоглобина ухудшается. Установлена зависимость кислородсвязывающей способности гемоглобина от тяжести эндогенной интоксикации и выраженности оксидативного стресса.

Полученный фактический материал позволяет постулировать, что многогранная оценка кислородтранспортной активности эритроцитов и ряда гомеостатических констант, в частности интенсивности липопероксидации, устанавливает конкретные механизмы развития эритроцитарной дисфункции при эндоинтоксикации и на основе этого дает возможность обосновать целесообразные патогенетические схемы коррекции (предупреждения прогрессирования) общей гипоксии при хирургическом эндотоксикозе.

References

1. Bagnenko S.F., Mirzabaev A.T., Batocyrenov B.V. Pharmacological correction of free radical violations and an endotoxicosis at patients with widespread peritonitis in the postoperative period. *Vestnik hirurgii im. I.I. Grekova*. 2011; 170(5): 14-8. (in Russian)
2. Wood B.R., Caspers P., Puppels G.J., Pandiancherri S., McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 387: 1691-703.
3. Власов А.П., Трофимов В.А., Тарасова Т.В., Тюрина Е.П., Котлова Е.В., Ледайкина Л.В. и др. Структурно-функциональное состояние гемоглобина при гестозе. 2012; 6. Available at: <http://www.science-education.ru/106-7340>.
4. Karpishhenko A.I., red. *Medical laboratory technologies. [Meditsinskie laboratornye tekhnologii]* Spravochnik. St. Petersburg: Intermedika, 1999. (in Russian)
5. Mitjanina V.A., Parshina E.Ju., Jusipovich A.I., Maksimov G.V., Selishheva A.A. Research of erythrocytes oxygen capacity at children with diabetes of the 1st type on different terms of a disease. *Bul. eksper. biol. med.* (Moscow). 2012; t.153; 4: 499-503. (in Russian)
6. Jusipovich A.I., Brazhe N.A., Luneva O.G., Parshina E.Ju., Churin A.A., Rodnenkov O.V. i dr. Change of hemoglobin status at patients with coronary heart disease and patients with insufficiency of blood circulation. *Bjul. jeksper. biol. med.* (Moscow). 2013; t. 155; 2: 201-203. (in Russian)
7. Brazhe N.A., Abdali S., Brazhe A.R. et al. New Insight into Erythrocyte through In Vivo Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Biophys. J. US*. 2009; v. 97; 12: 3206-14.
8. Kuznecova N.P., Gudkin L.R., Mishaeva R.N. Way of receiving polyhemoglobin with the increased oxygen transport capacity. RU 2132687. МПК G01N33/487. Available at: 10.07.1999. (in Russian)
9. Macrae D., Field D., Mercier J. Inhaled nitric oxide therapy in infants and children: reaching a European consensus. *Intensive Care Med.* 2004; 30: 372-380.
10. Gu Y.Z., Hogenesch J.B., Bradfield C.A. The PAS Superfamily: Sensors of Environmental and Developmental Signals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2000; 40: 519-61.

Поступила 18.12.15

Сведения об авторах:

Порядин Геннадий Васильевич, член-корр. РАН, д.м.н., проф., зав. каф. патофизиологии и клинической патофизиологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»; e-mail: gen@rsmu.ru

Власов Алексей Петрович (Vlasov A.P.) — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»; e-mail: var.61@yandex.ru.

Трофимов Владимир Александрович (Trofimov V.A.) — д.б.н., профессор, заведующий кафедрой генетики ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»; e-mail: geneticLab@yandex.ru

Власова Татьяна Ивановна (Vlasova T.I.) — д.м.н., доцент кафедры нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»; e-mail: var.61@yandex.ru.

Камкина Ольга Васильевна (Kamkina O.V.) — д.м.н., профессор кафедры физиологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»; e-mail: olga.pharma888@rambler.ru

Григорьев Александр Геннадьевич (Grigoryev A.G.) — соискатель кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»

Власов Павел Алексеевич (Vlasov P.A.) — к.м.н. доцент кафедры факультетской хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский госуниверситет им. Н.П. Огарева»