

Г.Г. Хубулава, Д.Ю. Романовский, А.М. Волков,  
А.В. Бирюков, И.Р. Скибро, А.Г. Бутузов,  
А.И. Любимов, В.В. Сизенко, **А.В. Диденко**

## Влияние искусственного кровообращения на морфологические характеристики эритроцитов и газотранспортную функцию крови

Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

**Резюме.** Исследовано влияние искусственного кровообращения на морфологию эритроцитов и интенсивность газообмена в тканях организма больного до операции, во время операции и в ходе послеоперационного лечения. Установлено, что в ходе операции с искусственным кровообращением изменяется соотношение напряжения кислорода и углекислого газа в артериальной и венозной крови, свидетельствующее о сдвигах в кислородной емкости крови. Так как концентрация кислорода в оксигенаторе известна и находится под постоянным контролем, то уменьшение кислородной емкости крови отражает интенсивность тканевого дыхания, с одной стороны, и степень механического повреждения эритроцитов – с другой. Об интенсивности тканевого дыхания судили на основании неизвестного ранее факта, что форма эритроцитов зависит от степени насыщения их кислородом. Отмечено, что кровь, насыщенная кислородом (артериальная) при нормальных условиях газообмена в легких, на 90–95% состоит из мелкворсистых эритроцитов (длина ворсинок 0,3–0,4 мкм), в то время как венозная кровь представлена в основном крупнворсистыми формами эритроцитов (длина ворсинок 0,4–1 мкм). Форма эритроцитов обратима и изменяется как после прохождения через легкие (оксигенатор), так и после газообмена в тканях. Угнетение насыщения кислородом эритроцитов при перфузии свидетельствует об изменении их метаболических процессов, формы и резистентности, что позволяет более полно оценить патофизиологические сдвиги, которые возникают в организме в ответ на перфузию. Предложенные способы морфометрического анализа эритроцитов, а также определение их осмотической резистентности могут служить экспресс-методиками анализа крови, которые могут применяться в ходе операций на сердце с использованием искусственного кровообращения в целях ее своевременной коррекции и восполнения.

**Ключевые слова:** морфология эритроцитов при искусственном кровообращении, осмотическая резистентность эритроцитов, оценка тканевого дыхания по морфологии эритроцитов, искусственное кровообращение, хирургическое лечение заболеваний сердца, экспресс-методики диагностики.

**Введение.** В первой клинике хирургии (усовершенствования врачей) им. П.А. Куприянова Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова операции с применением метода искусственного кровообращения (ИК) начались в 1957 г. Однако неудовлетворительные результаты первых операций потребовали дальнейшего усовершенствования как самого аппарата ИК, так и методик его применения в хирургии сердца и магистральных сосудов. Тогда же встал вопрос о влиянии ИК на состав и газотранспортную функцию крови, а также способах профилактики различных осложнений, вызванных гемолизом эритроцитов. В монографии «Искусственное кровообращение в хирургии сердца и магистральных сосудов» [1], вышедшей из стен клиники в 1962 г., подробно описаны физиология ИК и его влияние на систему крови. С момента выхода этой монографии прошло более 55 лет, мы стали использовать новые аппараты искусственного кровообращения (АИК), оксигенаторы, теплообменники и пр., а также методики проведения самого

процесса искусственного кровообращения. Однако проблема сохранения нормального состава крови при оперативных вмешательствах с использованием АИК у кардиохирургических больных остается весьма актуальной и в настоящее время. Причины, приводящие к развитию анемии и нарушению газотранспортной функции эритроцитов в раннем послеоперационном периоде, заставляют искать новые способы ее коррекции и профилактики.

**Цель исследования.** Изучить влияние ИК на морфологию эритроцитов и интенсивность газообмена в тканях больного до операции, во время операции и в ходе послеоперационного периода.

**Материалы и методы.** Интенсивность газообмена в тканях организма больного до операции, во время операции и в ходе послеоперационного лечения определяли с помощью морфометрического анализа формы эритроцитов (соотношение мелко- и крупнворсистых форм) артериальной и венозной крови. Эти результаты сопоставляли с данными

об осмотической резистентности эритроцитов, полученными в те же сроки и при тех же условиях. Также проводилось определение показателей газового, кислотно-основного и электролитного состава крови, уровня гемоглобина, гематокрита и насыщения кислородом крови с помощью аппарата «IL-Синтезис». Кровь больного, взятую из лучевой артерии и подключичной вены, исследовали до операции (наркозный фон – НФ); на 5-й мин и каждые 20 мин работы АИК – до и после оксигенации; после отключения АИК и введения протамин сульфата (ППС); через 8 ч после операции и на 1, 3, 5-е сутки в послеоперационном периоде. Пациентов разделили на 2 группы: 1-я группа – 17 человек, которым было выполнено протезирование (пластика) клапанов сердца; 2-я группа – 20 человек, которым было выполнено аортокоронарное шунтирование (АКШ). Первая группа больных состояла из 5 женщин и 12 мужчин в возрасте от 43 до 73 лет. Во вторую группу вошли 3 женщины и 17 мужчин в возрасте от 45 до 67 лет. ИК проводили по стандартной методике на аппарате «Stockert SIII» с использованием оксигенатора фирмы «Dideco».

Морфометрический способ определения, согласно которому оксигенированные и деоксигенированные эритроциты отличаются не только по спектральным характеристикам содержащегося в них гемоглобина, но и по морфологическим особенностям их строения. Так, поверхность эритроцитов, находящихся в венозном русле и отдавших кислород, покрыта ворсинками, длина которых превышает 0,4 мкм (0,4–1 мкм), рисунок 1.

Число ворсинок может достигать 20–30. В артериальной крови преобладают эритроциты, насыщенные кислородом. Они также покрыты ворсинками, но размеры их меньше 0,4 мкм и находятся они на границе разрешающей способности светового микроскопа (рис. 2). Есть основания предполагать, что число этих ворсинок значительно больше, чем крупных. Эти особенности строения эритроцитов можно обнаружить только на нефиксированных образцах крови, так как фиксация нивелирует различия в морфологии, связанные с газотранспортной функцией.

С целью доказательства возможного влияния степени насыщения эритроцитов кислородом на их форму были проведены исследования образцов периферической крови у 30 практически здоровых мужчин в возрасте от 20 до 60 лет, взятой из последней фаланги среднего пальца кисти. Для этого посредством специальной манжеты, соединённой с манометром, при достижении в ней давления 44–50 мм рт. ст. останавливали венозный отток. При этом практически всё капиллярное русло пальца заполняется артериальной кровью. 50 мкл крови разбавляли изотоническим раствором хлористого натрия в пятьдесят раз, что, как известно, предохраняет её от свертывания. Далее 50 мкл разбавленной крови наносили на обезжиренное предметное стекло и накрывали покровным, толщина которого не

должна превышать 150 мкм. Кровь исследовали на микроскопе в проходящем свете с использованием объектива с сорокакратным увеличением. Общее увеличение оптической системы микроскопа составляло 450 крат.

Подсчёт эритроцитов производили посредством измерительной решётки с квадратными ячейками, вставленной в окуляр. Для устранения субъективного фактора отбирали эритроциты в ячейках, расположенных во взаимно перпендикулярных направлениях. Определяли процентное содержание крупноворсистых эритроцитов, длина ворсинок у которых составляла более 0,4 мкм. В ряде случаев через образцы разбавленной физиологическим раствором крови в течение 2 мин пропускали атмосферный воздух, по газовому составу аналогичный вдыхаемому, и выдыхаемый воздух. В последнем варианте применяли бикарбонатный буфер (pH=7,1).

Деформируемость мембран эритроцитов определяли, используя кондуктометрическую методику, основанную на определении начала гемолиза крови по уменьшению омического сопротивления при разведении её стандартными объёмами дистиллированной воды. Результаты исследований обрабатывали статистически по t-критерию Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что в артериальной периферической крови практически здоровых людей в возрасте от 20 до 65 лет (от 20 до 25 лет – 20 чел., от 35 до 40 лет – 5 чел., от 60 до 65 лет – 5 чел.) содержится от 50 до 90% крупноворсистых эритроцитов, причём в возрасте от 20 до 25 лет –  $82 \pm 5\%$ , от 35 до 40 лет –  $71 \pm 6\%$ , от 60 до 65 лет –  $54 \pm 7\%$ . Сравнение образцов венозной и периферической артериальной крови по процентному содержанию мелковорсистых и крупноворсистых эритроцитов позволило предположить, что преобладание в крови крупноворсистых форм связано со степенью её насыщения кислородом. Так как содержание кислорода в венозной крови ниже, чем в артериальной, то появление ворсинок на поверхности эритроцитов (крупноворсистые эритроциты), по-видимому, отражает процесс отдачи кислорода эритроцитами окружающим тканям во время прохода крови по капиллярному руслу. Переход из одной формы эритроцитов в другую осуществляется быстро (от нескольких мс до нескольких десятков мс) и определяется скоростью кровотока в альвеолярных и тканевых капиллярах. Об этом также свидетельствуют результаты опытов, в которых через венозную кровь пропускали атмосферный воздух (p=766 мм рт. ст., относительная влажность 80%) и чистый кислород (p=776 мм рт. ст.) в течение 2 мин. Объём крови составлял 2,5 мл, диаметр пор барбатёра – 100 мкм. До продувания кислородом содержание крупноворсистых эритроцитов составляло 100%, а после пропускания кислорода –  $10 \pm 5\%$ . При пропускании



Рис. 1. Микрофотография крупноворсистых эритроцитов человека in vivo, венозная кровь, ув.  $\times 40$ , масштаб 10 мкм



Рис. 2. Микрофотография мелковорсистых эритроцитов человека in vivo, артериальная кровь, ув.  $\times 40$ , масштаб 10 мкм

через кровь атмосферного воздуха число крупноворсистых эритроцитов уменьшалось до  $30 \pm 4\%$ . В опытах на образцах периферической крови, взятой у людей в возрасте 20–25 лет, после пропускания атмосферного воздуха или кислорода также было отмечено уменьшение содержания крупноворсистых эритроцитов до  $32 \pm 5\%$ . У лиц старше 60 лет ( $54 \pm 7\%$  крупноворсистых эритроцитов в норме) при пропускании через их пробу крови выдыхаемого воздуха количество крупноворсистых эритроцитов увеличивалось до  $80 \pm 4\%$ . Если разбавлять кровь физиологическим раствором, предварительно обогащённым углекислым газом или кислородом, то трансформации формы эритроцитов не происходит.

Таким образом, процентное содержание крупно- и мелковорсистых форм эритроцитов отражает степень насыщения крови кислородом и связано с интенсивностью тканевого дыхания. Так, у людей старше шестидесяти лет содержание крупноворсистых эритроцитов в артериальной периферической крови составляет 54%, а в возрасте 20–25 лет – свыше 82%. Интенсивность метаболических процессов в этом возрасте, как известно, намного выше.

В ходе операций с применением ИК нами описанным выше способом исследована кровь 37 больных.

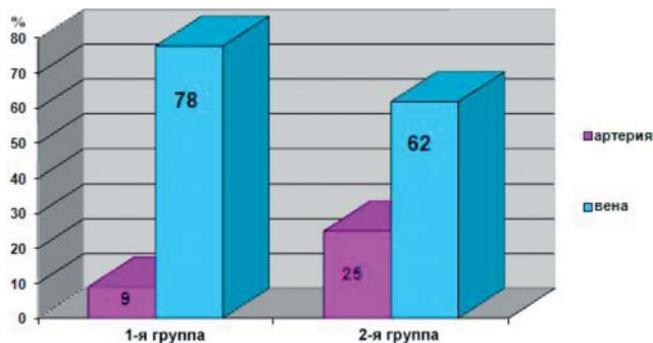


Рис. 3. Содержание крупноворсистых эритроцитов в крови до подключения АИК

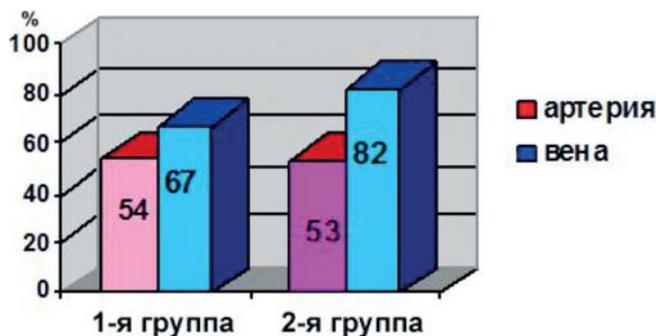


Рис. 4. Содержание крупноворсистых эритроцитов в крови после отключения АИК

Динамика содержания крупноворсистых форм эритроцитов до и после подключения АИК представлена на рисунках 3 и 4.

Показатели газового, кислотно-основного состава артериальной крови, а также уровня гематокрита до и после подключения АИК представлены в таблице.

Через 8 ч после операции содержание крупноворсистых форм эритроцитов в 1-й группе составило  $32 \pm 6\%$  в артериальной и  $71 \pm 9\%$  в венозной крови, в 1-е сутки –  $33 \pm 9\%$  в артериальной и  $69 \pm 12\%$  в венозной крови. Во 2-й группе через 8 ч после операции содержание крупноворсистых форм эритроцитов составило  $25 \pm 5\%$  в артериальной и  $77 \pm 8\%$  в венозной

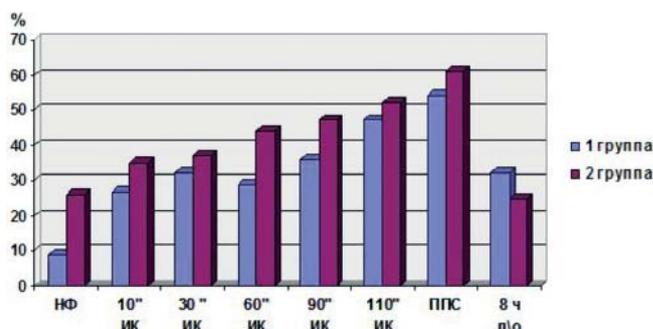


Рис. 5. Содержание крупноворсистых эритроцитов в артериальной крови больных в условиях ИК

Динамика показателей газового, кислотно-основного состава артериальной крови, уровня гематокрита до и после подключения АИК

Группа	До подключения АИК (НФ)			После отключения АИК (после введения протамин сульфата)		
	pO <sub>2</sub> , мм рт. ст.	pCO <sub>2</sub> , мм рт. ст.	Ht, об%	pO <sub>2</sub> , мм рт. ст.	pCO <sub>2</sub> , мм рт. ст.	Ht, об%
1-я	190,7±10	34,6±7	35,5	181,9±9	41,9±6	26
2-я	182±12	36,2±3	29,3	193±8	39,3±6	29

Примечание: Ht – гематокрит.

крови, а в 1-е сутки –  $21\pm 3\%$  в артериальной и  $84\pm 8\%$  в венозной крови.

Динамика изменения содержания крупноворсистых эритроцитов во время ИК в обеих группах отражена на рисунке 5.

Степень повреждаемости эритроцитов во время ИК оценивали по их осмотической резистентности на 5–10-й мин ИК и в конце операции (на 90–120-й мин ИК). Для анализа брали 2,5 мл крови до входа её в оксигенатор (венозная) и последовательно разбавляли её порциями дистиллированной воды по 0,5 мл (всего 10 разбавлений). При этом регистрировали ток, проходящий через кровь при её разбавлении. Для сравнения строили кривую изменения проводимости изоосмотического физиологического раствора при аналогичном разведении. На рисунке 6 представлена схема опыта.

Так как при разбавлении крови дистиллированной водой концентрация электролитов в ней уменьшается, это должно было бы сопровождаться уменьшением проводимости, аналогичным при разбавлении раствора хлористого натрия. В норме эритроциты выдерживают уменьшение осмолярности до 70%. Исключения в сторону уменьшения ОРЭ наблюдаются при некоторых формах анемий. Если мембрана эритроцитов повреждается при прохождении крови через АИК, то это должно сказаться на изменении её осмотической резистентности (рис. 7). Из рисунка 7 видно, что при уменьшении осмолярности крови на

50% происходит увеличение проводимости взвеси крови. Это объясняется разрушением повреждённых эритроцитов и выходом ионов, включая молекулы гемоглобина, которые обладают кислотными свойствами, в раствор. Уменьшение ОРЭ достоверно наблюдается при продолжении операции в течение более полутора часов.

Для определения достоверности результатов по ОРЭ полученные данные сравнивали с морфометрическим определением гематокрита при разбавлении образцов крови дистиллированной водой, как указывалось выше, и числом эритроцитов в поле зрения микроскопа в проходящем свете. При уменьшении осмолярности раствора на 50% наблюдается уменьшение гематокрита, отличающегося от такового при разбавлении крови 0,9% NaCl (рис. 8). Это объясняется тем, что разрушенные эритроциты не видны в поле зрения светового микроскопа. Помимо уменьшения количества эритроцитов происходит нарушение их формы. В большом числе начинают встречаться эритроциты как с увеличенным диаметром до 8–9 мкм, так и более мелкие (диаметр 5–6 мкм). Кроме того, наблюдается появление в значительном количестве пойкиломорфных форм эритроцитов.

Сделано предположение, что при этих изменениях эритроцитов нарушается их газотранспортная функция. Для этого было проведено сравнение газотранспортной функции эритроцитов в НФ и на 90-й мин ИК. Оказалось, что в венозной крови больных до применения ИК (по 4 больных из 1-й и 2-й групп) среднее содержание крупноворсистых эритроцитов составило  $70\pm 5\%$ . При пропускании в течение 2 мин через эту же кровь атмосферного воздуха количество крупноворсистых эритроцитов уменьшилось до  $21\pm 5\%$ . На 90 мин ИК при пропускании атмосферного воздуха через венозную кровь количество крупноворсистых эритроцитов уменьшилось с  $65\pm 7$  до  $43\pm 5\%$ . Это свидетельствует о частичной утрате эритроцитами способности связывать кислород.

В целом содержание крупноворсистых эритроцитов в периферической крови практически здоровых людей разного возраста до и после пропускания через кровь атмосферного и выдыхаемого воздуха зависит от насыщения её кислородом. Увеличение количества мелковорсистых эритроцитов при про-

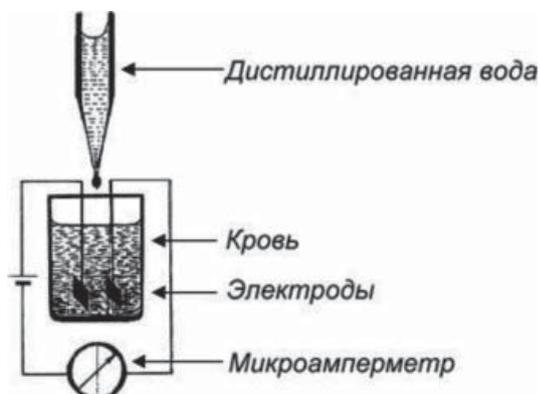


Рис. 6. Схема опыта по определению осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) кондуктометрическим титрованием

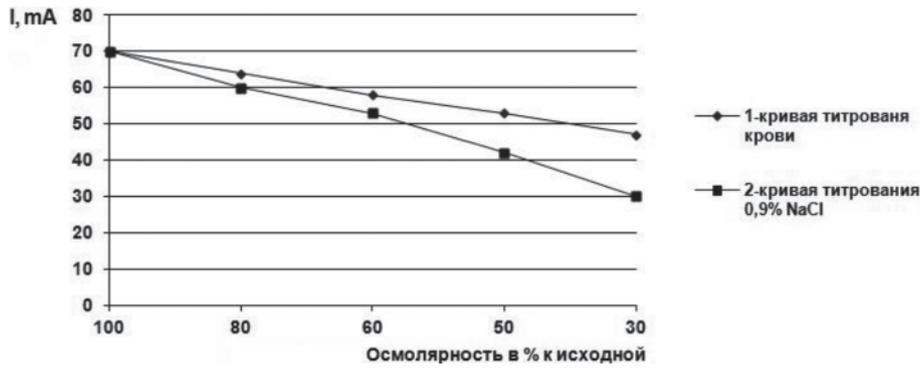


Рис. 7. Кривые кондуктометрического титрования крови и физиологического раствора NaCl

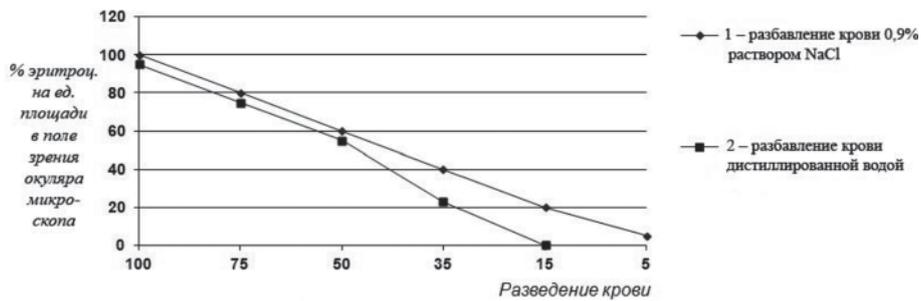


Рис. 8. Определение ОРЭ при титровании крови дистиллированной водой по гематокриту в поле зрения микроскопа

пускании кислорода указывает на то, что именно такая форма эритроцитов связана с их оксигенацией. Увеличение размеров ворсинок на поверхности эритроцитов, по-видимому, свидетельствует об активном выходе кислорода из эритроцитов и насыщении их углекислым газом. *In situ* переход из одной формы эритроцитов в другую занимает миллисекунды и соответствует времени нахождения эритроцитов в артериальных тканевых и альвеолярных капиллярах.

Артериальная и венозная кровь у больных обеих групп достоверно отличается по количеству крупноворсистой эритроцитов до и после подключения АИК. В НФ отмечена достоверная ( $p < 0,05$ ) разница содержания крупноворсистой эритроцитов в артериальной крови больных 1-й и 2-й групп ( $9 \pm 3$  и  $25 \pm 4\%$  соответственно). С началом ИК содержание крупноворсистой форм эритроцитов существенно изменяется как в артериальной, так и в венозной крови обеих групп больных. Однако прямой зависимости крупноворсистой форм эритроцитов от напряжения кислорода и углекислого газа в пробах крови, взятой до и после прохождения через оксигенатор, не выявлено.

Показано, что повреждение эритроцитов во время ИК существенно уменьшает ОРЭ, сравнимую по величине с наблюдаемой при врождённых анемиях. Этот факт подтверждается данными по автоматическому определению гематокрита во время ИК (снижение до 30% к концу операции). При этом в опытах по насыщению кислородом венозной крови,

взятой из АИК на 10-й и 90-й минуте, способность эритроцитов связывать кислород также уменьшается. Следовательно, механические воздействия на эритроциты в условиях ИК лишь в незначительной степени ухудшают их газотранспортную функцию, что проявляется в незначительном уменьшении кислородной ёмкости крови.

**Выводы**

1. Применение ИК влияет на газотранспортную функцию эритроцитов и тканевое дыхание как в момент операции, так и в послеоперационном периоде вследствие неполного соответствия газовой смеси в оксигенаторе вдыхаемому воздуху в норме и превышения скоростей протекания крови через поры газообменника таковым в альвеолярных и тканевых капиллярах в норме.

2. Угнетение насыщения кислородом эритроцитов при перфузии свидетельствует об изменении их метаболических процессов и позволяет более полно оценить патофизиологические сдвиги, возникающие в организме в ответ на перфузию.

3. Помимо причин, вызывающих сокращение продолжительности жизни эритроцитов в постперфузионном периоде (последствия травматизации крови в АИК, иммунологические изменения и т. д.), немаловажное значение, с нашей точки зрения, имеет снижение функциональной способности эритроцитов во время ИК.

4. Уменьшение способности эритроцитов к газообмену и, как следствие, изменение их морфологии

при ИК оказывается чувствительным индикатором развивающейся гипоксии и ацидоза.

5. Предложенные методики морфометрического анализа эритроцитов, а также определения их осмотической резистентности могут служить экспресс-методиками анализа крови в ходе операций на сердце

с использованием ИК в целях ее своевременной коррекции и восполнения.

#### Литература

1. Искусственное кровообращение в хирургии сердца и магистральных сосудов / под ред. действ. чл. АМН СССР, проф. П.А. Куприянова. – Л., 1962. – 301 с.

---

G.G. Khubulava, D.Yu. Romanovskiy, A.M. Volkov, A.V. Biryukov, I.R. Skibro, A.G. Butuzov, A.I. Lyubimov, V.V. Sizenko, A.V. Didenko

#### The effect of cardiopulmonary bypass on the morphological characteristics of red blood cells and the gas transmission function of blood

**Abstract.** Investigate the effect of extracorporeal circulation on the erythrocyte morphology, the intensity of gas exchange in the body tissues of the patient was determined before the operation, during the operation and during the postoperative treatment using morphometric analysis of the form of erythrocytes. It was established that during the operation with artificial blood circulation, the ratio of the voltage of oxygen and carbon dioxide in arterial and venous blood changes, indicating a shift in the oxygen capacity of the blood. Since the oxygen concentration in the oxygenator is known and under constant control, a decrease in the oxygen capacity of the blood reflects the intensity of tissue respiration on the one hand, and the degree of mechanical damage to red blood cells on the other. The intensity of tissue respiration was judged on the basis of a previously unknown fact that the form of erythrocytes depends on the degree of their saturation with oxygen. It is noted that blood, saturated with oxygen (arterial) under normal conditions of gas exchange in the lungs, is 90–95% composed of small red blood cells (villous length 0,3–0,4  $\mu\text{m}$ ), venous blood is represented mainly by large vorous forms of red blood cells (villous length 0,4–1  $\mu\text{m}$ ). The form of red blood cells is reversible and changes both after passing through the lungs (oxygenator), and after gas exchange in the tissues. The inhibition of oxygen consumption by red blood during perfusion indicates a change in the metabolic processes, shape and resistance of red blood cells, which allows a more complete assessment of the pathophysiological changes that occur in the body in response to perfusion. The proposed methods of morphometric analysis of erythrocytes, as well as determining their osmotic resistance, can serve as express methods for analyzing red blood during heart operations using extracorporeal circulation, in order to correct it in time and replenish it.

**Key words:** erythrocyte morphology in extracorporeal circulation, erythrocyte osmotic resistance, tissue respiration assessment by erythrocyte morphology, extracorporeal circulation, surgical treatment of heart diseases, rapid diagnostic techniques.

Контактный телефон: +7-911-159-14-98; e-mail: vmeda-nio@mil.ru