

УДК 615.38:615.384.001.6

И. Н. Фатеева, В. С. Богданович,
З. П. Федорова, Л. М. ГрузоваИЗУЧЕНИЕ КИСЛОРОДТРАНСПОРТНОЙ ФУНКЦИИ
РАСТВОРА ГЕМОГЛОБИНА, ПОЛУЧЕННОГО
ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ ДОНОРСКОЙ КРОВИ

В последние годы много экспериментальных работ посвящено всестороннему изучению как *in vitro*, так и *in vivo* растворов гемоглобина, полученных различными способами из эритроцитов донорской крови [1, 5, 6, 10, 12]. Положительные результаты экспериментальных исследований позволили предложить методы приготовления гемоглобина из эритроцитов донорской крови, пригодного для внутривенного введения. Доказана способность гемоглобина, находящегося в растворенном состоянии, переносить кислород [8, 9, 11, 13, 14].

В настоящей работе представлены результаты исследований гемоглобина в растворе и лиофильно высушенного, полученного по методу, разработанному в Киевском институте гематологии и переливания крови [2, 4].

С помощью метода Ван-Слайка и определения показателей кислотно-щелочного равновесия на аппарате микро-Аstrup ABC-1 изучена кислородтранспортная функция растворов гемоглобина, вводимых внутривенно животным на фоне острой массивной кровопотери. Показана способность гемоглобина улучшать дыхательную функцию крови после острой массивной кровопотери, повышать утилизацию кислорода тканями, нормализовать внешнее дыхание.

Методика исследований

Гемоглобин получали из эритроцитов донорской крови — свежих или хранившихся при температуре 4°С. Эритроциты донорской крови трехкратно отмывали физиологическим раствором натрия хлорида. Гемолиз осуществляли добавлением к одному объему эритроцитов двух объемов апиrogenной воды. Через 1 ч в гемолизате устанавливали pH—5,7 и —5,9—0,1 н. раствором соляной кислоты. Экстракорпускулярный калий удаляли алюмосиликатным цеолитом типа Na-X из расчета 210—300 г/л гемолизата. Для стабилизации белка использовали глюкозу в концентрации 5%. Стромому и цеолит удаляли из раствора путем центрифугирования на стаканчиковой и суперцентрифуге. Стерилизацию и удаление водорастворимых стромальных веществ осуществляли с помощью керамических и мембранных фильтров с диаметром пор 1,0; 0,5—0,4; 0,2—0,1 мкм. Весь процесс приготовления раствора гемоглобина осуществлялся при температуре 4°С с соблюдением асептических условий. Для получения гемоглобина в сухом виде раствор его разливали по 50 мл в 500 мл флаконы, укупоривали и сразу же пристеночно замораживали обкаткой при температуре не выше —40°С в течение 30—40 мин. Закалку проводили в течение не менее 12 ч при температуре не выше —30°С. Сублимационную сушку проводили в течение 46—48 ч в сублимационной установке КС-30 или Юзифруа.

Физико-химические свойства определяли по следующим методикам: содержание основной фракции в относительных процентах — методом электрофореза на бумаге, вязкость — вискозиметром Освальда, pH — с помощью потенциометра ЛП-24, остаточную влажность — высушиванием точной навески в вакуум-сушильном шкафу при температуре +70°С до постоянного веса; концентрацию метгемоглобина определяли на спектрофотометре СФ-4А по методу Аустина и Драбкина в модификации [3]. Содержание калия и натрия определяли методом пламенной фотометрии.

Экспериментальные и острой массивной кровопотерей выделяли бедренную кровь. Через 3—5 мин. Через 30 мин. раствор гемоглобина. Гемолиз проводили в низкотемпературном при перемешивании на водяной бане. В количестве, равном раствору, в водную баню при 37°С. В равном потерянному количеству.

Для изучения изменений утилизации кислорода тканями влиянии переливаемого гемоглобина брали из артерии и вены для переливания изучаемого препарата помещенные в лед.

Функциональные свойства родную емкость исследовали лочного равновесия исследовали

Результаты

Физико-химические свойства гемоглобина как в растворе, так и в сухом состоянии. Пригодности его для внутривенного введения в пределах 4,8—6,5%; калия 13,0—16,0 мг%; метгемоглобина 1,5—4%; ретикулярная чистота 97%; влажность не выше 6%; гемоглобин был стерильным, нетоксичным.

Кривая диссоциации оксигемоглобина из эритроцитов до опыта, 2 — через 30 мин. 3 — через 1 ч после переливания. По вертикали — насыщение (S_{O₂} %), по горизонтали — парциальное давление кислорода (мм рт. ст.).

Результаты исследований, из которых следует, что после кровопотери наблюдалось значительное снижение насыщения крови кислородом. Так, насыщение крови кислородом в этот период от исходного уровня снижалось на 6,96 об.%, за счет чего снижалась без изменений. Кислотно-щелочное равновесие сдвигалось влево, уменьшалось содержание свободных оснований, общее количество оснований, а также от чего указывало на развитие ацидоза. Несмотря на то, что емкость до 6,8 об.%, а

Экспериментальные исследования были выполнены на беспородных собаках с острой массивной кровопотерей (33—40 мл/кг). У животных под местным обезболиванием выделяли бедренную артерию и вену. Из артерии производили кровопотерю в течение 3—5 мин. Через 30 мин после кровопотери в бедренную вену струйно вводили раствор гемоглобина. Гемоглобин, который готовили в растворе и сохраняли до опыта в низкотемпературном прилашке при температуре не выше -30°C , оттаивали и подогревали на водяной бане до 37°C . Сухой гемоглобин растворяли апиrogenной водой в количестве, равном раствору гемоглобина до сушки — 50 мл, флаконы также погружали в водяную баню при 37°C . Кровопотерю возмещали раствором гемоглобина в количестве, равном потерянной крови.

Для изучения изменений кислородной емкости крови животных, коэффициента утилизации кислорода тканями, изменений P_{O_2} артериальной и венозной крови, а также влияния переливаемого гемоглобина на кислотно-щелочное равновесие, пробы крови брали из артерии и вены до опыта, через 30 мин после кровопотери и через 1 ч после переливания изучаемого препарата. Кровь брали в пробирки под вазелиновое масло, помещенные в лед.

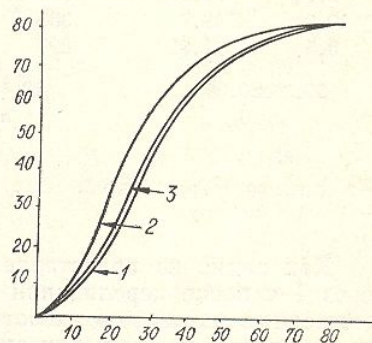
Функциональные свойства гемоглобина кислородно-диссоциационные кривые и кислородную емкость исследовали по [7] на аппарате Ван-Слайка. Показатели кислотно-щелочного равновесия исследовали на аппарате микро-Аstrup ABC-1 (Дания).

Результаты исследований и их обсуждение

Физико-химические показатели всех серий полученного гемоглобина как в растворе, так и лиофильно высушенного свидетельствуют о пригодности его для внутривенного введения. Общий белок колебался в пределах 4,8—6,5%; относительная вязкость — 1,2—1,4; содержание калия 13,0—16,0 мг%; содержание натрия 340—330 мг%; содержание метгемоглобина 1,5—4,0%, электрофоретическая чистота 97—98%; остаточная влажность не выше 1,8%. Раствор гемоглобина был стерильным, апиrogenным, нетоксичным.

Кривая диссоциации оксигемоглобина, полученного из эритроцитов донорской крови.

1 — до опыта, 2 — через 30 мин после кровопотери, 3 — через 1 ч после переливания раствора гемоглобина. По вертикали — насыщение крови кислородом (S_{O_2} %), по горизонтали — парциальное давление, в мм рт. ст.



Результаты исследований представлены в табл. 1, 2, 3 и рисунке из которых следует, что через 30 мин после острой массивной кровопотери наблюдалось значительное изменение газового состава крови. Так, насыщение кислородом артериальной крови снижалось на 2,6%, хотя, в этот период отмечалась гипервентиляция, характеризовавшаяся усиленным выделением CO_2 , P_{O_2} артериальной крови повышалось, увеличивалась разница P_{O_2} артерии и вены. Кривая диссоциации в этот период сдвигалась влево, уменьшалась кислородная емкость на 6,96 об%, за счет чего коэффициент утилизации кислорода тканями оставался без изменений. Определенные изменения происходили и в кислотно-щелочном равновесии организма: отмечался сдвиг буферной линии влево, уменьшались показатели стандартного бикарбоната, буферных оснований, общего CO_2 , значительно усиливался дефицит оснований, а также отмечалось недостоверное снижение значений pH, что указывало на развитие компенсаторного метаболического ацидоза.

Несмотря на то, что растворы гемоглобина имеют кислородную емкость до 6,8 об%, а кривая диссоциации препарата сдвинута влево

от наблюдаемой в цельной крови за счет отсутствия в нем 2,3-дифосфоглицерата и других фосфатов, а также за счет значительно меньшей концентрации гемоглобина в гемоглобиновых растворах в сравнении с содержанием гемоглобина в эритроцитах крови, переливания препарата животным на фоне острой массивной кровопотери нормализовали не только показатели гемодинамики, но и улучшали дыхательную функцию крови.

Таблица 1
Изменения кислородной емкости крови у собак после острой массивной кровопотери и последующих переливаний раствора гемоглобина

Вес животного, в кг	Кислородная емкость, в об %	Количество потерянной крови, в мл	Кислородная емкость через 30 мин после кровопотери, в об %	Количество перелитого гемоглобина, в мл		Кислородная емкость через 1 ч после переливания, в об %
				раствор	сухой	
11,4	19,91	450	14,02	450		17,7
13,0	21,15	470	12,29	450		15,04
7,0	20,10	250	14,00	250		17,95
12,4	19,5	450	15,7		450	17,0
11,5	19,87	410	10,03		400	16,36
12,0	21,10	430	12,5		450	18,8
9,0	20,15	300	14,0		300	18,9
10,0	19,7	360	14,5	350		18,0
8,5	21,81	290	13,62		300	17,95
20,36±0,29		13,4±0,51		17,53±0,4		
n=9		n=9		n=9		
				p<0,001		

p—в сравнении с кровопотерей.

Как видно из представленных данных в табл. 1, 2, 3 и рисунке, через 1 ч после переливаний препарата гемоглобина происходили существенные изменения кислотно-щелочного равновесия и газов крови, указывающие на нормализацию этих показателей. Так, изменилась левая позиция кривой диссоциации вправо, не достигая, однако, исходных точек построения (см. рисунок). Кислородная емкость крови животных достоверно увеличивалась по сравнению с кровопотерей (4,13 об %). Сопоставляя полученные нами данные с результатами исследований [15], в которых при лечении острой анемии крыс переливаниями 6% раствора гемоглобина кислородная емкость крови увеличивалась на 9,2±0,6 об %, можно полагать, что результаты наших исследований согласуются с данными литературы. На рисунке представлены изменения кривой диссоциации до опыта, после кровопотери и после переливания препарата гемоглобина.

Достоверное увеличение всех показателей кислотно-щелочного равновесия, сдвиг буферной линии вправо свидетельствуют об улучшении потребления кислорода тканями. Так, насыщение артериальной крови кислородом увеличивалось на 6,3% P_{O_2} артериальной крови также достоверно увеличивалось даже в сравнении с исходными цифрами. Улучшалась функция органов дыхания, исчезала гипервентиляция, снижалось выделение CO_2 . Увеличивалось потребление кислорода тканями, о чем свидетельствует также повышение коэффициента утили-

Результаты исследования при острой массивной

Показатели

SO_2 , в %

P_{O_2} , в мм рт. ст.

P_{CO_2} , в мм рт. ст.

Коэффициент утилизации

SO_2 , в %

P_{O_2} , в мм рт. ст.

P_{CO_2} , в мм рт. ст.

Влияние переливания

Показатели

pH

Стандартный бикарбонат, в мэкв/л

Буферные основания, в мэкв/л

Излишек оснований

Общий CO_2

Таблица 2

Результаты исследований газов артериальной и венозной крови у собак при острой массивной кровопотере и последующих переливаниях раствора гемоглобина

Показатели	Исходные данные	Через 30 мин после кровопотери	Через 1 ч после переливания гемоглобина
Артериальная кровь			
SO ₂ , в %	92,2±0,852 n=5	89,6±0,952 n=5	95,9±0,225 n=5 p<0,001
P _{O₂} , в мм рт. ст.	92,8±1,8 n=5	93,6±0,4 n=5	99,6±2,706 n=5 p<0,05
P _{CO₂} , в мм рт. ст.	36,9±1,553 n=5	32,6±1,303 n=5	34,2±1,653 n=5 p>0,05
Коэффициент утилизации	0,259	0,26	0,332
Венозная кровь			
SO ₂ , в %	66,3±1,403 n=5	63,6±1,724 n=5	62,7±1,353 n=5 p>0,05
P _{O₂} , в мм рт. ст.	49,06±1,839 n=5	45,8±1,854 n=5	43,2±2,706 n=5 p>0,05
P _{CO₂} , в мм рт. ст.	45,1±3,082 n=5	40,4±1,804 n=5	37,2±0,959 n=5 p>0,05

Таблица 3

Влияние переливаний раствора гемоглобина на бикарбонаты крови

Показатели	Исходные данные	Через 30 мин после кровопотери	Через 1 ч после переливания гемоглобина
pH	7,375±0,008 n=6	7,335±0,018 n=6	7,391±0,009 n=6
Стандартный бикарбонат, в мэкв/л	21,58±0,96 n=6	18,67±0,17 n=6	21,33±0,4 n=6 p<0,001
Буферные основания, в мэкв/л	44,68±0,65 n=6	40,83±1,9 n=6	44,6±1,6 n=6 p>0,05
Излишек оснований	-3,2±0,308 n=6	-7,46±1,021 n=6	-3,7±0,426 n=6 p<0,02
Общий CO ₂	22,13±0,41 n=6	16,6±0,28 n=6	21,21±0,53 n=6 p<0,05

зации кислорода на 7,3% в сравнении с исходными данными; увеличение артерио-венозной разницы по P_{O_2} и значению pH крови.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о способности препарата гемоглобина, полученного нашим методом, как в виде раствора, так и в сухом виде, улучшать дыхательную функцию крови после острой массивной кровопотери, способствовать улучшению утилизации кислорода тканями, нормализовать дыхание.

Учитывая, что внутривенное введение раствора гемоглобина животным, перенесшим острую массивную кровопотерю, способствует быстрому восстановлению резко нарушенных показателей гемодинамики (артериальное давление, скорость кровотока, объем циркулирующей крови), не влияет на свертывание крови [6, 8, 15], можно предполагать, что раствор гемоглобина в комплексе с другими кровезаменителями может сыграть положительную роль в улучшении эффекта их действия за счет способности хотя бы частично переносить кислород.

Литература

1. Андрианова И. Г. Получение и испытание комбинированных гемоглобинсодержащих препаратов в эксперименте.— Актуальные вопр. гематол. и перелив. крови. М., 1955, с. 23—45.
2. Ельшикевич Э. С., Дукаревич А. С., Лобунец К. А., Фатеева И. Н., Шмушко Р. Я. Препарат гемоглобина из эритроцитов донорской крови, способ его получения и некоторые свойства.— Гематол. и перелив. крови, Киев, 1971, № 6, с. 106—113.
3. Кушаковский М. С. Клинические формы повреждения гемоглобина.— Л.: Медицина, 1968.—324 с.
4. Лобунец К. А., Фатеева И. Н. Способ получения препарата гемоглобина из эритроцитов донорской крови.— Рационализаторские предложения и изобретения в медицине. Киев, 1974, с. 128—129.
5. Покидова Н. В. О препарате гемоглобина из крови крупного рогатого скота.— Совр. пробл. гематол. и перелив. крови, М., 1956, № 10, с. 47—54.
6. Розенберг Г. Я., Вязова Е. П., Иванова Г. Н. Получение очищенного препарата гемоглобина и изучение его свойств.— Пробл. гематол. и перелив. крови. 1975, № 11, с. 25—29.
7. Сыркина П. Е. Газовый анализ в медицинской практике.— М.: Медгиз, 1956.—222 с.
8. Ушакова М. М. Разработка и применение нового газохроматографического метода изучения кислородно-транспортных характеристик гемоглобина при различных воздействиях на белок: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— М., 1977.—17 с.
9. Фатеева И. Н., Лобунец К. А., Грузова Л. М., Богданович В. С. Некоторые данные о кислородно-транспортной функции и гемодинамическом действии препарата гемоглобина из эритроцитов донорской крови.— Препараты из крови и тканей, Л., 1974, с. 40—43.
10. Hamilton R. B., Farr L. E. Preparation of hemoglobin solutions for intravenous infusion.— Fed. Proc., 1946, N 5, p. 136—140.
11. Kaplan H. R., Muthy V. S. Hemoglobin solution, a potential oxygen transporting plasma volume expander.— Fed. Proc., 1975, 34, N 6, p. 1461—1465.
12. Peskin G. W., O'Brien, Kevin M. D., Rabiner S. F.— Stroma-free hemoglobin solution the «ideal» blood substitute? — Surgery, 1969, 66, № 6, p. 185—188.
13. Schier J. e. a. Effect of stroma-free haemoglobin solution on respiration and blood oxygenation.— Haematologia, 1973, 34, N 7, p. 339—346.
14. Spaan J. A. Transfer of oxygen into hemoglobin solution.— Pflügers Arch., 1973, 34, N 4, S. 289—306.
15. Sunder-Plassmann L., Dieterle R., Seifert J., Jesch F., Messmer K. Stroma-free haemoglobin as a blood replacement fluid. actual state and problems.— Europ. J. Intensive Care Medicine, 1975, N 1, p. 37—42.

Киевский институт гематологии
и переливания крови: Киевский институт
фармакологии и токсикологии

Поступила в редакцию
20.IV 1978 г.

УДК 612.273.1/2:612.111.11

В. П.

О ВЛИЯНИИ НА ФРАКЦИОНАЛЬНУЮ

В осуществлении принимают участие многие частный вклад в тран более важных и слож хательная функция к (эритроциты), но и н

Важное значение го уровня P_{O_2} в тканях ных факторов, в усло ного состояния огра гемоглобин дифферен хательный белок с ог связывания, транспорт газовой среды активно например, что при в функциональные свой изменением его сродс ционная реакция орга

Мы изучали возз состава гемоглобина бина крыс, возникаю лорода в окружающе ки проходят сложны цессе которого меня вания проводились д периферической крови

Опыты проведены на рия — контроль. Во второ оксии в барокамере, куд «высоту» от 2000 до 5000 в) в течение пяти дней по давлении, где крысы дыш азота, что соответствует с серии животных подверга чение 19 дней, по 1 ч возз в) в течение десяти дней, кислорода и 40% азота.

Гемоглобин циркули описано ранее [7] и фрак ного геля. Количественну ре типа МК-2 «Джойс», ст