

## ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА ИНТЕНСИВНОСТЬ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОГО ОКИСЛЕНИЯ ПРИ ГИПОВОЛЕМИЧЕСКОЙ ГИПОТЕНЗИИ И ПОСЛЕ РЕИНФУЗИИ (экспериментальное исследование)

А. К. Кирсанова, В. Л. Кожура, И. С. Новодержкина, Е. Ю. Паршина

ГУ НИИ общей реаниматологии РАМН, Москва

### Impact of Laser Radiation on the Rate of Free Radical Oxidation in Hypovolemic Hypotension and After Reinfusion: Experimental Study

A. K. Kirsanova, V. L. Kozhura, I. S. Novoderzhkina, Ye. Yu. Parshina

Research Institute of General Reanimatology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

В острых экспериментах на белых беспородных крысах, перенесших тяжелую гиповолемическую гипотензию (АД 25–30 мм рт. ст.) в течение 60 мин., изучали влияние лазерного облучения на интенсивность свободнорадикальных процессов в плазме крови во время гипотензии и после реинфузии. Показано, что применение лазерного облучения перед кровопотерей, увеличивает общую антиоксидантную активность плазмы и способствует снижению продукции ПОЛ в процессе гипотензии. Включение ЛО в комплекс реанимационных мероприятий усугубляет процессы свободнорадикального окисления. ЛО может оказаться перспективным методом коррекции избыточной интенсивности свободнорадикального окисления после реинфузии на более поздних этапах восстановительного периода (после восстановления энергетического потенциала и механизмов адаптации).

The impact of laser radiation (LR) on the rate of plasma free radical processes during hypotension and after reinfusion was studied in acute experiments on non-inbred albino rats with prior severe hypovolemic hypotension (blood pressure, 25–30 mm Hg) during 60 min. LR used before blood loss was shown to increase total plasma antioxidative activity and to promote the decreased production of lipid peroxidation products during hypotension. Inclusion of LR into a package of resuscitative measures deteriorates free radical oxidative processes. LR may be a promising method for correcting the excessive rate of free radical oxidation after reinfusion at later rehabilitative stages (after recovery of the energetic potential and adaptation mechanisms).

Свободнорадикальное окисление представляет собой весьма важный для клетки процесс, который является регуляторным механизмом клеточных мембран и участвует в поддержании гомеостаза клетки. Активные формы кислорода (АФК) оказывают защитное действие, обеспечивая механизмы неспецифического иммунитета, играют важную роль в регулировании метаболического состояния дыхательной цепи, транспорта ионов, регуляции АД (NO), синтезе гормонов и др. В частности, цитохром С оказывает влияние на процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) митохондрий, ингибируя их. Пероксидазы, по-видимому, также играют ключевую роль в поддержании определенного уровня перекисных соединений, необходимых для нормального функционирования митохондрий [1]. С другой стороны, АФК оказывают повреждающее действие, которое обусловлено стимуляцией свободнорадикального ПОЛ в мембранах. Их цитотоксическое действие осуществляется через пероксидацию структурно важных полиненасыщенных жирных кислот, входящих в фосфолипиды мембран как через прямое повреждающее действие суперок-

сидного анион-радикала и перекиси водорода, так и вследствие вторичной активации окисляющих агентов, таких как гидроксильный радикал, липидный пероксидный радикал и другие продукты липидной фрагментации. Эти реакции ведут к повреждению мембраны клетки и липопротеинов плазмы крови, макромолекул ДНК, белков и оргanelл клеток [2, 3]. Активные формы кислорода находятся под жестким контролем антиоксидантных систем организма. Нарушение такого контроля ведет к окислительному стрессу.

АФК включены в факторы патогенеза структурно-функциональных повреждений органов и тканей при различных терминальных состояниях и после выведения из них [4–6].

Важность окислительного стресса в патофизиологии геморрагического шока показана в ряде работ [4, 7, 8]. Пусковым механизмом развития патологических процессов при шоке является гипоксия. Основным источником цитотоксических свободных радикалов при ишемии и реперфузии является гипоксантин. Уменьшение АТФ при гипоксии вызывает быст-

рую деполяризацию клеточных мембран, связанную с деактивацией АТФ-зависимых клеточных насосов, что приводит к увеличению внутриклеточного уровня  $Ca^{2+}$ , участвующего в превращении NAD-зависимой дегидрогеназы в ксантинооксидазу. В присутствии кислорода при реперфузии ксантинооксидаза катализирует превращение гипоксантина в ксантин и пурины. Окисление этих продуктов при реперфузии сопровождается образованием свободных радикалов и перекиси водорода [3, 5]. Ксантинооксидаза в большом количестве находится в эндотелии капилляров различных тканей, включая печень, сердце, легкие, скелетные мышцы, кишечник, почки [9], она попадает в циркуляцию во время реперфузии, что предполагает развитие полиорганной недостаточности [5].

Другим источником свободных радикалов являются активированные лейкоциты [10, 11]. Активированные оксидазы их плазматических мембран запускают серию метаболических реакций респираторного взрыва. При этом увеличивается поглощение кислорода и продукция высокоактивных форм кислорода: супероксидный анион ( $O_2^-$ ), синглетный кислород ( $^1O_2$ ) и  $H_2O_2$ , при взаимодействии которых в присутствии металлов с переменной валентностью, особенно  $Fe^{2+}$ , образуются вторичные гидроксильные радикалы ( $OH^\cdot$ ), обладающие высокой цитотоксической активностью.  $OH^\cdot$ , взаимодействуя с соответствующим субстратом, запускает свободнорадикальную перекисную дегградацию белков, нуклеиновых кислот и др.

Одним из методов коррекции окислительного стресса является лазерное облучение (ЛО). Терапевтическая эффективность ЛО основана на многофакторном воздействии излучения на все уровни организации живой материи. Первичные фотобиологические реакции вызывают разнообразные биохимические и физиологические ответные реакции организма. Вторичные эффекты представляют собой комплекс адаптационных и компенсаторных реакций, возникающих в результате реализации первичных эффектов в тканях, органах и целостном живом организме [12]. Так, одним из механизмов действия ЛО на клетку является изменение редокс-свойств её компонентов, что восстанавливает поток электронов в дыхательной цепи, формирует мембранный потенциал митохондрий и обеспечивает увеличение продукции АТФ [13]. Активация работы дыхательной цепи увеличивает количество образующегося  $O_2$ , что является необходимым условием активации антиоксидантных систем организма. В опытах *in vitro* было показано, что действие гелий-неонового лазера (ГНЛ) в течение 30–60 с с плотностью потока мощности 1 мВт /см<sup>2</sup> на выделенные из печени крыс мито-

хондрии вызывает увеличение образования АТФ митохондриями печени и снижение интенсивности свободнорадикальных окислительных реакций [1]. Наряду с активацией дыхательной цепи лазер может активировать и некоторые специализированные окислительно-восстановительные цепи, способные контролировать параметры клеточного гомеостаза. К таким цепям относится НАДФН-оксидаза в плазматической мембране фагоцитирующих клеток и NO-синтаза [10, 14]. Согласно современным представлениям, в формировании ответной реакции на ЛО важную роль играют также мембранные структуры клетки. Конформационные изменения липидного слоя могут влиять на процессы, связанные с мембранами: активность, связанных с мембраной ферментов, проницаемость мембран, перестройку структурного состава мембран лизосом, нейронов, митохондрий [14].

Низкоэнергетические лазеры широко применяются в практической медицине, однако данные литературы о влиянии лазерной терапии на процессы свободнорадикального окисления при терминальных состояниях противоречивы [15, 16, 17].

Цель нашего исследования — изучить влияние ЛО на интенсивность свободнорадикального окисления липидов во время гиповолемической гипотензии и в раннем восстановительном периоде.

## Материал и методы исследования

Острые эксперименты выполнены на 44 белых нелинейных крысах массой 230–350 г под нембуталовым наркозом. Моделью терминального состояния служила гиповолемическая гипотензия (АД ср. 25–30 мм рт. ст.) в течение 60 мин с последующей реинфузией крови.

Для оценки интенсивности свободнорадикальных процессов в плазме использовали метод хемилюминесценции (ХЛ) (Люминометр 1420.02). Результаты оценивали по светосумме ХЛ в отн. ед. Светосумма ХЛ — это интегральный показатель, отражающий максимальную интенсивность свечения за определенный промежуток времени.

По величине светосуммы вспышки ХЛ, индуцированной  $H_2O_2$ , оценивали продукцию АФК, величина которой обратно пропорциональна общей антиоксидантной активности плазмы. Интенсивность процессов ПОЛ оценивали по величине светосуммы ХЛ, индуцированной  $Fe^{2+}$  [15, 18]. Железо катализирует образование  $OH^\cdot$  из  $H_2O_2$ . Ионы  $OH^\cdot$ , взаимодействуя с липидами, запускают их перекисление [2].

Кровь для исследования брали из правого желудочка сердца на 15-й и 60-й минутах гипотензии и через 60 мин после реинфузии крови. ЛО в течение 2 мин (АЛОК-1, длина волны 632,8 нм, мощность излучения 1 мВт) проводили наложением световода на хвостовую артерию крысы.

Поставлено 5 групп опытов. В 1-й (6 опытов) и 2-й (6 опытов) группах (забой крыс через 15 и 60 мин гипотензии соответственно) ЛО проводили до кровопотери, в 3-й группе — на 15-й минуте, в 4-й — на 40-й минуте после реанимации (по 5 опытов). 5-ю группу опытов составили ложно оперированные животные (5 опытов). В контрольных группах (17 крыс) ЛО не проводилось.

Статистическую обработку данных проводили по методу Стьюдента.

Показатели хемилюминесценции (ХЛ) (в отн. ед.) плазмы крови контрольных и опытных крыс во время гипотензии и после реинфузии

Группа опытов	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> инд. ХЛ		Fe <sup>2+</sup> инд. ХЛ	
	контроль	опыт	контроль	опыт
1-я	302,1±24,8	239,1±13,7*	397,6±25,4	373,9±35,7
2-я	220,2±3,35	198,3±35,9	432,6±8,11	276,3±32,0*
3-я	180,4±20,0	277,2±32,2*	437,8±51,4	446,6±70,4
4-я	180,4±20,0	157,4±16,2**	437,8±51,4	455,8±27,2
5-я	208,8±14,6	—	292,1±15,4	—

Примечание. \* — достоверные различия между контрольной и опытной группами, \*\* — достоверные различия между 3-й и 4-й группами опытов.

Результаты исследований и обсуждение

Как видно из таблицы, применение ЛО до начала кровопотери достоверно уменьшало продукцию АФК на 15-й минуте гипотензии на 21% по сравнению с таковой у контрольных животных, что свидетельствует о повышении антиоксидантной активности плазмы крови под действием ЛО. В результате, к 60-й минуте гипотензии продукция ПОЛ снижалась на 36% ( $p < 0,05$ ). Применение ЛО на ранних этапах восстановительного периода, т. е. через 15 мин после реинфузии крови, достоверно увеличивало продукцию АФК. Через 60 мин после реанимации уровень ХЛ у этих животных был на 54% выше, чем у контрольных.

ЛО через 40 мин после реинфузии увеличивало общую антиоксидантную активность плазмы на 12% по сравнению с контролем. Продукция ПОЛ в 3-й и 4-й группах опытов через 60 мин после реанимации достоверно не отличалась от таковой в контрольных группах и была в 1,5 раза выше, чем у ложно оперированных животных.

Таким образом, при использовании ЛО до кровопотери, т. е. в физиологических условиях, адаптивный ответ на действие лазера формируется достаточно быстро и проявляется в активации ферментов антиоксидантной защиты уже на ранних этапах гиповолемической гипотензии. Показано, что при облучении гелий-неоновым лазером увеличивается активность таких ключевых ферментов, как каталазы и супероксиддисмутазы [19, 20]. В то же время применение ЛО на ранних этапах постреанимационного периода (через 15 мин после реинфузии) увеличивает продукцию АФК. ЛО на фоне не восстановившегося энергетического потенциала и крайнего истощения антиокси-

дантной системы организма, характерного для реперфузионного периода, по-видимому, оказывает повреждающее действие подобно сильному раздражителю. По мнению Д. С. Саркисова [21], адапционный ответ может реализоваться только на основе готовых, уже сформированных физиологических механизмов адаптации. Кроме того, ЛО повышает функциональную активность уже активированных во время реперфузии нейтрофилов, что также увеличивает продукцию высокоактивных форм кислорода [10, 11, 22]. Совокупностью этих процессов, по-видимому, можно объяснить увеличение продукции АФК под действием ЛО на ранних этапах постреанимационного периода. Применение лазерной терапии на 40-й минуте восстановительного периода увеличивает антиоксидантную активность плазмы, но не оказывает влияния на процессы ПОЛ. Ранее было показано, что осязательный результат на кислородный баланс организма у собак после 10 мин клинической смерти от острой кровопотери был получен при использовании ЛО через 3 ч после реанимации [17]. Возможно, более позднее применение ЛО окажется более эффективным и в отношении активности антиоксидантных систем.

Выводы

1. Применение лазерного облучения перед кровопотерей увеличивает антиоксидантную активность плазмы крови и способствует снижению продукции перекисного окисления липидов в течение гипотензивного периода.

2. Применение лазерного облучения на ранних этапах реанимации усугубляет дисбаланс в системе перекисное окисление липидов — антиоксидантная система.

Литература

1. Зубкова С. М. Спонтанная биохемилюминесценция митохондрий некоторых тканей в норме и при действии физических факторов. В кн.: Биохемилюминесценция. М.: Наука; 1983: 180—195.
2. Владимиров Ю. А. Свободные радикалы и антиоксиданты. Вестн. РАИ 1998; 43—51.
3. Rajab A. Ar., Dawidson I., Fabia R. Reperfusion injury. New Horizons. 1996; 4 (4): 224—234.
4. Novelli G. P. Oxygen radicals in experimental shock: effects of spin-trapping nitrones in ameliorating shock pathophysiology. Crit. Care Med. 1992; 20 (4): 499—507.
5. Tan S., Yoshifumi Y., Wang Z., et al. Hypoxia-reoxygenation is as damaging as ischemia-reperfusion in the rat liver. Crit. Care Med. 1998; 26 (6): 1089—1095.
6. Waxman K. Shock: ischemia, reperfusion and inflammation. New Horizons. 1996; 4 (2): 153—160.
7. Kentner R., Safar P., Behringer W. et al. Early antioxidant therapy with tempol during hemorrhagic shock increases survival in rats. J. Trauma. 2002; 53 (5): 968—977.
8. Kirton O., Civetta J. M. Ischemia-reperfusion injury in the critically ill: a progenitor of multiple organ failure. New Horizons. 1999; 7 (1): 87—95.

9. *Gutierrez G.* Cellular energy metabolism during hypoxia. *Crit. Care Med.* 1991; 19 (5): 619–626.
10. *Клебанов Г. И., Теселкин Ю. О., Бабенкова И. В. и др.* Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на функциональный потенциал лейкоцитов. *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 1997; 4: 395–398.
11. *Schepetkin I. A., Udut V. V., Karpov A. B.* Chemiluminescence response of human neutrophils to He-Ne laser radiation (*in vivo* and *in vitro*). *J. Physique.* 1994; 4 (С 4): 219–229.
12. *Кару Т. Й.* Первичные и вторичные клеточные механизмы лазерной терапии. В кн.: Низкоинтенсивная лазерная терапия: Сб. тр. М.: ТОО фирма Техника; 2000: 71–94.
13. *Karu T. I.* The science of low power laser therapy. L.: Gordon and Breach; 1998.
14. *Karu T. I.* Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci.* 1988; 2: 53–74.
15. *Бабенкова И. В., Теселкин Ю. О., Ким Зон Чол и др.* Влияние низкоинтенсивного лазерного облучения крови на состояние процесса перекисного окисления липидов при геморрагическом шоке у крыс. Вкн.: Патология и современная медицина: Материалы науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения проф. С.М. Павленко. 13–14 окт. 2000г., Москва. М.; 2000: 26–27.
16. *Другова О. В., Монич В. А., Житникова О. В.* Эффект воздействия красного света на постшемический миокард при реперфузии. *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2001; 131 (4): 386–387.
17. *Кожура В. Л., Таланцев К. В., Новодержкина И. С. и др.* Механизмы органопротекторного действия низкоинтенсивного лазерного излучения при массивной кровопотере и клинической смерти. *Анестезиология и реаниматология.* 2000; 6: 39–43.
18. *Фархутдинов Р. Р.* Хемилюминесценция сыворотки крови и её компонентов, индуцированная ионами двухвалентного железа, в норме и патологии: Дис. ... канд. мед. наук. М.; 1975.
19. *Бриль Г. Е.* «Панацея» клинического действия низкоинтенсивного лазерного излучения — миф или реальность? В кн.: Проблемы лазерной медицины. Материалы 4 Междунар. конгр. посвя. 10-летию Моск. обл. центра лазерной хирургии. Москва-Видное; 1997: 160–161.
20. *Захаров С. Д., Скопинов С. А., Чудновский В. М.* Первичные механизмы воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения в биологических системах: слабопоглощающие фотоакцепторы и структурное усиление локального фотовоздействия в биологических жидкостях. Вкн.: Лазеры и медицина. Ч.1: М.; 1989: 81–82.
21. *Саркисов Д. С.* Очерки по структурным основам гомеостаза. М.; 1997: 351.
22. *Артюхов В. Г., Башарина О. В., Рязанцева Л. Т. и др.* Влияние лазерного облучения на функциональную активность нейтрофилов человека: активация молекул миелопероксидазы в присутствии гематопорфирина. *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2001; 131 (4): 457–460.

Поступила 21.05.04

## Московский государственный Медикостоматологический университет

### Кафедра анестезиологии и реаниматологии

В октябре 2005 года состоится конференция, посвященная 30-летию кафедры  
 «Актуальные вопросы анестезиологии и реаниматологии»  
 В программу конференции входит мастер-класс  
 «Экзо- и эндотоксикозы. Диагностика. Лечение»

Материалы конференции будут опубликованы. В сборник принимаются статьи (3–4 стр.) и тезисы (1 стр.), напечатанные через 1,5 интервала, шрифт 12 pt Times New Roman в следующей последовательности: название работы, авторы, учреждение, текст статьи (тезисов).

Работы в печатном виде и на дискете присылать до 01 июня 2005 г. Указать контактные данные авторов (телефон, факс, E-mail). Материалы присылать по одному из адресов:

**129336, Москва, ул. Стартовая, д. 7, кв. 161. проф. В. Ю. Васильеву**  
**117279, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 57, корп.1, кв. 63. проф. И. Г. Бобринской**  
**Контактный телефон: (095) 268-52-95**

**Оргкомитет конференции**