

УДК 612+57.042+57.043+574.24

## ВНУТРИСОСУДИСТОЕ ЛАЗЕРНОЕ ОБЛУЧЕНИЕ КРОВИ ВЫЗЫВАЕТ ИЗМЕНЕНИЕ СТРУКТУРНЫХ ПАРАМЕТРОВ ЭРИТРОЦИТОВ БОЛЬНЫХ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Н.В. Акулич<sup>1</sup>, к.б.н., доцент; А.В. Марочков<sup>1,2</sup>, д.м.н.; А.Н. Осипенко<sup>1</sup>; А.В. Томов<sup>1</sup>, к.ф-м.н.; А.А. Марочков<sup>2</sup>

УО «Могилевский государственный университет им. А.А. Кулешова»

УЗ «Могилевская областная больница»

*Проведено комплексное исследование изменений параметров крови больных ИБС при проведении курса внутрисосудистого лазерного облучения. Обнаружены изменения структурных параметров эритроцитов при отсутствии статистически значимых изменений гомеостазиологических констант кислотно-основного состояния крови.*

**Ключевые слова:** эритроцит, ВЛОК, газовый состав крови, жирные кислоты

*Comprehensive research on the changes in blood parameters of CHD patients has been performed in the course of intravascular laser irradiation. Changes of structural parameters of erythrocytes have been detected at the absence of statistically significant changes of homeostasis constants of the blood acid-base balance.*

**Keywords:** erythrocyte, ILT, blood gas composition, fatty acids

Одним из эффективных методов улучшения перфузии тканей является внутрисосудистое лазерное облучение крови (ВЛОК). Однако имеющиеся в литературе сведения о влиянии ВЛОК на форму эритроцитов (обеспечивающих транспорт газов) и на их способность к обратимой деформации, обусловленную, в первую очередь, характеристиками мембранных липидов, составляющих плазматическую мембрану (ПМ), фрагментарны [1, 3].

Цель работы: исследование влияния внутрисосудистого лазерного облучения крови на структурно-функциональное состояние эритроцитов, изменение в составе их мембранных липидов у больных ИБС при проведении сеансов ВЛОК.

### Методика

Исследования проводили на базе отделения детоксикации УЗ «Могилевская областная больница» и в лаборатории экологической физиологии РЦКП УО «Могилевский государственный университет им. А.А. Кулешова».

Обследовались больные с ИБС в процессе комплексного лечения с использованием курса ВЛОК гелий-неоновым лазером (ГНЛ). Под наблюдением находились 35 больных мужского пола (54.3±1.8 года) с ИБС, стенокардией напряжения II-III функционального класса, находившихся на лечении в Могилевской областной больнице. Диагноз ИБС и функциональный класс степени ишемии верифицированы на основании данных клиники, анамнеза, а также результатов инструментальных методов. Контрольную группу составляли здоровые добровольцы мужского пола (15 человек, возраст 44.5±3.2 года).

Применялся низкоинтенсивный свет с длиной волны 632.8 нм. Излучение лазера подавалось в полость венозного сосуда с помощью волоконного

световода. Курс лечения ВЛОК состоял из 5 сеансов, длительность сеанса – 45 минут, мощность излучения – 1-2 мВт.

Анализ жирных кислот (ЖК) эритроцитарной массы проводили на газовом хроматографе с пламенно-ионизационным детектором. ЖК выделяли из фракции эфиров со спиртами холестерина и глицерина. Количественная оценка содержания отдельных жирных кислот производилась в процентном отношении к их общей сумме. Проводился биохимический анализ плазмы крови на содержание общих липидов, β-липопротеинов, α-холестерина, общего холестерина и триглицеридов.

Анализ эритроцитов осуществляли на полуавтоматическом гематологическом анализаторе Abacus (Австрия), автоматическом гемоанализаторе Sysmex ХЕ-2100 (Япония), проточном цитофлуориметре Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter (США) и микроскопе проходящего света (AxioImager A1, Германия), объектив Plan-Neofluar 100Ч1.3 Oil с видеокамерой «AxioCam Mrc5» (Германия) при помощи программы «Диаморф-ЦИТО» (Россия) и ImageJ (США).

После 30-минутного отстаивания цельной крови забирали 1 мкл эритроцитов, которые разбавляли буферным раствором, изотоническим раствором (Iso-Diluent, Beckman Coulter, США), изотоническим разбавителем Юни-Гем (Россия) и изотоническим разбавителем Sysmex (Япония), встряхивали на вортексе и через 1-2 минуты анализировали на проточном цитофлуориметре. Исследования проводили при следующих режимах: скорость потока – 7 мкл/мин, лазер – 488 нм, мощность лазера 13 мВт. Скорость анализа составляла 500-600 событий в секунду, концентрация образца составляла 5 000-6 000 клеток в миллилитре. Использо-

лась линейная шкала и для электронного объема (EV), и для бокового светорассеивания (SS). В каждой пробе анализировалось 40 000 событий, анализ занимал 70-80 сек. Калибровку проточного цитофлуориметра по размеру измеряемых частиц проводили при помощи флуоросфер COULTER® Flow-Check™.

Анализ pH, газов крови ( $p\text{CO}_2$ ,  $p\text{O}_2$ ), активности электролитов (Cl, Ca, Na, K), концентрации метаболитов (глюкоза, лактат) и оксиметрии (концентрация общего гемоглобина  $\bar{I}$  ctHb, насыщение крови кислородом –  $s\text{O}_2$ , фракций гемоглобина) проводили на газоанализаторе ABL 800 FLEX (Дания).

Статистический анализ состоял из анализа распределения с расчетом моды, медианы, среднего значения, эксцесса, определения характера распределения. Поскольку распределение не было нормальным, то мы остановились на непараметрических методах анализа (Колмогоров-Смирнов, Wald-Wolfowitz, Mann-Whitney). Изменения считались значимыми при  $p < 0.05$ . Все статистические методики реализованы с помощью программы Statistica (StatSoft, США).

#### Результаты и обсуждение

До лечения, а также перед проведением сеанса ВЛОК у всех пациентов с ИБС выявлена тенденция к ацидозу, уровень pH составлял  $7.32 \pm 0.04$  (табл. 1).

После каждого из сеансов отмечалась нормализация кислотно-щелочного состояния, причем, рост pH ( $p < 0.02$ , тест Wald-Wolfowitz) положительно коррелировал со снижением  $p\text{CO}_2$  ( $r = 0.85$ ,  $p < 0.04$ ) и увеличением концентрации бикарбонатов ( $r = 0.87$ ,

$p < 0.04$ ). Если сравнивать исходный уровень pH с таковым на следующий день до проведения процедуры, а также перед проведением последней процедуры, то достоверных изменений по тесту Колмогорова-Смирнова и Mann-Whitney теста не зафиксировано, а Wald-Wolfowitz тест (более мощный) выявил достоверное ( $p < 0.025$ ) снижение величины pH. Следовательно, существуют как кратко-, так и долгосрочные реакции на проводимую терапию, а суммарный эффект от ВЛОК – отсутствие каких-либо изменений pH на протяжении всего периода лечения, за исключением эпизода перед проведением последнего сеанса.

Концентрация лактата плазмы до лечения составляла  $1.99 \pm 0.77$  ммоль/л. После проведения сеанса ВЛОК концентрация лактата снижалась, а на следующий день, и перед проведением последней процедуры ( $2.33 \pm 0.91$ ) повышалась, что свидетельствует об усилении гликолиза.

Как известно, лактат постоянно образуется при анаэробном метаболизме глюкозы, в частности, в эритроцитах. При гликолизе в эритроцитах лактат продуцируется непрерывно, так как эти клетки лишены митохондрий и не содержат ферментов аэробного окисления пировиноградной кислоты. Источником роста уровня лактата могут являться все производные метаболизма жирных кислот в печени, использующиеся у пациентов с ИБС в качестве альтернативного глюкозе источника энергии.

Стандартный бикарбонат ( $\text{HCO}_3^-$ ) – после проведения сеанса возрастал, а к моменту проведения следующего сеанса возвращался к исходному со-

**Таблица 1** – Анализ кислотно-щелочного состояния крови при проведении сеансов ВЛОК

Параметры	1 день до ВЛОК	1 день после ВЛОК	3 день до ВЛОК	3 день после ВЛОК	5 день до ВЛОК	5 день после ВЛОК
	$\bar{X} \pm S_x$					
pH	7.32±0.04	7.38±0.02	7.32±0.05	7.39±0.02	7.32±0.04	7.38±0.02
$p\text{CO}_2$	52.58±8.72	43.46±4.06	54.59±9.50	43.91±4.49	54.11±7.48	44.14±4.03
$p\text{O}_2$	28.78±8.63	38.45±10.33	28.43±9.83	39.57±15.17	26.35±8.31	39.19±11.14
ctHb	147.76±16.59	140.83±14.37	150.54±16.58	139.81±14.06	149.71±14.03	144.06±15.50
$s\text{O}_2$	48.14±19.35	69.11±14.86	46.47±21.39	69.70±17.28	42.69±19.35	69.76±18.09
$\text{FO}^2\text{Hb}$	47.12±18.77	67.61±14.49	45.09±20.20	68.19±17.01	42.10±19.25	68.25±17.69
FCONHb	1.35±1.11	1.61±1.08	1.34±1.09	1.61±1.06	1.49±1.39	1.76±1.38
FHHb	50.93±19.16	30.22±14.51	53.62±19.53	28.82±16.76	55.81±19.30	29.49±17.48
FMetHb	0.59±0.15	0.57±0.14	0.56±0.16	0.56±0.17	0.60±0.17	0.55±0.15
$\text{K}_+$	3.85±0.39	3.85±0.44	3.85±0.40	3.87±0.57	3.84±0.34	3.80±0.39
$\text{Na}_+$	138.78±3.47	136.80±2.89	138.46±2.53	136.62±2.81	138.64±2.43	136.21±2.26
$\text{Ca}_+$	0.93±0.12	0.98±0.13	0.89±0.14	0.90±0.14	0.96±0.14	0.95±0.14
cL-	105.38±2.85	106.50±3.13	104.86±3.37	105.62±3.07	105.49±3.62	106.26±3.08
Глюкоза	7.33±3.00	7.85±3.63	6.72±2.58	6.77±2.53	7.13±2.60	7.37±2.63
Лактат	1.99±0.77	1.57±0.57	2.19±0.92	1.37±0.45	2.25±0.81	1.63±0.49
p50	28.81±2.99	26.66±1.94	29.69±3.36	26.96±1.91	28.83±2.73	26.53±1.59
$\text{HCO}_3^-$	23.15±1.36	23.93±1.16	23.39±1.17	24.63±1.33	23.41±1.77	24.42±1.12

стоянию. До лечения отмечался респираторный алкалоз, который практически не устранился к моменту окончания лечения.

Насыщение гемоглобина кислородом ( $sO_2$ ) в результате проведения сеансов ВЛОК достоверно увеличивалось ( $p < 0.04$ ) после каждого сеанса, но перед следующим сеансом уровень  $sO_2$  не отличался от исходного. Поскольку показатель  $sO_2$  адекватен для оценки при отсутствии в крови дисгемоглобинов, то для оценки состояния системы крови оценивалась фракция оксигемоглобина ( $FO_2Hb$ ). Ее прирост был статистически значим после проведения ВЛОК, но, как и в случае с  $sO_2$ , к моменту проведения следующего сеанса эта фракция также имела тенденция к снижению. Изменений электролитного состава венозной крови при проведении ВЛОК больным ИБС не выявлено.

До начала лечения состояние больных ИБС характеризовалось высоким уровнем гемоглобина (подтверждено на двух гематологических анализаторах, за исключением газоанализатора, где уровень гемоглобина был на уровне верхней границы нормы). Повышенный уровень гемоглобина достоверно снижался после проведения каждого сеанса ВЛОК, а по окончании лечения получены противоречивые результаты измерений на гемоанализаторе и газоанализаторе. В первом случае выявлена тенденция к снижению концентрации гемоглобина, а во втором – тенденция к его росту ( $p = 0.8$  и  $p = 0.9$ , соответственно).

Гематокрит (Ht) у больных с ИБС до лечения составлял 50.63%, а по окончании лечения – 46.8%. Непосредственно после воздействия отмечалось снижение Ht до 46,43% ( $p < 0.05$ ), которое сопровождалось незначительным (12%), но достоверным ( $p < 0.04$ ) увеличением среднего содержания гемоглобина в эритроците (подтверждено на гематологическом анализаторе с прямым определением этого параметра) и увеличением его диаметра с 7.32 до 7.84 мкм ( $p < 0.002$ ) и площади поверхности с  $137.22 \pm 11.21$  до  $152.21 \pm 14.44$  мкм<sup>2</sup> ( $p < 0.001$ ) к окончанию лечения. При этом популяция эритроцитов после каждой из процедур становилась более однородной ( $p < 0.003$ ).

Изменение морфологических параметров эритроцитов сопровождалось ростом относительного содержания докозагексаеновой (ДГК) полиненасыщенной жирной кислоты с  $4,69 \pm 0,83\%$  до  $4,93 \pm 0,89\%$ . Изменений содержания общих липидов,  $\beta$ -липопротеинов,  $\alpha$ -холестерина, общего холестерина и триглицеридов выявлено не было.

Поскольку данные световой микроскопии по понятным причинам характеризуются малой выборкой, то для уточнения полученных данных был проведен анализ эритроцитов с использованием проточного цитофлуориметра. Известно, что максимальная достоверность такого рода исследований достигается при использовании изотонического раствора, минимально воздействующего на исследуемые клетки. С другой стороны, высокая чув-

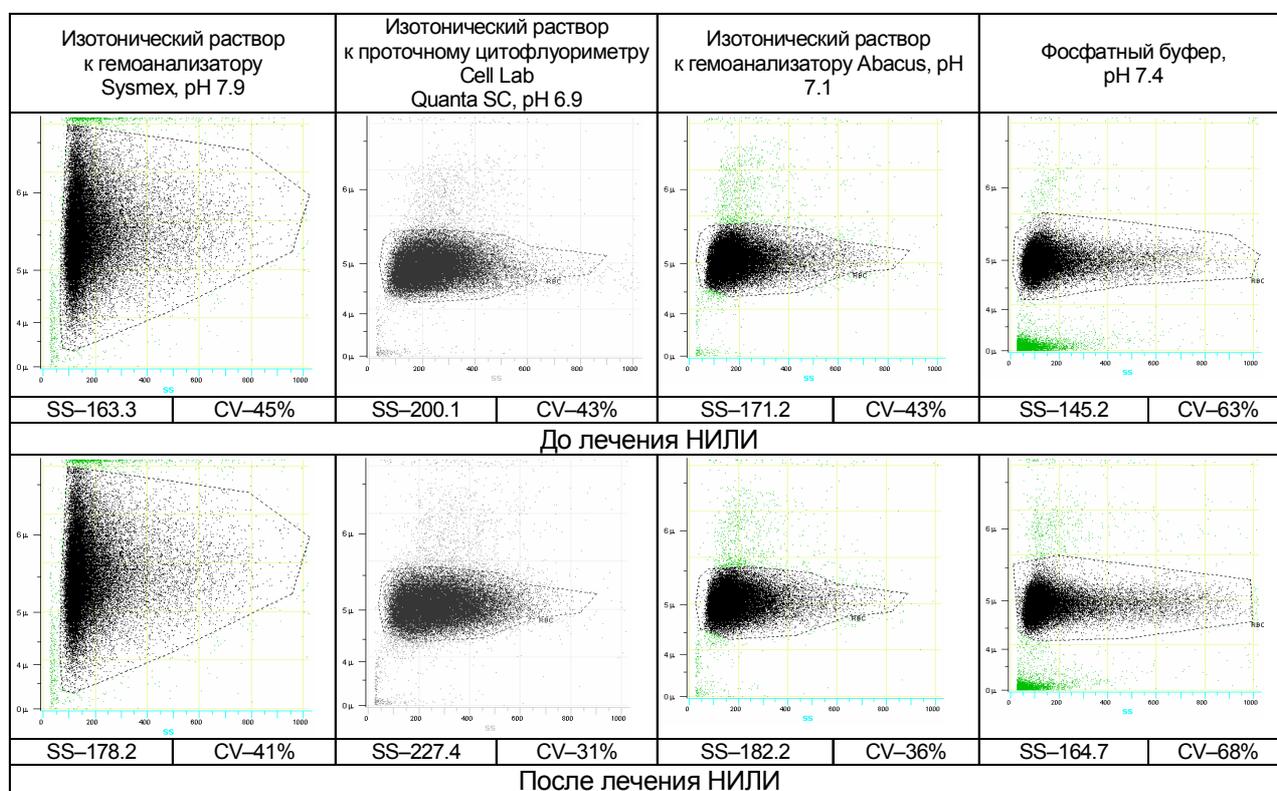


Рисунок 1 – Пример диаграмм распределения эритроцитов больных ИБС в динамике курса ВЛОК, полученных на проточном цитофлуориметре Cell Lab Quanta SC (по оси  $x$  – боковое светорассеивание, безразмерная величина, по оси  $y$  – электронный объем, мкм)

ствительность современных цитометров может приводить к увеличению коэффициента вариации измеряемых параметров. Поэтому, наряду с изотоническим раствором, которым комплектовался цитометр, мы использовали другие растворы, отличающиеся величиной рН (рис. 1). При этом учитывалось, что помещение эритроцитов в растворы с различным рН само по себе способно вызывать изменения как в морфологии эритроцитов, так и в параметрах бокового светорассеивания.

Курсовое применение ВЛОК выявило немонотонный характер изменения бокового светорассеивания лазерного луча эритроцитами. К окончанию терапии ВЛОК отмечается достоверное увеличение этого параметра (рис. 2) и достижение величины, характерной для контрольной группы.

Эритроцит, как оптический объект, представляет собой сложную комбинацию фазовых и амплитудных неоднородностей. К фазовым неоднородностям относятся все части клетки, отличающиеся от остальной цитоплазмы и окружающей клетку жидкости по показателю преломления и практически не поглощающие падающее на клетку зондирующее лазерное излучение ( $\lambda=488$  нм). К амплитудным неоднородностям относятся включения, достаточно сильно поглощающие падающее на клетку излучение, в частности, гемоглобин. Согласно [4], сигнал бокового светорассеяния в проточных цитометрах формируется как результат многочисленных актов рассеяния света на этих неоднородностях и его переотражения. Сложность структуры эритроцита не позволяет теоретически описать процесс его взаимодействия с падающим излучением и напрямую связать параметры указанных выше неоднородностей с величиной сигнала бокового светорассеяния, однако известно, что эта величина хорошо коррелирует с результатами цитометрических измерений общего количества белка в клетках с помощью красителей [4].

Таким образом, можно предположить, что обнаруженный нами феномен увеличения сигнала бокового светорассеяния от образцов, взятых у пациентов после сеансов ВЛОК, связано с увеличением количества протеина в эритроцитах, индуцированное излучением гелий-неонового лазера.

ВЛОК вызывает рост объема клетки ( $p<0.03$ ) и бокового светорассеивания ( $p<0.02$ ) луча лазера от эритроцита при использовании проточного цитометра. По данным гемоанализаторов изменений объема красных кровяных клеток (МСV) зафиксировано не было. Принцип измерения объема эритроцитов в гемоанализаторах и в проточном цитометре одинаков, но в гемоанализаторе МСV вычисляются делением суммы клеточных объемов клеток в диапазоне от 36-360 фл на число подсчитанных событий. В проточном цитометре существует возможность выделить область, принадлежащую интересующей клеточной популяции и произвести подсчет в ее границах, поэтому этот более точный

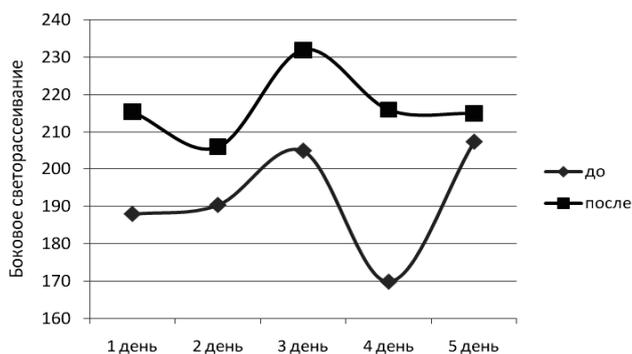


Рисунок 2 – Боковое светорассеивание в динамике курса ВЛОК

метод и позволил выявить изменения морфологии эритроцитов.

Живой организм избегает грубых, аритмичных, неуправляемых сдвигов. Любое инвазивное воздействие на организм больного имеет важные биологические последствия – вазомоторные действия, лейкоцитарные перемещения. Одним из фундаментальных понятий медико-биологических наук является гомеостазис. С этих позиций ВЛОК – это возмущающий сигнал, теоретически способствующий его восстановлению у больных ИБС. В нашей предыдущей работе показано, что акцептором ВЛОК является гемоглобин [2], и спустя 12 лет эта позиция не пересмотрена. Одним из основных выводов настоящей работы является установление факта снижения рН венозной крови к моменту окончания лечения, что при прочих равных условиях будет приводить к увеличению артериовенозной разницы и свидетельствовать о лучшей экстракции кислорода тканями и прекращении эпизодов ишемии.

Установленный нами факт увеличения концентрации гемоглобина в эритроците и рост среднего объема эритроцита при проведении ВЛОК, на наш взгляд, получен с использованием достаточно точных методов. В доступной нам литературе не встречались сведения о возможных механизмах этого феномена и для их выяснения требуются дальнейшие исследования.

#### Литература

1. Васильев А.П., Стрельцова Н.Н., Сенаторов Ю.Н. Эффективность лазеротерапии больных ишемической болезнью сердца // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. - 2003. - № 4. - С. 10-12.
2. Марочков А.В. Внутрисосудистое лазерное облучение крови, механизмы взаимодействия и клиническое применение. Минск.: Полибиг, 1996. – 88 с.
3. Москвин С.В., Буйлин В.А. Основы лазерной терапии. - Тверь.: Триада, 2006. - 256 с.
4. Shapiro H.W. Practical Flow Cytometry. - Wiley-Liss, A John Wiley & Sons, Inc. – 2003. – 727 p.

Поступила 08.04.09

Исследование проведено при финансовой поддержке Могилевского областного исполнительного комитета в рамках региональной программы «Развитие Могилевской области»