

**ЛАЗЕРНАЯ АТОМНО-ЭМИССИОННАЯ СПЕКТРОМЕТРИЯ,
МОРФОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ДЕГИДРАТИРУЮЩИХ КАПЕЛЬ
БИОЖИДКОСТЕЙ И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС У ПАЦИЕНТОВ С
ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИЕЙ МОЗГА ПРИ ЛАЗЕРНОМ ОБЛУЧЕНИИ КРОВИ**

Прокопенко Т.А.¹, Нечипуренко Н.И.¹, Пашковская И.Д.¹, Зажогин А.П.²

¹ Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии
ул. Ф. Скорины, 24, г. Минск, 220114, Беларусь; e-mail: tatiananovitskaya1108@mail.ru

² Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, Беларусь

Поступила в редакцию: 10.07.20

Аннотация. В данной работе установлено, что у пациентов на момент поступления в стационар имеются изменения в локальном пространственном распределении кальция и морфологической структуре дегидратирующих капель биожидкостей, которые характеризуются появлением широких, трехлучевых и жгутовых трещин в цельной крови и потерей симметрии в плазме. Выявлена исходно низкая активность супероксиддисмутазы в крови пациентов, которая нормализовалась после проведенного курсового лечения с включением внутривенного или надвенозного лазерного облучения крови дополнительно к стандартной терапии.

Ключевые слова: лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия, дегидратация капель биожидкости, морфологическая структура, хроническая ишемия головного мозга, окислительный стресс, лазерная гемотерапия.

В настоящее время цереброваскулярные заболевания ишемического генеза являются серьезной проблемой. Распространенность сосудистых заболеваний головного мозга неуклонно растет во всем мире.

Хроническая ишемия головного мозга (дисциркуляторная энцефалопатия – ДЭ) – прогрессирующее хроническое диффузное или мультифокальное нарушение мозгового кровообращения, проявляющееся неврологическими синдромами и когнитивными нарушениями, которое относится к числу наиболее распространенных сосудистых заболеваний, нередко начинаясь в трудоспособном возрасте. Наиболее частыми причинами ДЭ являются атеросклероз артерий и артериальная гипертензия [1].

Дисциркуляторную энцефалопатию подразделяют на 3 стадии в зависимости от выраженности клинических симптомов. Первая стадия характеризуется в основном субъективными и вегетативными расстройствами, однако нередко определяются незначительно выраженные неврологические синдромы. У больных ДЭ 2-й стадии усугубляются когнитивные нарушения, становятся более выраженными неврологические синдромы, нередко теряется трудоспособность. В 3-й стадии заболевания диагностируются выраженные когнитивные изменения, органическая неврологическая симптоматика, тазовые нарушения [2].

В основе патогенетических механизмов ДЭ лежат следующие процессы: нарушение микрогемодинамики, дефицит энергетических ресурсов, глутаматная эксайтотоксичность, внутриклеточное накопление кальция, лактацидоз и окислительный стресс, что приводит к гибели клеток мозга [3, 4].

В антиоксидантной системе (АОС) защиты клеток от свободнорадикального окисления важнейшую роль играет фермент супероксиддисмутазы (СОД), который обеспечивает начальную фазу обезвреживания наиболее токсичных супероксидных анион-радикалов в реакции дисмутации с образованием перекисей водорода. Затем в реакции обезвреживания перекисей водорода участвует фермент каталаза.

Одним из методов коррекции нарушений, возникающих при ишемии головного мозга может быть лазерная гемотерапия в сочетании с лекарственными средствами, в частности внутривенное лазерное облучение крови (ВЛОК) в красной области спектра или надвенозное лазерное облучение крови (НЛОК) в инфракрасной спектральной области, обладающие антиоксидантными, иммуномодулирующими, противовоспалительными свойствами. Адаптогенное действие низкоинтенсивного лазерного излучения реализуется на клеточном, тканевом, системном уровнях [5-7]. Результатом действия лазерной гемотерапии является ответ системы регулирования гомеостаза на развитие патологических процессов в отдельных органах и тканях, поэтому изучение действия различных длин волн низкоинтенсивного лазерного излучения при цереброваскулярных заболеваниях актуально.

В последнее время в медицинской диагностике начинают применять методы исследования структур, образующихся при кристаллизации солей в биожидкостях. На практике для диагностики используется метод клиновидной дегидратации биожидкостей, разработанный Шабалиным В.Н. и Шатохиной С.Н. [8]. Кристаллы солей выпадают в виде зерен, образуют дендриты, а биологическая компонента жидкости создает сложную лепестковую структуру. При различных вариантах нарушения мозгового кровообращения, в частности ДЭ, высохшая капля биожидкости может иметь, отличную от здорового человека структуру в зависимости от кинетики испарения воды из капли: вода уходит, а в оставшейся субстанции образуется густой гель и кристаллизуются соли [9].

Цель работы: изучить морфологическую структуру и количественное пространственное распределение кальция в дегидратирующих каплях плазмы, про-, антиоксидантное состояние у пациентов с ДЭ под влиянием лазерной гемотерапии.

В исследовании приняли участие 42 пациента с ДЭ 1-й и 2-й стадий, госпитализированных в РНПЦ неврологии и нейрохирургии г. Минска, которые были разделены на три группы: первую группу составили 15 пациентов (средний возраст $69,1 \pm 12,1$ лет), которые дополнительно к стандартной терапии (СТ) получали 8-10 сеансов ВЛОК с помощью полупроводникового лазера «Люзар МП» с длиной волны 0,67 мкм; вторую группу – 12 пациентов (средний возраст $67,9 \pm 5,8$ лет), которые дополнительно к СТ получали 8-10 сеансов НЛОК с помощью аппарата квантовой терапии «Витязь» с длиной волны 0,85 мкм; в третью группу вошли 15 пациентов (средний возраст $65,8 \pm 13,0$ лет), которые получали СТ; контрольную группу составили 20 практически здоровых лиц, средний возраст которых составил $56,6 \pm 8,1$ лет.

Для оценки локального пространственного распределения кальция использовали лазерный многоканальный атомно-эмиссионный спектрометр LSS-1. Все эксперименты проводили в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 100 мм. Размер пятна фокусировки примерно 50 мкм. Анализировали суммарные результаты действия 5 последовательных сдвоенных лазерных импульсов. Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (первый и второй импульсы), временной интервал между сдвоенными импульсами 8 мкс. Абляция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения примерно 0,10-0,15 мм. По диаметру пробы анализ проводили в 12 точках поверхности.

На рисунке 1 представлена зависимость интенсивности линий кальция в спектрах высохших капель плазмы пациентов с ДЭ (а – пациент до и после лечения ВЛОК, б – пациент до и после лечения НЛОК, в – пациент, получавший СТ). У пациентов до и после лечения имеются существенные различия в характере распределения кальция в дегидратирующих каплях плазмы. На момент госпитализации кальций распределен хаотично по поверхности капли, максимальное его содержание регистрируется в верхних слоях. После лечения у данных пациентов наблюдается тенденция к улучшению распределения кальция, но не происходит полного восстановления. Полученные данные показывают, что у пациентов с ДЭ происходит хаотичное образование центров коагуляции, наблюдается разброс концентрации кальция как по поверхности, так и по слоям. Это обусловлено нарушением связывающей способности альбумина, которая вызывает аномальную коагуляцию белка и увеличение концентрации кальция в более глубоких слоях.

Для морфоструктурного анализа дегидратирующих капель крови и плазмы (проводили до и после лечения) образцы готовили по следующей методике: каплю цельной крови или плазмы наносили на поверхность тщательно промытой подложки из полиметилметакрилата с помощью микропипетки. Объем капли составлял 10 мкл. Процесс сушки проходил при температуре 20-25 °C и относительной влажности воздуха 60-65 % в течение 90-120 минут. Для получения снимков использовали оптический микроскоп Биолам (Россия) со светодиодной подсветкой и веб-камерой (окуляр 9x, объектив 15x).

При высыхании капли биожидкости испарение происходит равномерно по всей её поверхности. При этом наблюдается неравномерное распределение растворенных в капле веществ. Это связано с тем, что она имеет разную толщину слоя: тонкую на периферии и утолщенную в центре. При высыхании капли в силу действия осмотических сил возрастает концентрация соли в центральной области, а белки и другие растворенные вещества

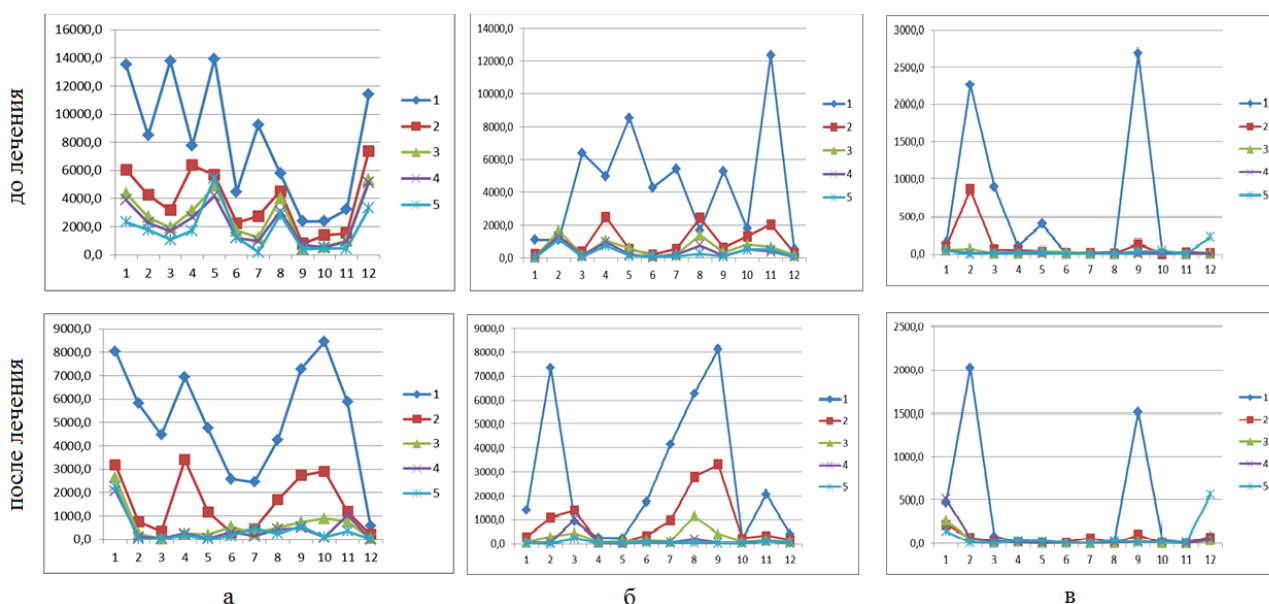


Рисунок 1. Интенсивность линии Ca II (393,239 нм) в атомно-эмиссионных спектрах плазмы крови пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией (по вертикальной оси отображена интенсивность линий кальция в отн.ед., по горизонтальной – номера точек)

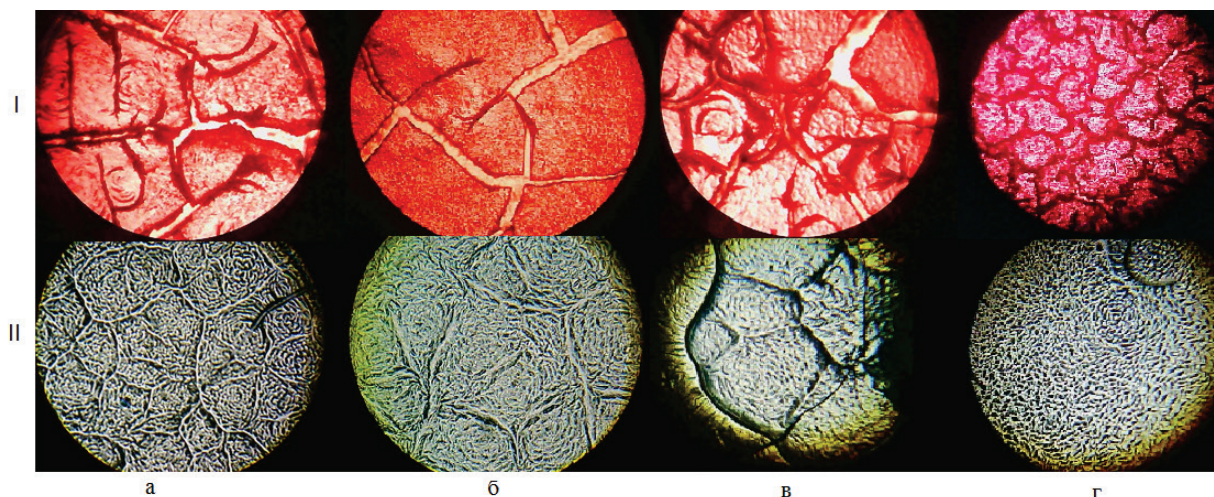


Рисунок 2. Морфологическая структура дегидратирующих капель крови и плазмы у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией до лечения (увеличение $\times 135$)

с высоким молекулярным весом перемещаются на периферию капли. В результате полного высыхания капли биожидкости соли вытесняют органические вещества из воды с образованием твердой фазы и формированием краевой зоны, представленной структурами органического происхождения и центральной кристаллической – солевыми образованиями. Механизмы переноса коллоидных частиц в высыхающих каплях в настоящее время достаточно хорошо изучены как теоретически, так и экспериментально [13], но влияние диффузии на перемещение внутри капли молекул малого размера при ДЭ требует изучения.

На рисунке 2 представлена морфологическая структура центральной зоны дегидратирующих капель крови (I) и плазмы (II) пациентов до лечения (а, б, в) и здорового лица (г).

При изучении центральной зоны дегидратирующей капли крови здорового человека мы видим четко структурированную, мелкоячеистую картину растрескиваний. В то время как качественный сравнительный анализ структуры поверхности образцов цельной крови показал, что у пациентов с ДЭ имеются отличия от здоровых лиц: преобладает наличие широких (маркер склеротических изменений), трехлучевых (признак застойных явлений в организме, в том числе в тканях головного мозга) и штриховых (признак ДЭ) трещин, также у некоторых пациентов имеются жгутовые трещины, которые свидетельствуют о гипоксии.

Структура фаций плазмы пациентов имеет отличия от здоровых лиц и характеризуется потерей симметрии расположения основных элементов фации, появлением трещин в центральной зоне.

На рисунке 3 представлена морфологическая структура дегидратирующих капель крови (I) и плазмы (II) пациентов после лечения (а – ВЛОК, б – НЛОК, в – СТ) и здорового лица (г).

После проведенной терапии у всех пациентов наблюдается улучшение морфоструктуры дегидратирующих капель крови (практически не наблюдается штриховых трещин, уменьшается количество широких и жгутовых трещин), но не происходит полной нормализации. Морфологическая структура дегидратирующих капель плазмы у пациентов, получавших лазерную гемотерапию, после лечения практически не изменялась.

На 1-е–2-е сутки после госпитализации, а также после курсового лечения определяли активность СОД в цельной крови по реакции супероксидзависимого окисления кверцетина [10]. Активность каталазы определяли

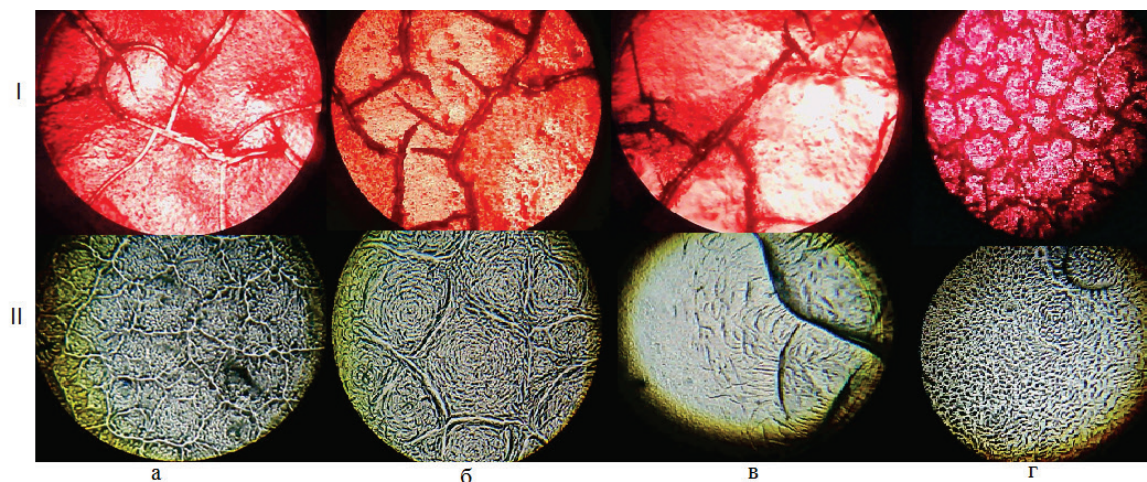


Рисунок 3. Морфологическая структура дегидратирующих капель крови и плазмы у пациентов с дисциркуляторной энцефалопатией после лечения (увеличение $\times 135$)

Таблица 1. Показатели про-, антиоксидантной системы крови у пациентов с ДЭ до и после проведенной терапии и у здоровых лиц

Показатель	1-я группа, пациенты с ДЭ (ВЛОК), n=15	2-я группа, пациенты с ДЭ (НЛОК), n=12	3-я группа, пациенты с ДЭ (СТ), n=15	Контрольная группа, здоровые лица, n=20
СОД, Е/мл до лечения	75,4 (62,1-105,5) p=0,005	76,8 (60,2-105,2) p=0,01	104,3 (75,0-110,2)	106,3 (92,9-117,6)
СОД, Е/мл после лечения	86,3 (59,9-122,3)	77,8 (63,4-130,5)	88,9 (71,6-107,3)	
Каталаза, усл.ед./с*мл до лечения	12,6 (7,2-18,0)	11,4 (5,7-21,3)	19,2 (11,4-27,0)	18,6 (13,2-28,8)
Каталаза, усл.ед./с*мл после лечения	21,0 (10,8-31,8)	27,9 (8,7-46,2) p=0,01	21,0 (13,2-33,0)	
ТБК-П, мкмоль/л до лечения	2,46 (2,15-2,84)	2,16 (1,73-2,92)	2,15 (1,69-3,33)	2,08 (1,8-2,69)
ТБК-П, мкмоль/л после лечения	2,0 (1,77-2,46)	2,0 (1,77-2,5)	2,15 (1,8-2,62)	
АОА, ммоль/л до лечения	2,7 (2,63-3,0)	2,21 (1,34-2,58)	2,18 (2,0-2,56)	2,11 (1,87-2,56)
АОА, ммоль/л после лечения	2,91 (2,56-3,08)	2,15 (1,24-2,63)	2,24 (1,92-2,48)	

Примечания. p – достоверность различий по сравнению с данными здоровых лиц;

p• – достоверность различий по сравнению с данными до лечения.

по методу М.А. Королюка [11]. Концентрацию продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК-П) исследовали по методике, модифицированной В.А. Костюком [12]. Количественное определение антиоксидантной активности (АОА) в сыворотке крови проводили спектрофотометрически с помощью набора реагентов «Оксистат» производства ИБОХ НАНБ (РБ).

При статистической обработке результатов применяли программу Statistica 10.0; использовали параметрические и непараметрические методы. Сравнение изучаемых показателей с данными здоровых лиц осуществляли с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия между показателями до и после лечения оценивали по T-критерию Вилкоксона. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Изученные показатели про-, антиоксидантной системы крови пациентов на момент госпитализации и после проведенного лечения в различных группах представлены в таблице 1.

У пациентов 1-й и 2-й групп на момент госпитализации выявлено статистически значимое снижение активности СОД ($p=0,005$ и $p=0,01$ соответственно) относительно группы здоровых лиц. Уменьшение активности СОД приводит к избыточному образованию наиболее агрессивной формы кислородных радикалов – синглетного кислорода и рассматривается как неблагоприятный признак, который указывает на снижение неспецифической резистентности организма. Также показана тенденция к уменьшению активности каталазы (на 32,3% в 1-й группе и 38,7% во 2-й группе) и повышению концентрации ТБК-П в 1-й группе на 18%, что свидетельствует об активации процессов ПОЛ и недостаточной защите клеток от воздействия свободных радикалов у обследованных пациентов, наиболее выраженные в 1-й группе наблюдения. Значения про-, антиоксидантных показателей в крови пациентов 3-й группы на момент поступления в стационар не имели статистически значимых отличий от практически здоровых лиц.

После использования лазерной гемотерапии различных длин волн в сочетании со стандартной терапией у пациентов 1-й и 2-й групп, соответственно, выявлены возрастание активности СОД на фоне незначительного снижения концентрации ТБК-П. При этом, во 2-й группе пациентов после применения НЛОК, наблюдается статистически значимое повышение активности каталазы с 11,4 (5,7-21,3) до 27,9 (8,7-46,2) усл.ед./с*мл ($p=0,01$) по сравнению с данными до лечения. Известно, что повышение активности СОД при соответствующей активации других антиоксидантных ферментов, главным образом каталазы, является благоприятным изменением в организме из-за эффективного разложения перекиси водорода, избыточно образующейся при дисмутации супероксидного аниона, и, следовательно, оказывает цитопротективное действие.

Анализ АОА сыворотки крови у пациентов с ДЭ всех групп до и после лечения, оценивающей концентрацию водорастворимого аналога витамина Е (тролокса), который считается наиболее распространенным природным антиоксидантом, содержащимся в сыворотке и в плазматических клеточных мембранах, также оказывающим влияние на содержание продуктов ПОЛ [14], не установил достоверной разницы по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, на основании результатов проведенного исследования у пациентов с хронической ишемией головного мозга были выявлены изменения в локальном пространственном распределении кальция и морфологической структуре дегидратирующих капель биожидкостей, а также снижение активности СОД в крови пациентов 1- и 2-й групп на момент госпитализации. После проведенного курсового лечения с включением ВЛОК

или НЛОК с разной длиной волн установлена тенденция к нормализации морфоструктуры дегидратирующих капель цельной крови, а также повышение активности основных ферментов АОС.

Список литературы / References:

1. Воскресенская О.Н., Захарова Н.Б., Иванов М.В. Механизмы формирования хронической ишемии головного мозга при артериальной гипертензии. *Журн. неврологии и психиатрии им. Корсакова*, 2017, № 2, с. 68-71. [Voskresenskaya O.N., Zakharova N.B., Ivanov M.V. Mechanisms of the formation of chronic cerebral ischemia in hypertension. *Zhurn. neurology and psychiatry. Korsakova*, 2017, no. 2, pp. 68-71. (In Russ.)]
2. Левин О.С., Штульман Д.Р. *Неврология. Справочник практического врача, 10 издание*. М.: «МЕДпресс-информ», 2016, с. 406-416. [Levin O.S., Shtulman D.R. *Neurology. Handbook of the Practitioner, 10th edition*. М.: "MEDpress-inform", 2016, pp. 404-416. (In Russ.)]
3. Нечипуренко Н.И. Роль кислородзависимых процессов в патогенезе хронической ишемии головного мозга. *Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа*, 2012, № 3, с. 150-159. [Nechipurenko N.I. The role of oxygen-dependent processes in the pathogenesis of chronic cerebral ischemia. *Neurology and neurosurgery. Eastern Europe*, 2012, no. 3, pp. 150-159. (In Russ.)]
4. Chen S.D., Yang D. I., Lin T.K., Shaw F.Z., Liou C.W., Chuang Y.C. Roles of oxidative stress, apoptosis, PCG-1 α and mitochondrial biogenesis in cerebral ischemia. *Int. J.Mol. Sci.*, 2011, vol. 12 (10), p. 7199.
5. Никитин А.В., Эльжуркаев А.А. Надвенное низкоинтенсивное лазерное излучение в комплексном лечении ишемической болезни сердца. *Вестник новых медицинских технологий*, 2013, № 1. [Nikitin A.V., Elzhurkaev A.A. Ultravascular low-intensity laser radiation in the complex treatment of coronary heart disease. *Bulletin of new medical technologies*, 2013, no. 1. (In Russ.)]
6. Нечипуренко Н.И., Степанова Ю.И., Василевская Л.А., Пашковская И.Д. *Лазерная гемотерапия при ишемических цереброваскулярных заболеваниях (экспериментальные и клинические аспекты)*. Минск: Бизнесофсет, 2010, 192 с. [Nechipurenko N.I., Stepanova Yu.I., Vasilevskaya L.A., Pashkovskaya I.D. *Laser hemotherapy for ischemic cerebrovascular diseases (experimental and clinical aspects)*. Minsk: Biznesofset, 2010, 192 p. (In Russ.)]
7. Пашковская И.Д., Нечипуренко Н.И., Василевская Л.А. Эффекты инфракрасного лазерного излучения при экспериментальной церебральной ишемии. *Здравоохранение*, 2010, № 2., с. 74-78. [Pashkovskaya I.D., Nechipurenko N.I., Vasilevskaya L.A. Effects of infrared laser radiation in experimental cerebral ischemia. *Health*, 2010, no. 2, pp. 74-78. (In Russ.)]
8. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. *Морфология биологических жидкостей человека*. М.: Хризостом, 2001, 302 с. [Shabalin V.N., Shatokhina S.N. *Morphology of human biological fluids*. М.: Chrysostom, 2001, 302 p. (In Russ.)]
9. Булойчик Ж.И., Зажогин А.П., Нечипуренко Н.И., Патапович М.П., Пашковская И.Д. Морфологическое и спектрофотометрическое исследование плазмы крови пациентов с аневризмой сосудов головного мозга. *Журнал БГУ. Физика*, 2018, № 1, с. 9-17. [Buloychik Zh.I., Zajogin A.P., Nechipurenko N.I., Patapovich M.P., Pashkovskaya I.D. Morphological and spectrophotometric study of the blood plasma of patients with cerebral aneurysm. *BSU Journal. Physics*, 2018, no. 1, pp. 9-17. (In Russ.)]
10. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. *Вопр. мед. химии*, 1990, т. 36, № 2, с. 88-91. [Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Kovaleva Zh.V. A simple and sensitive method for determining the activity of superoxide dismutase, based on the oxidation reaction of quercetin. *Questions of medical chemistry*, 1990, vol. 36, no. 2, pp. 88-91. (In Russ.)]
11. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майрова И.Г. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело*, 1988, № 1, с. 16-19. [Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayrova I.G. Method for determination of catalase activity. *Laboratory science*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
12. Костюк В.А., Потапович А.И. Определение продуктов перекисного окисления липидов с помощью тиобарбитуровой кислоты в анаэробных условиях. *Вопр. мед. химии*, 1987, № 3, с. 115-118. [Kostyuk V.A., Potapovich A.I. Determination of lipid peroxidation products using thiobarbituric acid under anaerobic conditions. *Questions of medical chemistry*, 1987, no. 3, pp. 115-118. (In Russ.)]
13. Максимов С.А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине. *Бюллетень сибирской медицины*, 2007, № 4, с. 80-85. [Maksimov S.A. Morphology of the solid phase of biological fluids as a diagnostic method in medicine. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2007, no. 4, pp. 80-85. (In Russ.)]
14. Камышников В.С., Киселев П.А., Кохнович Н.Н., Орешко Н.А., Юрага Т.М. Метаболические факторы формирования патологических состояний, связанных с нарушением антиоксидантного статуса организма: методы оценки. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*, 2014, № 3, с. 116-133. [Kamyshnikov V.S., Kiselev P.A., Kohnovich N.N., Oreshko N.A., Yuraga T.M. Metabolic factors in the formation of pathological conditions associated with a violation of the antioxidant status of the body: assessment methods. *Laboratory diagnostics. Eastern Europe*, 2014, no. 3, p. 116-133. (In Russ.)]

LASER ATOMIC EMISSION SPECTROMETRY, MORPHOSTRUCTURAL ANALYSIS OF DEHYDRATING DROPS OF BIOSFLUIDS AND OXIDATIVE STRESS IN PATIENTS WITH CHRONIC BRAIN ISHEMIA IN THE TREATMENT OF LASER IRRADIATION

Prokopenko T.A.¹, Nechipurenko N.I.¹, Pashkovskaya I.D.¹, Zajogin A.P.²

¹ Republican research and clinical center of neurology and neurosurgery

F. Skoriny str, 24, Minsk, 220114, Belarus; e-mail: tatiananovitskaya1108@mail.ru

² Belarusian State University

Nezavisimosti Ave., Minsk, 220030, Belarus

Abstract. In this work it was found that patients at the time of admission to the hospital have changes in the local spatial distribution of calcium and the morphological structure of dehydrating drops of biofluids, which are characterized by the appearance of wide, three-beam and tourniquet cracks in whole blood and a loss of plasma symmetry. An initially low superoxide dismutase activity was detected in the blood of patients, which normalized after a course of treatment with the inclusion of intravenous or supravenuous laser irradiation of blood in addition to standard therapy.

Key words: *laser atomic emission spectroscopy, dehydration of biofluid drops, morphological structure, chronic cerebral ischemia, oxidative stress, laser hemotherapy.*