

**ПАТОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ  
ЭНДОТОКСИКОЗА ПРИ СУБХРОНИЧЕСКОЙ  
ИНТОКСИКАЦИИ ДИХЛОРЭТАНОМ И ЕГО КОРРЕКЦИЯ  
НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ ЛАЗЕРНЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ**

**Д.А. Еникеев, Д.В. Срубиллин, В.А. Мышкин,  
Л.Т. Идрисова, И.Д. Исаков**

*ГОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет Росздрава»,  
г. Уфа, [rectorat@anrb.ru](mailto:rectorat@anrb.ru)*

Изучены интенсивность эндотоксикоза, свободнорадикального окисления и состояние мембран эритроцитов у крыс при субхронической интоксикации дихлорэтаном (ДХЭ) до и после коррекции низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ). При многократном введении ДХЭ активируется свободнорадикальное окисление на фоне дисбаланса антиокислительной системы, нарастает эндотоксикоз, нарушается структурная организация клеточных мембран. НИЛИ благоприятно влияет на состояние мембран и выраженность свободнорадикального окисления, что может быть связано с реактивацией антиоксидантных ферментов.

**Ключевые слова:** лазерное излучение, дихлорэтан, перекисное окисление, мембрана.

**PATHOPHYSIOLOGIC ASPECTS OF ENDOTOXICOSIS  
IN SUBCHRONICAL INTOXICATION WITH DICHLORETHANE  
AND ITS CORRECTION BY LOW INTENSIVE LASER  
RADIATION**

**D.A. Enikeyev, D.V. Srubilin, V.A. Myshkin,  
L.T. Idrisova, I.D. Isakov**

*Bashkirian State Medical University Ufa, Russia, [rectorat@anrb.ru](mailto:rectorat@anrb.ru)*

Intensity of endotoxiosis, free radical oxidation and erythrocyte membrane state in rats subchronically intoxicated with dichlorethane (DCE) before and after correction by low intensive laser radiation have been studied. With multiple administration of DCE, free radical oxidation is activated at the background of the oxidative system imbalance, endotoxiosis enhances, the structure of cellular membranes is damaged. The beneficial effects of low intensive laser radiation on the membrane state and marked free radical oxidation have been noted. This may be associated with reactivation of antioxidant enzymes.

**Key words:** laser radiation, dichlorethane, membrane, peroxidation.

Интоксикации дихлорэтаном (ДХЭ), который отличается высокой токсичностью и куммуляционной способностью, чаще всего встречаются на производстве, где растворитель находит широкое применение. При сохраняющейся высокой летальности от острых интоксикаций ДХЭ основную массу составляют отравления, наблюдаемые при длительном поступлении токсиканта в организм, когда явной клинической симптоматики может и не возникнуть.

Картина острых отравлений химической этиологии уже в ранние сроки формируется не только за счет высоких концентраций яда в крови, но и зависит от развития эндогенной интоксикации [4]. В то же время развитие эндотоксикоза при длительном поступлении яда в организм, патофизиологические изменения, нарушающие гомеостаз, происходящие в эти сроки, изучены далеко не полно. Одним из важных патогенетических факторов в данном аспекте является перекисное окисление липидов (ПОЛ) — универсальный механизм, регулирующий клеточные процессы как в норме, так и при патологии. В настоящее время ПОЛ рассматривается как весьма эффективный показатель изменения гомеостаза, позволяющий судить об интенсивности протекающих патологических процессах. В ряде исследований показана тесная взаимосвязь между прогрессированием синдрома эндогенной интоксикации и интенсификацией процессов ПОЛ, которые наряду с активацией мембранных фосфолипаз ведут к дестабилизации клеточной мембраны вследствие перестройки ее липидного бислоя. Состояние клеточных мембран может отражать степень эндотоксикоза как показатель суммар-

ного влияния всех мембраноповреждающих факторов на клетку. В работах многих авторов установлена тесная корреляция между изменениями свойств мембран эритроцитов и клеточных мембран внутренних органов. Поэтому можно использовать эритроцитарные мембраны в качестве естественной модели для исследования общих характеристик всех биологических мембран [7].

В рамках проблемы коррекции при хронической интоксикации ДХЭ остаются нерешенными научно-практические вопросы. Определенный интерес представляет метод лазерной терапии с использованием низкоэнергетических источников облучения. При исследовании механизмов биологического и терапевтического действия НИЛИ было показано нормализующее влияние его на ПОЛ [9]. В связи с этим целью исследования явилось изучение интенсивности эндотоксикоза, ПОЛ, антиоксидантной защиты и состояния мембран эритроцитов при субхронической интоксикации ДХЭ до и после коррекции лазерным излучением.

#### **Материалы и методы**

Эксперименты выполнены на 36 здоровых половозрелых неинбредных белых крысах-самцах массой 180-220 г, разделенных на 3 группы: 1-я — контрольная (n=11), 2-я — животные с моделированной интоксикацией дихлорэтаном (n=13), 3-я — животные, получавшие ДХЭ и НИЛИ (n=12). Эксперименты проводились в соответствии с требованиями приказов №1179 МЗ СССР от 10.10.83 г., №267 МЗ РФ от 19.06.03 г. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правила по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных».

Субхроническая интоксикация дихлорэтаном достигалась ежедневным энтеральным введением токсиканта в дозе 5 мг/кг (0,01 LD<sub>50</sub>) в течение 30 суток. Опытная группа крыс получала курс сочетанного воздействия импульсного НИЛИ с длиной волны 0,63 и 0,89 мкм. Использовался аппарат АЛТ «Матрикс» с зеркальной насадкой для воздействия в области печени контактной методикой (0,89 мкм, импульсная мощность — 7 Вт, частота — 80 Гц, доза — 0,01 Дж/см<sup>2</sup>) и акупунктурной насадкой для надвенозного облучения крови в области хвостовой вены (0,63 мкм, импульсная мощность 5 Вт, частота — 80 Гц, доза — 0,12 Дж/см<sup>2</sup>). Курс лазеротерапии начинали со 2-й недели и продолжали 14 дней. Объектом исследования служили эритроциты и плазма крови. Тестирование осуществляли на 30 сутки.

Состояние ПОЛ оценивали по концентрации диеновых конъюгатов (ДК) и малонового альдегида. Содержание диеновых конъюгатов определяли методом прямой спектрофотометрии. Принцип метода заключается в выделении нативных жирных кислот путем экстракции смесью равных объемов гептана и изопропанола с последующим измерением оптической плотности проб изопропаноловой фазы липидного экстракта. Поглощение при длине волны 232 нм отражает содержание диеновых конъюгатов [2]. Для определения малонового диальдегида (МДА) использовали метод М. Mihaга (1980), заключающийся в образовании окрашенного комплекса при взаимодействии продуктов ПОЛ с тиобарбитуровой кислотой, с помощью стандартного набора фирмы Агат-Мед (Россия). Одновременно с процес-

сами ПОЛ регистрировали активность ферментов каталазы [3], супероксиддисмутазы [5], глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [10]. Систему водорастворимых антиоксидантов оценивали, определяя содержание церулоплазмина в плазме крови, учитывая его способность окислять р-фенилендиамин с образованием окрашенного комплекса, а также определяя содержание восстановленного глутатиона в эритроцитах, учитывая его способность реагировать с избытком аллоксана с образованием соединения, имеющего максимум поглощения при длине волны 305 нм, применяя для этого методики, изложенные в руководствах по биохимическим методам исследования.

Состояние мембран эритроцитов оценивали по их стойкости к гемолитическому действию соляной кислоты. Для этого применяли метод кислотных эритрограмм, предложенный Н.Н. Гительзоном и И.А. Терсковым (1959).

Вычислялся индекс стойкости эритроцитов (I) по формуле:

$$\frac{\% \text{Э}_1 \times t_1 + \% \text{Э}_2 \times t_2 + \dots + \% \text{Э}_k \times t_k}{\% \text{Э}_{n1} \times t_{n1} + \% \text{Э}_{n2} \times t_{n2} + \dots + \% \text{Э}_{nk} \times t_{nk}}$$

где % Э<sub>n</sub> × t<sub>n</sub> — произведение процента гемолизированных эритроцитов данной группы на время гемолиза, определяющее стойкость этой группы в нормальной крови;

% Э × t — произведение процента гемолизированных эритроцитов данной группы на время гемолиза в исследуемой крови.

Для оценки интенсивности эндотоксикоза определяли содержание веществ низкой и средней молекулярной массы (ВНиСММ) в эритроцитах и плазме крови по методике, предложенной М.Я. Малаховой [6]. Регист-

стрировали спектральную характеристику водного раствора супернатанта при длинах волн от 238 до 306 нм. Расчет ВНиСММ проводили по формуле:  $V_{\text{НиСММ}} = (E_{238} + E_{242} + \dots + E_{306}) \times 4$  (усл. ед.)

Фракции фосфолипидов(ФЛ) получали методом тонкослойной хроматографии [8]. Количество отдельных фракций ФЛ определяли по содержанию липидного фосфора и выражали в процентах. Общие ФЛ вычисляли по сумме отдельных фракций.

Обработку полученных результатов проводили с применением методов вариационной статистики. В сравниваемых группах определяли средние величины (M), ошибку средних величин (m). Оценку достоверности проводили по критерию Стьюдента (t). Минимальный уровень достоверности верифицировали при  $p < 0,05$ . Математическую обработку выполняли на компьютере с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

### Результаты и обсуждение

Результаты наших исследований представлены в табл. 1, из которой видно,

что ДХЭ, введенный по указанной схеме, повышает активность свободнорадикального окисления, что подтверждается увеличением концентрации в эритроцитах продуктов ПОЛ—диеновых конъюгатов в 1,94 раза ( $p < 0,05$ ) и МДА в 2,03 раза ( $p < 0,05$ ) от нормальных показателей. Важную роль в регуляции процессов ПОЛ играют антиоксидантные ферменты, такие, как супероксиддисмутаза (СОД) и каталаза. СОД катализирует реакцию взаимодействия двух супероксидных радикалов, играющих важную роль в инициации свободнорадикального окисления, с образованием перекиси водорода и молекулярного кислорода. Проведенные исследования установили повышение активности СОД в эритроцитах на 28,1% ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о мобилизации защитно-приспособительных механизмов, связанных с избыточной продукцией супероксидного анион-радикала. Избыточная активность СОД ведет к повышенному образованию перекиси водорода. В свою очередь, перекись водорода может

**Таблица 1**

**Влияние НИЛИ на ПОЛ, на активность антиоксидательной системы и показатели эндогенной интоксикации в крови крыс при субхронической интоксикации дихлорэтаном (M±m)**

Показатель	Животные 1-й группы (n=6)	Животные 2-й группы (n=7)	Животные 3-й группы (n=6)
ДК, ( $\lambda=232\text{нм}$ ) усл. ед. на 1мл крови	1,8±0,16	3,5±0,19*	2,15±0,2 ^
ТБК-РП, мкмоль на литр	3,1±0,3	6,3±0,7*	4,8±0,5* ^
Каталаза, ммоль в мин на 1 мг гемоглобина	92,7±4,8	102,3±5,1	89,6±6,3
СОД, усл. ед. на 1 мг гемоглобина	1,9±0,09	2,43±0,13*	2,1±0,14 ^
ГбФДГ, нмоль в мин на 1мг гемоглобина	14,5±0,4	12,1±0,55*	15,7±0,43* ^
Глутатион восстановленный, мг%	78,3±5,1	60,1±7,3*	72,1±4,2
Церулоплазмин, мг%	16,2±2,1	29,7±2,8*	21,7±3,2 ^
ВНиСММ плазмы, усл.ед.	5,8±0,19	7,2±0,5*	6,1±0,4
ВНиСММ эритроцитов, усл.ед.	18,5±1,5	26,3±2,9*	19,7±2,1 ^

Примечание: \* — достоверно ( $p < 0,05$ ) по сравнению с первой (контрольной) группой; ^ — достоверно ( $p < 0,05$ ) 3-й группы по сравнению со 2-й группой

быть использована фагоцитами для синтеза гипохлорита либо диффундировать в клетки и разрушаться там каталазой и глутатионпероксидазой, либо в присутствии железа разрушаться с образованием гидроксильного радикала. При этом, по нашим данным, активность каталазы увеличивается незначительно, что может быть связано с повышенной концентрацией водородных ионов, приводящих к возникновению протонированной формы фермента, обладающего измененной каталитической активностью.

В проведенном исследовании установлено снижение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) на 16,6% ( $p < 0,05$ ), а также содержание восстановленного глутатиона на 23,2% ( $p < 0,05$ ). Глутатион участвует как в индуцированной глутатионпероксидазной реакции, так и в поддержании восстановленного состояния сульфгидрильных групп белковых молекул, редокс-статуса клетки в целом. Соотношение окисленных и восстановленных форм глутатионовой системы зависит от скорости реакции пентозного цикла, ключевым ферментом которого является Г6ФДГ. Выявленные изменения со стороны глутатион опосредованной детоксикации значительно снижают резистентность клеток к цитоповреждающему действию продуктов ПОЛ, свободных радикалов.

В системе неферментативного звена антиоксидантной защиты биологических молекул важная роль принадлежит церулоплазмину (ЦП), представляющему собой медьсодержащий гликопротеид  $\alpha_2$  глобулиновой фракции сыворотки крови, синтезируемый, главным образом, в печени. В результате проведенных исследований

установлено повышение содержания церулоплазмину на 83,3 % ( $p < 0,05$ ). Известно, что уровень ЦП возрастает при воспалительных процессах, что отражает его роль в организме в качестве белка острой фазы, и в значительной мере противовоспалительное действие его обусловлено антиоксидантными свойствами. ЦП обладает способностью к дисмутации супероксидных радикалов, а также окисляет  $Fe^{+2}$  до  $Fe^{+3}$  кислородов в плазме крови без образования свободных радикалов.

Таким образом, в ходе проведенных исследований при субхронической интоксикации ДХЭ выявлена активация свободнорадикального окисления на фоне дисбаланса антиоксидантной системы. В настоящее время признается, что именно ПОЛ по своей практической значимости и реакционной способности занимает важное место среди факторов продукционной эндогенной интоксикации. Проведенные исследования выявили увеличение содержания ВНиСММ в плазме крови и в эритроцитах к 30 суткам на 24,1 % ( $p < 0,05$ ) и на 42,2 % ( $p < 0,05$ ) соответственно. Умеренное повышение концентрации ВНиСММ в плазме и эритроцитах свидетельствует о компенсированной фазе интоксикации, при которой наблюдается увеличение сорбционной способности эритроцитов.

Повышенный фон перекисеобразования отрицательно воздействует на структурно-функциональную характеристику биологической мембраны. В настоящей работе определили стабильность клеток крови к действию водородных ионов. Известно, что при этом выявляются скрытые повреждения эритроцитарных мембран. Результа-

ты исследования свидетельствуют о том, что индекс стойкости, характеризующий суммарную резистентность эритроцитов, у крыс с интоксикацией ДХЭ снижался к 30 суткам до 0,74 усл.ед.

В стабилизации биомембран существенное место занимают фосфолипиды, которые сами по себе являются субстратами для свободнорадикального окисления. При интоксикации ДХЭ в эритроцитах уменьшается содержание общих фосфолипидов (ФЛ) на 23,2%( $p<0,05$ ). Анализ фосфолипидного состава, представленный в табл. 2, выявил снижение содержания легкоокисляемых фракций фосфатидилхолина (ФХ) и фосфатидилэтаноламина (ФЭА) на 15,5% ( $p<0,05$ ) и 22,4% ( $p<0,05$ ) соответственно. Одновременно отмечался рост относительного

содержания трудноокисляемой фракции сфингомиелина (СфМ) на 62,3% ( $p<0,05$ ) и увеличение содержания лизофосфатидилхолина (ЛФХ) на 70% ( $p<0,05$ ), разрыхляющих липидный слой мембран, увеличивая их проницаемость. Увеличению проницаемости также способствовало наблюдаемое снижение ФХ и ФЭА. В повреждении биомембран особая роль отводится ЛФХ, который является специфическим маркером фосфолипазной активности. При интоксикации ДХЭ активация фосфолипазного гидролиза наряду с активацией ПОЛ является дополнительным фактором модификации клеточных мембран, так как окисленные ФЛ легче поддаются атакам эндогенных фосфолипаз, что усиливает их мембранодеструктивное действие.

Таблица 2

**Фосфолипидный состав мембран эритроцитов у крыс при субхронической интоксикации дихлорэтаном и на фоне применения НИЛИ (M±m)**

Исследуемый показатель	Группы животных		
	1-я группа(n=5)	2-я группа(n=6)	3-я группа(n=6)
Общие ФЛ мг/100 мл эр. массы	234,5±9,8	180,1±11,2 *	207,5±8,5 * ^
Фракции ФЛ, %			
ЛФХ	6,4±0,62	10,88±0,79 *	8,3±0,85 * ^
ФХ	52,3±2,3	44,2±1,3 *	49,6±2,5 ^
ФЭА	26,1±1,2	20,25±1,4 *	23,2±1,6
СфМ	15,2±1,3	24,57±1,2 *	18,9±1,45 * ^

\* — различие достоверно ( $p<0,05$ ) по сравнению с 1-й группой (контроль); ^ — различие достоверно ( $p<0,05$ ) 3-й группы по сравнению со 2-й группой

На основании вышеизложенного можно заключить, что в патогенезе эндогенной интоксикации при субхроническом поступлении ДХЭ важная роль принадлежит мембранодеструктивным процессам. Нарушение структурно-функциональной организации

клеточных мембран изменяет внутриклеточный гомеостаз и определяет основные патофизиологические проявления эндотоксикоза.

Курсовое применение НИЛИ, проведенное у животных 3-й экспериментальной

группы, оказало антиоксидантный, противовоспалительный и мембраностабилизирующий эффекты. Уровень ДК уменьшился на 38,6% ( $p < 0,05$ ) и МДА на 23,8 % ( $p < 0,05$ ) по сравнению с данными 2-й группы, а активность каталазы и СОД приближалась к исходным значениям. Влияние лазерного излучения на ферментативную активность подтверждают данные литературы о возможных механизмах НИЛИ влиять на активность данных ферментов за счет депротонирования соответствующих гистидиновых остатков и последующего восстановления нативной структуры активного центра [1]. Важно отметить статистически достоверную тенденцию к нормализации содержания восстановленного глутатиона и активности Г6ФДГ после проведения курса НИЛИ. Г6ФДГ является ключевым ферментом пентозного цикла, в ходе которого генерируется НАДФН. Данное соединение предохраняет ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав клеточной мембраны, от аномальных взаимодействий с кислородом, поддерживает нормальную степень окисления атомов железа гемоглобина, является субстратом для глутатионредуктазы.

НИЛИ усиливает кислотную устойчивость эритроцитов к гемолитическому действию соляной кислоты. Индекс стойкости эритроцитов к 30 суткам повышался в 1,3 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с данными животных 2-й группы, приближаясь к контрольным значениям. НИЛИ изменяет липидный состав мембран эритроцитов. Это проявляется в том, что повышается содержание фосфолипидов, а количество отдельных фосфолипидных фракций приближается к исходному уровню. Уменьшение

содержания ЛФХ отражает существенное снижение процессов ПОЛ и, по всей видимости, активности фосфолипаза  $A_2$ . Уровень ФЭА выравнивался, относительное содержание ФХ приближалось к контрольным значениям, а именно, эти фракции ФЛ наиболее лабильные к фосфолипазному гидролизу.

### **Заключение**

Таким образом, применение НИЛИ при субхронической интоксикации ДХЭ, нормализуя баланс ПОЛ и антиоксидательной системы, способствует сохранению структуры и функции клеточных мембран и, в свою очередь, поддержанию приемлемого уровня естественных процессов в организме, включая дезинтоксикационные. Подобное обстоятельство можно объяснить необходимым уровнем запаса эндогенных (тканевых) антиоксидантов, реактивация которых оказывается достаточной для нормализации баланса про- и антиоксидательной активности.

### **Список литературы**

1. Владимиров Ю.А. Три гипотезы о механизме действия лазерного излучения на организм человека // Эфферентная медицина. — М.: Медицина, 1994. — С. 51–56.
2. Волчегорский И.А., Налимов А.Г., Яровинский Б.Г., Лифшиц Р.И. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропанольных экстрактах крови // Вопр. мед. химии. — 1989. — № 1. — С. 127–130.
3. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. — 1988. — № 1. — С. 16–18.

4. Лужников Е.А., Гольдфарб Ю.С., Марупов А.М. Эндотоксикоз при острых экзогенных отравлениях. — М.: БИНОМ, 2008. — 200 с.
5. Макаренко Е.В. Комплексное определение активности супероксиддисмутазы и глутатионредуктазы в эритроцитах у больных с хроническими заболеваниями печени // Лаб. дело. — 1988. — № 11. — С. 48–50.
6. Малахова М.Я. Методы регистрации эндогенной интоксикации. — СПб.: МАПО, 1995. — 32с.
7. Михайлович В.А., Марусанов В.Е., Бичун А.Б., Доманская И.А. Проницаемость эритроцитарных мембран и сорбционная способность эритроцитов — оптимальные критерии тяжести эндогенной интоксикации // Анестезиология и реаниматология. — 1993. — № 5. — С. 66–69.
8. Молочкина Е.М. Количественное определение состава фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии // Исследование синтетических и природных антиоксидантов in vitro и in vivo. — М.: Наука, 1992. — С.100 — 102.
9. Москвин С.В. Эффективность лазерной терапии. — М.: НПЛЦ «Техника», 2003. — 254 с
10. Glock G., MeLean P. Further studies on the properties and assay of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver // Biochem. — 1953. V.55, № 3. — P. 400–408.
-