УДК 612+57.042+57.043+574.24

Н.В. АКУЛИЧ, А.Н. ОСИПЕНКО,
А.А. МАРОЧКОВ, И.А. БОБЦОВА, А.В. МАРОЧКОВ

МЕХАНИЗМЫ ТЕРАПИИ ИШЕМИИ МИОКАРДА МЕТОДОМ ВЛОК

Проведена комплексная оценка влияния курсового применения внутрисосудистого лазерного облучения крови на эритроциты больных с ишемической болезнью сердца. Обнаружены изменения структурных параметров эритроцитов в сочетании с модификацией липидов мембран и обновлением клеточной популяции эритроцитов периферической крови.

Изучение механизмов восстановления перфузии тканей и, в первую очередь, миокарда при применении эфферентных методов лечения продолжает оставаться актуальным. Для достижения этой цели необходим более детальный анализ биохимической природы ишемии и технологий, позволяющих ее коррегировать. Так, показано, что при лонгитудинальной ишемии практически полностью утилизируются запасы макроэргических фосфатов, отмечается накопление протонов, двуокиси углерода, неорганических фосфатов и аденозина [1]. С другой стороны, одним из наиболее перспективных методов улучшения перфузии тканей является внутрисосудистое лазерное облучение крови (ВЛОК) [2]. Механизмы действия ВЛОК рассматриваются в пособиях и руководствах [1].

Несмотря на обширную литературу по этой проблеме, невыясненными остаются особенности эритроцитов в динамике курсового применения ВЛОК. В частности: необходимо проанализировать как количество

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова

эритроцитов, так и их структурно-функциональное состояние, а также необходимо уточнить состав липидов их мембран.

Объект и методы исследования. Основную группу составили 26 больных ишемической болезнью сердца (46.1±0.9 года), находившиеся на лечении в Могилевской областной больнице. Контрольную группу составили здоровые добровольцы мужского пола (19 человек, возраст 40.2±1.1 года).

Сеансы НИЛИ проводили в отделении детоксикации УЗ "Могилевская областная больница" методом внутрисосудистого лазерного облучения крови при помощи прибора лазерной терапии ОК-1. Время проведения процедуры – 40-45 минут, курс лечения состоял из 5 ежедневных сеансов. Первый сеанс начинался в понедельник в 9^{00}, а заканчивалось лечение в пятницу в 9^{45}.

Анализ эритроцитов осуществляли на проточном цитофлуориметре Cell Lab Quanta SC, Beckman Coulter (США) и микроскопе проходящего света (Axio Imager A1, Германия), объектив Plan-Neofluar 100×1.3 Oil с видеокамерой "AxioCam MrC5" (Германия) при помощи программы "Диаморф-ЦИТО" (Россия). Морфологический анализ эритроцитов осуществляли с использованием DIC-призм в препаратах, приготовленных по методу "влажной капли". При микрокопировании анализировались следующие показатели размеров эритроцитов – структурные (площадь, объем), а также характеристики тора – периферическая зона эритроцита, пэллора – центральная зона эритроцита, объем и площадь поверхности эритроцита. Оптические и морфологические параметры рассчитывались при помощи построения "оптического профиля" на гистограмме распределения изображения оптической плотности красных кровяных телец.

Анализ состава жирных кислот эритроцитарной массы проводили методом высокоэффективной капиллярной газо-жидкостной хроматографии. Для этого проводилось газохроматографическое разделение жирных кислот, выделенных из фракции эфиров со спиртами холестерина и глицерина. Количественная оценка содержания отдельных жирных кислот производилась в процентном отношении к их общей сумме. Измерения проводились на газовых хроматографах ГХ–1000, ЦВЕТ–800, ГАЛС (Россия) с пламенно-ионизационными детекторами. Приборы проходили поверку в РУП "Центр стандартизации и метрологии".

Для регистрации ИК-спектров образцы полученной крови в равных объемах помещались в оптически прозрачные кюветы, изготовленные из кристаллов KRS. Спектры пропускания регистрировали на Фурье-спектрометре ИнфраЛЮМ ФТ-02 при ширине спектральной щели 4 $см^{-1}$. Анализ pH, газов крови, концентрации метаболитов и оксиметрии, фракций гемоглобина, проводили на газоанализаторе ABL 800.

Статистический анализ состоял из методов описательной статистики, непараметрических методов анализа. Изменения считались значимыми при $p<0.05$. Все статистические методики реализованы с помощью программы Statistica (StatSoft, США).

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова

Результаты и обсуждение.

До лечения у всех пациентов с ИБС выявлена тенденция к ацидозу, уровень pH составлял 7.34±0.13, 7.33±0.16 и 7.36±0.11, перед 1, 3 и 5 сеансами соответственно (рис. 1). После каждого из сеансов отмечалась нормализация кислотно-щелочного состояния, причем рост pH сопровождался снижением pCO_2 и увеличением концентрации бикарбонатов. В работе [2] при транскутанном облучении белых крыс без признаков патологии гелий-неоновым лазером 633 нм отмечено снижение pH и снижение сродства гемоглобина к кислороду, что может свидетельствовать о различных механизмах воздействия ВЛОК при ИБС и при ее отсутствии.

Насыщение гемоглобина кислородом (sO^2) в результате проведения сеансов ВЛОК достоверно увеличивалось ($p<0.04$, здесь и далее тест Wald-Wolfowitz) после каждого сеанса, причем уже до пятого сеанса этот параметр был равен 74%, в то время как до лечения и до 3 сеанса уровень sO^2 составлял 55% и 44% соответственно (см. рис. 1).

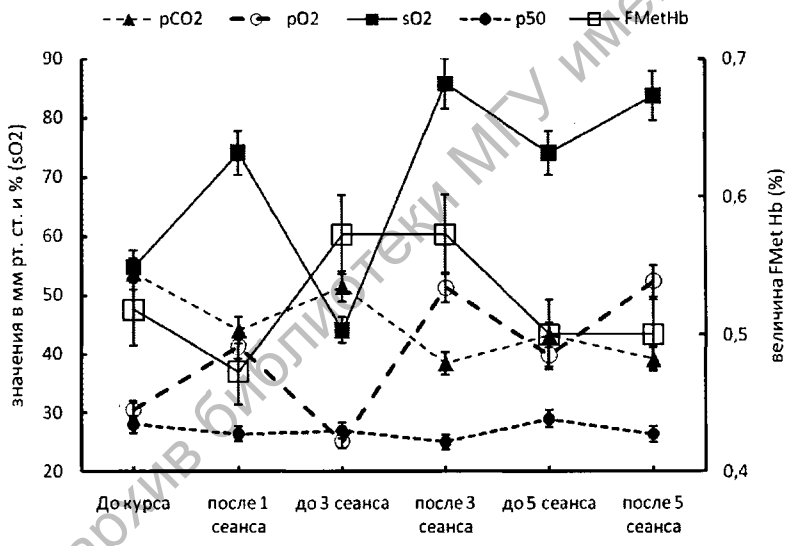

Рисунок 1. Оксиметрия и pH венозной крови при проведении сеансов ВЛОК

Поскольку показатель sO^2 адекватен для оценки при отсутствии в крови дисгемоглобинов (у нас отмечалось наличие метгемоглобина на протяжении всего курса), то для оценки состояния системы крови мы оценивали фракцию оксигемоглобина (FO^2Hb). Ее прирост составил 50%, 73% и 20% ($p<0.05$), соответственно, причем уже до 5 сеанса FO^2Hb на 20% превышал исходный уровень фракции оксигемоглобина. Снижение концентрации метгемоглобина свидетельствует о восстановлении ферментативной системы, участвующей в конверсии FMet в FO^2Hb. Фракция карбоксигемоглобина в общем гемоглобине, наряду со снижением фракции дезоксигемоглобина в общем гемоглобине ($p<0.03$), увеличива-

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова

лась после каждого сеанса в сочетании со снижением концентрации лактата ($p<0.04$) до величин нормы.

Показатель p_{50}, характеризующий аффинитет гемоглобин-кислород и отражающий положение кривой сатурации гемоглобина, после сеансов ВЛОК снижался на 10%, причем после 3 сеанса изменения были достоверны ($p<0.03$). Сдвиг кривой сатурации влево (снижение величины p_{50}) указывает на увеличение сродства гемоглобина к кислороду, и свидетельствует о прекращении ишемии тканей.

При использовании в терапии НИЛИ средний объем эритроцитов у больных ИБС сохранялся повышенным на протяжении всего периода наблюдения. Значение моды объема эритроцитов имело сходную тенденцию, статистически достоверных изменений выявлено не было (рис. 2).

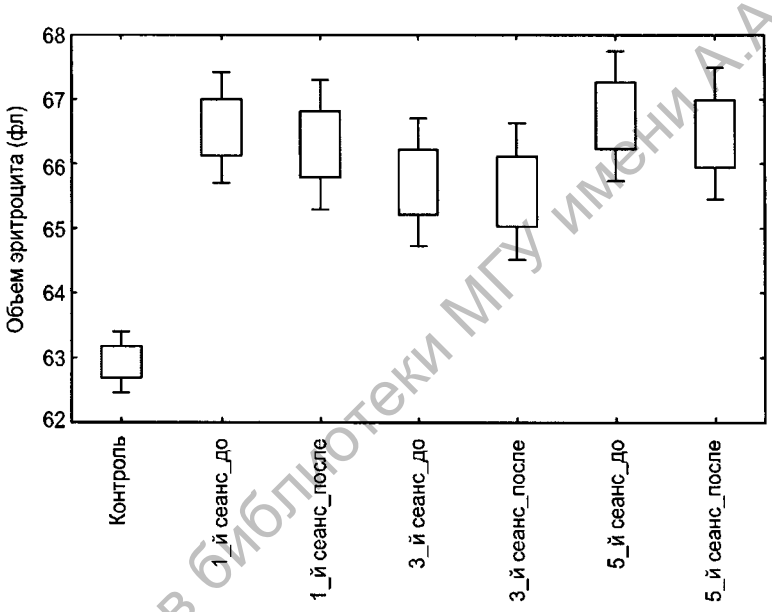

Рисунок 2. Объем эритроцитов при проведении сеансов ВЛОК

Также сохранялся анизоцитоз ($p<0.05$). Последний параметр определялся исходя из величины ширины полувысоты гистограммы распределения объема эритроцитов. Таким образом, терапия ВЛОК не привела к нормализации объема эритроцитов, и их объем был выше ($p>0.05$) по сравнению с группой контроля.

Анализ мазков крови представленных образцов (более 300 эритроцитов с одного препарата) не выявил появления патологических форм эритроцитов у больных ишемической болезнью сердца при применении ВЛОК.

На следующем этапе был проведен морфоденситометрический анализ красных кровяных телец. В каждой пробе анализировали не менее 100 клеток (рис. 3).

Среднее значение бокового светорассеяния увеличивалось после каждого сеанса ($p<0.05$).

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова

До проведенного сеанса диаметр пэллора составлял 2.44±0.39 μm, а после проведения сеанса – 3.83±0.43 μm. После проведенного лечения диаметр пэллора вырос до 4.11±0.22 μm. Диаметр пэллора тесно (-0.89, $p<0.04$) коррелировал с толщиной пэллора эритроцитов.

Проведенный биохимический анализ венозной крови больных с ИБС показал, что ВЛОК вызывает снижение уровня триглицеридов и других липидов, что подтверждает наше предположение об уменьшении скорости липолиза и высвобождения СЖК.

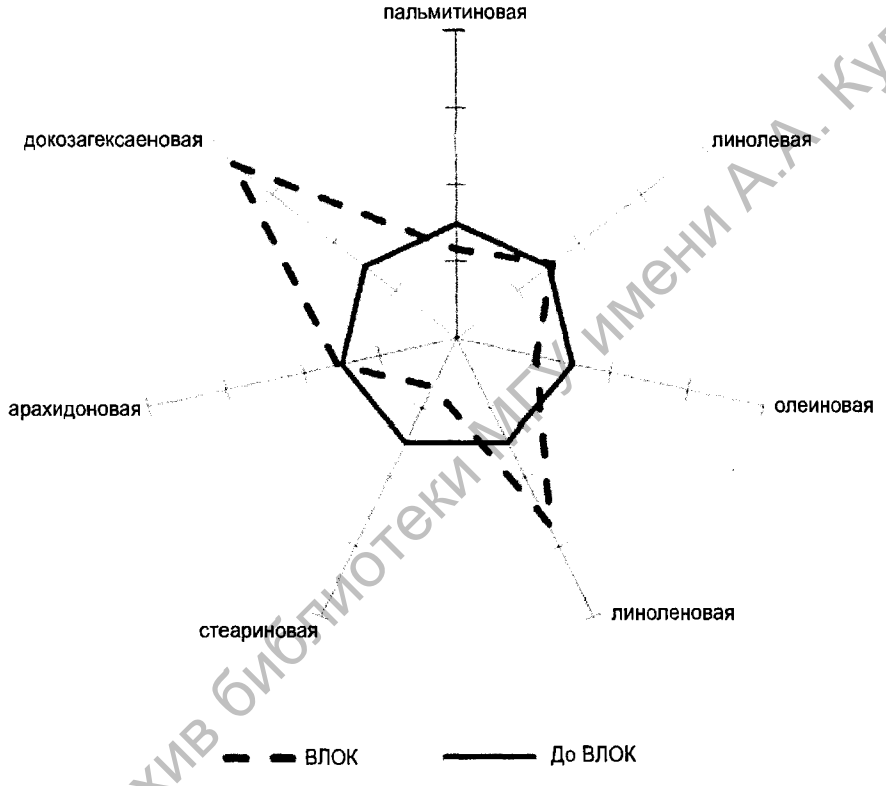

Рисунок 5. Состав жирных кислот эритроцитарной массы после сеанса внутрисосудистого лазерного облучения крови

Анализ состава жирных кислот эритроцитарной массы показал, что под действием ВЛОК в составе липидных компонентов эритроцитов происходит рост относительного содержания докозагексаеновой (ДГК) полиненасыщенной жирной кислоты (рис. 5). Так, после 1-го сеанса ВЛОК концентрация этой кислоты жирного ряда увеличивалась с 4,69±0,83% до 4,93±0,89%. Кроме того, после повторных сеансов лазерной терапии отмечалось некоторое накопление ДГК. Данный факт заслуживает особого внимания, поскольку ДГК является ω-3 жирной кислотой, а значит, даже при относительно невысоком ее содержании в клеточных мембранах, она выполняет ряд важных функций, таких, как регуляция процессов, вызванных запуском арахидонового каскада.

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова

Площадь поверхности эритроцитов (S RBC) увеличивалась ($p<0.05$) после каждого сеанса (рис. 4), а после четырех проведенных сеансов площадь поверхности эритроцитов была, как и в случае параметра бокового светорассеивания выше исходного уровня как до, так и после сеанса.

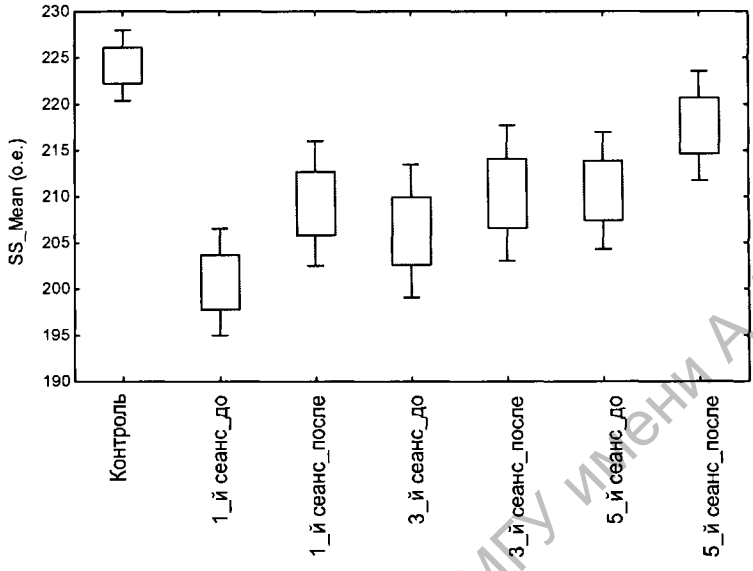

Рисунок 3. Боковое светорассеивание при проведении сеансов ВЛОК

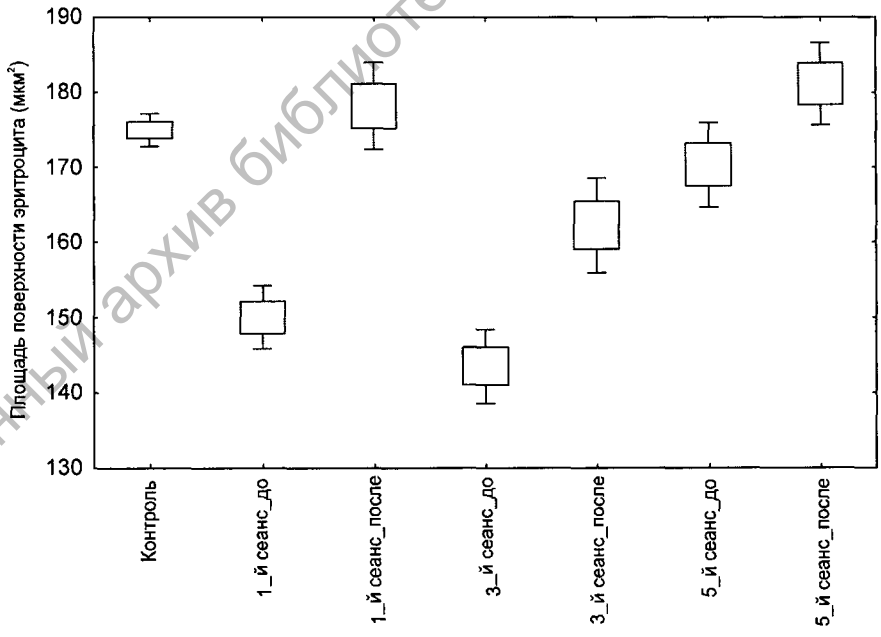

Рисунок 4. Площадь поверхности эритроцитов при проведении сеансов ВЛОК

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова

Еще одним важным моментом в аспекте пространственной организации эритроцита является то, что ДГК, содержащая в своей структуре 6 двойных связей, вызывает значительное возмущение липидного бислоя. При этом длина такой молекулы уменьшается, а занимаемый ею объем возрастает, тем самым «преодолевается» избыточная плотность упаковки углеводородных цепей, составляющих основу плазматической мембраны эритроцита [3].

В ИК-спектрах биомолекул крови до облучения НИЛИ доминируют полосы пропускания, характерные для полипептидов с большим количеством аминокислотных остатков. В инфракрасных спектрах крови наиболее интенсивные полосы пропускания характерны для колебаний CH_2, O–P (1170 $см^{-1}$) – фосфолипидов, CN, NH (1311 $см^{-1}$) – полипептидов, COO (1430–1380 $см^{-1}$) – аминокислот, CH, CH_2, CH_3 (1480–1430 $см^{-1}$) – жирных кислот, фосфолипидов и триглицеридов, NH (1600–1480 $см^{-1}$), C=O (1720–1600 $см^{-1}$) – спиралей белковых молекул.

При анализе положения максимумов поглощения необлученной крови были выявлены изменения в ИК-спектрах крови пациентов с ИБС относительно – здоровых доноров, указывающие на изменение пространственной структуры белков цельной крови.

Наиболее интенсивно выраженные изменения в ИК-спектрах наблюдаются в области от 1200 до 1050 $см^{-1}$, где основной вклад имеют симметричные и асимметричные колебания –O–P=O фосфолипидов, фосфорилированных белков, колебания –C–OH– группы жирных кислот, а также колебания –C–O– групп углеводов. Сделано предположение, что данные полосы пропускания могут быть специфическими биомаркерами в диагностике ИБС.

После облучения лазером спектры крови здоровых доноров характеризовались стабильным положением основных полос пропускания.

В ИК-спектрах крови пациентов с ИБС после облучения лазером наблюдается уменьшение интенсивности дуплетной полосы амид I (1654 $см^{-1}$) и амид II (1540 $см^{-1}$). Зафиксированы изменения в ИК-спектрах в диапазоне волн 1470–1180 $см^{-1}$ (рис. 6, 7), которые можно объяснить качественными и количественными изменениями определенных макромолекул, входящих в состав цельной крови, в основном фосфолипидов, протеинов, глюкозы, холестерина.

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова

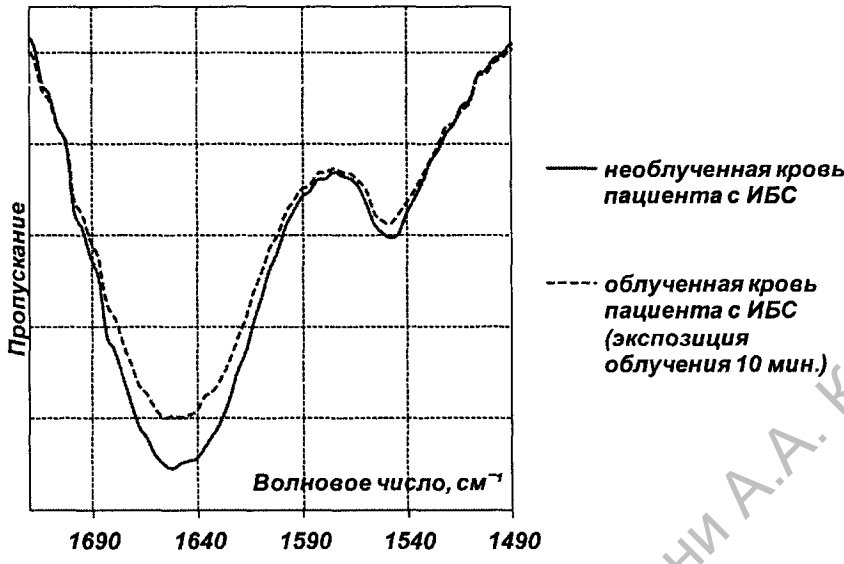

Рисунок 6. ИК-спектры крови пациентов с ИБС (диапазон 1700–1470 см$^{-1}$)

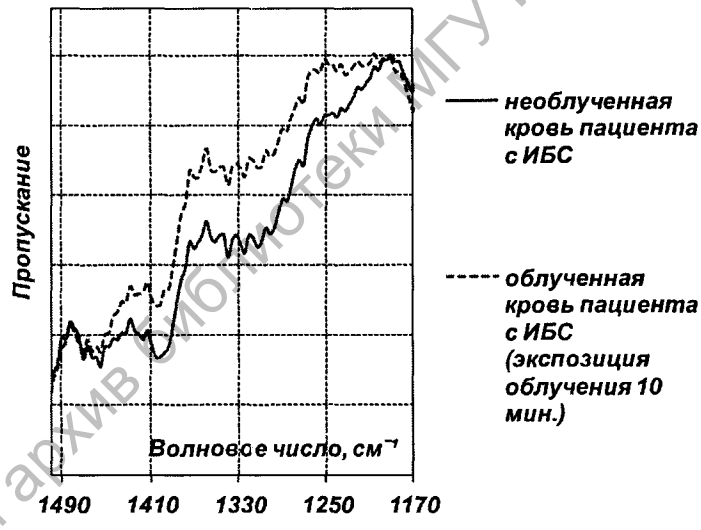

Рисунок 7. ИК-спектры крови пациентов с ИБС (диапазон 1470–1180 см$^{-1}$)

Заключение

Принято считать, что поглощение света при сеансах ВЛОК приводит к активации порфирин-содержащих соединений, транспорта электронов в митохондриях, вызывает фотовозбуждение молекулярного кислорода, оказывает неспецифическое влияние на структуру воды, вызывает изменение пространственной структуры и функциональной активности биомолекул [1, 2, 4–6].

В ходе проведенного нами исследования установлено, что для ишемической болезни сердца характерен макро- и анизоцитоз эритроцитов. Крас-

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова

ные кровяные тельца (во всяком случае часть из них) – функционально неполноценные эритроциты, имеют морфо-функциональные, биохимические отличия, различаются по характеристикам ИК-спектров. Сеансы НИЛИ, по нашему мнению, вызывают секвестрацию и разрушение патологически измененных и деформированных НИЛИ клеток в селезенке.

При адекватном снабжении сердца кислородом свободные жирные кислоты (СЖК) представляют собой один из основных источников энергии для здорового сердца, причем вклад окисления глюкозы и лактата менее значителен. Это позволяет сердечной мышце производить молекул АТФ на один атом углерода окисляемого субстрата больше, чем при окислении глюкозы. Однако при окислении глюкозы необходимость в кислороде при производстве такого же количества молекул АТФ существенно ниже, чем при обмене СЖК. Кроме того, окисление жирных кислот метаболически связано с неэффективными в плане расходования АТФ процессами, такими, как синтез триглицеридов. Следует учесть и процессы подавления транспорта АТФ из митохондрий в цитозоль, инициируемые повышением концентрации ацил-КоА в митохондриях вследствие снижения поступления кислорода и перегруженности внутримитохондриального пространства неокисленными СЖК. Но при ишемии миокарда большая часть энергии продолжает вырабатываться за счет СЖК, несмотря на высокий уровень лактата. Следовательно, средства ингибирующие липолиз и высвобождение СЖК, их транспорт и окисление, а так же активирующие окисление глюкозы, можно использовать для оптимизации продукции АТФ в условиях снижения концентрации доступного кислорода [3].

Поскольку уровень pO_2 на протяжении всего периода лечения был ниже нормы, а в крови зафиксирован рост концентрации лактата в пределах 20–40% ($p<0,05$) перед проведением сеанса ВЛОК, то такое состояние соответствует гемической гипоксии. Она сопровождает весь курс лечения и является возмущающим сигналом, приводящим к восстановлению гомеостазиса у пациентов с ИБС за счет стимуляции эритропоэза. Таким образом, основной биохимический механизм терапии заключается в ингибировании окисления СЖК и переключении метаболизма на аэробное окисление глюкозы. Средством, позволяющим повысить общую кислородную емкость крови, вероятно, является обновление клеточной популяции.

Для обновленной популяции эритроцитов характерно повышенное содержание докозагексаеновой полиненасыщенной жирной кислоты, кумулятивный рост которой увеличивался от сеанса к сеансу.

Таким образом, вызванный курсовым применением ВЛОК рост площади поверхности эритроцитов без изменения их объема является результатом обновления клеточной популяции.

Методом ИК-спектроскопии установлено, что при ишемии миокарда происходит изменение пространственной структуры белков цельной крови, что может служить причиной их способности реагировать на низкоинтенсивное облучение лазерным излучением. Клетки крови здоровых

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова

доноров, имеющие другую структуру белковых молекул, не поглощают энергию НИЛИ, и она рассеивается.

На основании полученных экспериментальных данных нет оснований утверждать, что энергия квантов красного излучения приводит к разрушению (ионизации) биомолекул. С равной степенью вероятности НИЛИ приводит к их переходу в возбужденное состояние, и поглощенная энергия используется молекулами клеток, которым она необходима для осуществления нормального внутриклеточного метаболизма.

Выводы.

1. Курсовое применение ВЛОК у больных ишемической болезнью приводит к обновлению клеточной популяции эритроцитов периферической крови.

2. Внутрисосудистое лазерное облучение крови приводит к включению компенсаторных механизмов, ключевым звеном которых является эритрон; у большинства клеток эритроцитарного пула после сеансов ВЛОК увеличивается площадь поверхности, а рост концентрации полиненасыщенной докозагексаеновой кислоты приводит к возрастанию деформационной способности красных кровяных телец.

Исследование проведено при финансовой поддержке Могилевского областного исполнительного комитета. Выражаем благодарность персоналу отделения детоксикации Могилевской областной больницы за помощь в проведении исследования.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. ***Пономаренко, Г.Н.*** Биофизические основы физиотерапии : учебное пособие / Г.Н. Пономаренко, И.И. Турковский. – М. : ОАО "Издательство «Медицина»", 2006. – 176 с.
2. ***Васильев, А.П.*** Эффективность лазеротерапии больных ишемической болезнью сердца / А.П. Васильев, Н.Н. Стрельцова, Ю.Н. Сенаторов // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2003. – № 4. – С. 10–12.
3. ***Болдырев, А.А.*** Биомембранология : учебное пособие / А.А. Болдырев, Е.И. Кяйвяряйнен, В.А. Илюха. – Петрозаводск : Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.
4. ***Марочков, А.В.*** Внутрисосудистое лазерное облучение крови, механизмы взаимодействия и клиническое применение / А.В. Марочков. – Минск, 1996. – 88 с.
5. ***Москвин, С.В.*** Основы лазерной терапии / С.В. Москвин, В.А. Буйлин. – Тверь : ООО "Издательство «Триада»", 2006. – 256 с.
6. Внутрисосудистое лазерное облучение крови вызывает изменение структурных параметров эритроцитов больных с ишемической болезнью сердца / Н.В. Акулич [и др.] // Журнал ГГМУ. – 2009. – № 1. – С. 98–102.

Поступила в редакцию 06.02.2014 г.

Электронный архив библиотеки МГУ имени А.А. Кулешова