

К МЕХАНИЗМУ МОДУЛИРУЮЩЕГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ЛАЗЕРНОЙ ТЕРАПИИ НА МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ С АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ

Скупневский С.В., Бурдули Н.М., Пухаева Е.Г., Аликова С.К., Бадтиев А.К.,
Руруа Ф.К., Батагова Ф.Э., Фарниева Ж.Г., Тадтаева Д.Я., Ранюк Л.Г.

Институт биомедицинских исследований – филиал ФГБУН Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», Владикавказ, e-mail: medgenetika435@yandex.ru

Начиная с классических работ R. Bing, проблемы взаимосвязи метаболизма митохондрий и сердечно-сосудистых патологий остаются в фокусе современной мировой науки. К числу эффективных и безопасных методов профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) относится лазерная терапия, дальнейшее широкое внедрение которой в современную клинику возможно за счет всестороннего изучения механизмов и эффектов воздействия когерентного излучения на основные структуры клетки, к числу которых принадлежат энергопродуцирующие органеллы – митохондрии. Целью работы являлось изучение механизмов воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 525 нм на метаболическую активность митохондрий лимфоцитов у пациентов с артериальной гипертензией (АГ) в динамике. Согласно результатам исследований, одной из основных мишеней воздействия лазерного излучения выступает ключевой фермент дыхательной цепи – сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Экспериментально доказано, что каждый из сеансов внутрисосудистого лазерного освечивания крови (ВЛОК) сопровождается повышением общей оксигеназной активности митохондрий (до 84%), а длительность эффекта сохраняется не менее 6 месяцев. На основе данных проведенного исследования можно сделать заключение о направленности воздействия лазерного облучения на нормализацию клеточного дыхания и компенсацию энергетического дефицита, сопровождающего патологический процесс, имеющий в основе нарушения работы сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: артериальная гипертензия, внутривенное лазерное освечивание крови, лазерная терапия, митохондрии, сердечно-сосудистые заболевания, сукцинатдегидрогеназа.

TO THE MECHANISM OF THE LASER THERAPY MODULATING EFFECT ON METABOLIC ACTIVITY OF LYMPHOCYTE'S MITOCHONDRIA IN PATIENTS WITH ARTERIAL HYPERTENSION

Skupnevskiy S.V., Burduli N.M., Pukhaeva E.G., Alikova S.K., Badtiev A.K.,
Rurua F.K., Batagova F.E., Farnieva Z.G., Tadtaeva D.Y., Ranyuk L.G.

Institute of Biomedical Investigations – the Affiliate of Vladikavkaz Scientific Centre of RAS, Vladikavkaz, e-mail: medgenetika435@yandex.ru

Since the classic works of R. Bing, the problems of the relationship between mitochondrial metabolism and cardiovascular pathologies remain in the focus of modern world science. Among the effective and safe methods of prevention and treatment of cardiovascular diseases is laser therapy, the further widespread introduction of which in the modern clinic is possible due to a comprehensive study of the mechanisms and effects of coherent radiation on the main structures of the cell, which include energy-producing organelles – mitochondria. The aim of the work was to study the mechanisms of low-intensity laser radiation with a wavelength of 525 nm on the metabolic activity of mitochondria of lymphocytes in patients with arterial hypertension in dynamics. According to the results of studies, one of the main target of laser radiation exposure is a key enzyme of the respiratory chain – succinate dehydrogenase. It is experimentally proved that each of the sessions of intravascular laser blood illumination is accompanied by an increase in the total oxygenase activity of mitochondria (up to 84%), and the duration of the effect is maintained for at least 6 months. Based on the data of the study, it can be concluded that the direction of the laser irradiation effect on the normalization of cellular respiration and compensation for the energy deficit accompanying the pathological process, which is based on disorders of the cardiovascular system.

Keywords: arterial hypertension, cardiovascular diseases, intravascular laser blood irradiation, laser therapy, mitochondria, succinate dehydrogenase.

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения [1] и статистическим отчетам ведущих стран мира [2, 3], основной причиной смертности во всем мире продолжают оставаться сердечно-сосудистые заболевания. Высокий уровень смертности и низкая прогнозируемая продолжительность жизни, отмеченные для Российской Федерации, обусловлены болезнями системы кровообращения, которые у трудоспособного населения в 3–6 раз выше в сравнении с жителями стран ЕС [4]. При этом опыт экономически развитых стран свидетельствует о возможности снижения смертности от ССЗ в 2 раза и более путем реализации лечебно-профилактических мероприятий [5]. К их числу следует отнести высокоэффективные и безопасные методы, основанные на применении низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ). Для более успешного клинического использования лазерной терапии необходимым является научное обоснование механизмов, лежащих в основе взаимодействия когерентного излучения и биологических структур организма.

Цель работы – изучение механизмов воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения на метаболическую активность митохондрий лимфоцитов у пациентов с артериальной гипертензией в динамике.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования послужила кровь больных с I–II стадией гипертонической болезни, находящихся на лечении в ГБУЗ РКБСМП РСО-А. Средний возраст больных составил $43,2 \pm 6,6$ года. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями Всероссийского научного общества кардиологов от 2009 г. Диагноз выставлялся больным при наличии основного признака – артериальная гипертензия $\geq 140/90$ мм рт. ст. и сопутствующих дополнительных диагностических признаков, способствующих нарушению состояния сосудистого русла: повышение уровня триглицеридов $\geq 1,7$ ммоль/л, снижение уровня холестерина липопротеинов высокой плотности $< 1,0$ ммоль/л у мужчин, $< 1,2$ ммоль/л у женщин; повышение уровня холестерина липопротеинов низкой плотности $> 3,0$ ммоль/л. Схема лечения пациентов включала сочетание стандартной медикаментозной терапии (антигипертензивные препараты) и физиотерапевтических процедур внутривенного лазерного освечивания крови. Длина волны излучения составляла 525 нм, что соответствует зеленому спектру, мощность – 1,5–2,0 мВт, продолжительность воздействия – 10 мин. Курс состоял из 10 сеансов, по 1 ежедневно. Кровь из локтевой вены отбирали дважды: до процедуры лазерного освечивания и через 15 мин после НИЛИ-терапии. Биоэнергетические функции митохондрий оценивали до освечивания крови и после первого, пятого и десятого сеансов. Для контроля эффективности лечения кровь отбирали через 1 месяц и через 6 месяцев после последнего сеанса освечивания. Контрольную группу обследованных составили 28 условно здоровых доноров в возрастных рамках, соответствующих экспериментальным. Забор крови в данной группе осуществляли в период ведения больных.

Мазки крови готовили при помощи аппарата Microscopy Vision (Австрия), предварительно обезжирив стекла смесью Никифорова. Стекла высушивали на воздухе в течение 30 мин. Препараты фиксировали при комнатной температуре забуференным (10 мМ HEPES) 60%-ным раствором ацетона (рН 5,2–5,4) на бидистиллированной воде. После ополаскивания дистиллированной водой мазки высушивали 30 мин.

С целью определения оксигеназной активности митохондрий осуществляли реакцию восстановления нитросинего тетразолия (НСТ) в цитобioхимической среде с использованием добавок янтарной кислоты на фоне основного состава среды инкубации. Основной состав среды инкубации содержал: KCl – 125 мМ, HEPES – 10 мМ, НСТ – 1 мг/мл, рН – 7,2±0,01 [6]. Нами поставлены следующие пробы.

1. Восстановление НСТ за счет эндогенных субстратов (ЭС) – осуществляли в цитобioхимической среде инкубации основного состава (проба ЭС показывает интенсивность восстановления НСТ эндогенными субстратами).

2. Восстановление НСТ в присутствии янтарной кислоты – основная среда инкубации + 5 мМ янтарной кислоты (проба СДГ показывает величину общей активности ключевого дыхательного фермента).

В приготовленную среду опускали готовые мазки. Окрашивание проводили в водяном термостате 1ТЖ-0-03 в течение 1 ч при температуре 37°C.

По окончании инкубации мазки ополаскивали дистиллированной водой и высушивали при комнатной температуре в течение 20 мин. Ядра клеток окрашивали 0,05%-ным раствором водного нейтрального красного в течение 8 мин. После 5–10 с промывания в дистиллированной воде и высушивания на воздухе мазки микроскопировали. Клетки фотографировали и обрабатывали в программе Blood Runner и Bio Images (г. Пушкино), используя микроскоп «Микромед-2» (Россия) при увеличении 10 x 100 и цифровую камеру Tour Cam 9.0 MP (Китай).

На каждой мазке пациента анализировали по 100 лимфоцитов, рандомизированно отбираемых из трех зон стекла: начальной, средней и финишной. Интенсивность восстановления НСТ рассчитывали в соответствии с принципом работы программы, основанным на обсчете площадных характеристик клеток и их компарментов, сканирования гранул на разных уровнях плотности, что позволяет выявить интенсивность отложения формазана, вычислить количество образуемого маркера дыхательной активности митохондрий – диформазана. Поскольку для каждой пробы компьютеризированному анализу подлежали от 100–350 до 600–700 (в зависимости от активности дыхательной цепи) окрашенных объектов на 1 лимфоцит, и учитывая, что обсчету подлежат 100 клеток в мазке, можно заключить, что метод обладает высокой статистической достоверностью каждого

описываемого параметра (99,9%; при $p \leq 0,001$) [7]. Рассчитывали среднюю величину (M) и стандартную ошибку среднего ($\pm m$). Статистическую обработку результатов осуществляли по критерию Стьюдента в программе Microsoft Excel.

Результаты исследований и их обсуждение

Динамика изменений общей окислительной метаболической активности митохондрий лимфоцитов здоровых доноров и пациентов с АГ в условиях терапии представлена на рисунке 1.

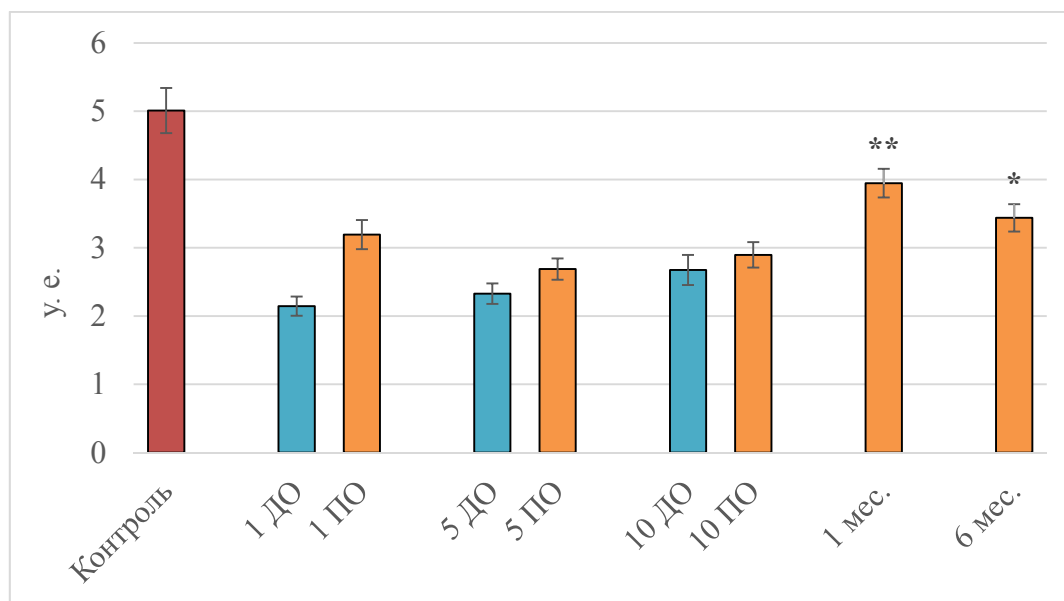


Рис. 1. Результаты изучения воздействия НИЛИ на суммарную дыхательную активность митохондрий у больных с гипертонией

Примечание: 1 ДО, 5 ДО, 10 ДО – 1-й, 5-й и 10-й сеансы до лазерного облучения крови; 1 ПО, 5 ПО, 10 ПО – 1-й, 5-й и 10-й сеансы через 15 мин после процедуры лазерного облучения; 1 и 6 месяцев – соответствующие периоды ремиссии с момента последней процедуры; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ относительно «1 ДО»

Биохимические изменения общей активности дегидрогеназ в клетках обследованных больных гипертонией по сравнению с контрольными показателями изменяются в сторону снижения интенсивности энергетической функции и составляют 42,7% от контроля. Через 15 мин после первого сеанса НИЛИ общая активность пула дегидрогеназ возросла на 49% относительно значений, отмеченных до начала процедуры. Важно подчеркнуть, что каждая процедура ВЛОК сопровождается активацией метаболической активности митохондрий, максимальная степень которой выражена в первый сеанс (отмеченные выше 49%), и сохраняется на уровне 8–15% в течение последующих освечиваний. При этом общая энергопродукция клеток постоянно повышается и достигает наивысшего значения через 1 месяц после проведенного десятидневного курса терапии. К этому времени исходный базовый уровень оксигеназной активности митохондрий оказывается повышенным на 84%. Выявленный эффект носит длительный характер, и по истечении полугода значения

суммарной дыхательной активности клеток превышают таковые до начала проведения внутрисосудистого освечивания на 60%. Тем не менее, как видно из графика, достичь значений, характерных для условно здоровых доноров, одним курсом (10 процедур) лазерной терапии не удастся. Разница между экстремумом для пролеченных пациентов и величиной, характеризующей уровень активности здоровых людей, составляет 21%, что на фоне исходной разницы в 57% свидетельствует о выраженном корригирующем действии когерентного излучения, направленном на восполнение дефицита энергии в организме.

Более детальное изучение молекулярных механизмов выявленного модифицирующего действия электромагнитного излучения видимой части спектра на энергопродукцию клетки представлено на рисунке 2.

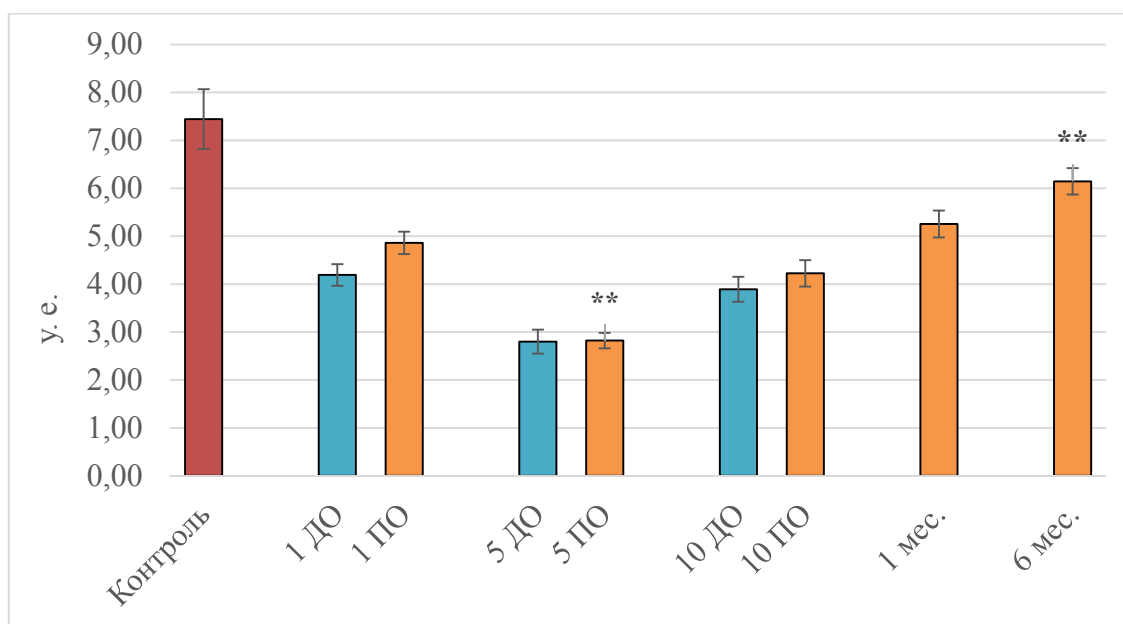


Рис. 2. Изменение активности сукцинатдегидрогеназы у больных АГ в процессе лазерной терапии и на стадии ремиссии заболевания (обозначения см. рис. 1)

Из рисунка 2 видно, что первый сеанс освечивания является самым эффективным и приводит к повышению активности ключевого фермента дыхания (СДГ) на 15%. Последующие процедуры – пятая и десятая – также активируют деятельность дыхательного комплекса II на 0,7% и 9% соответственно относительно значений, полученных до начала НИЛИ. Эффект лазерной реактивации сукцинат-убихинон-оксидоредуктазы сохраняется длительно и после окончания терапевтического курса: через 1 месяц активность СДГ превышает исходные базовые показатели на 25%, через полгода – на 46%. При этом, как и в случае общей оксигеназной реактивации, уровень значений условно здоровых доноров не достигается. Если сравнивать исходное расхождение в активности (контроль и 1 ДО), равное 44%, и полученное значение по истечении полугодия (контроль и 6 месяцев), равное 17%, то становится очевидным один из механизмов терапевтического действия лазерного облучения

крови: увеличение скорости катаболизма в цикле трикарбоновых кислот митохондрий и, как следствие, продукции макроэргических соединений.

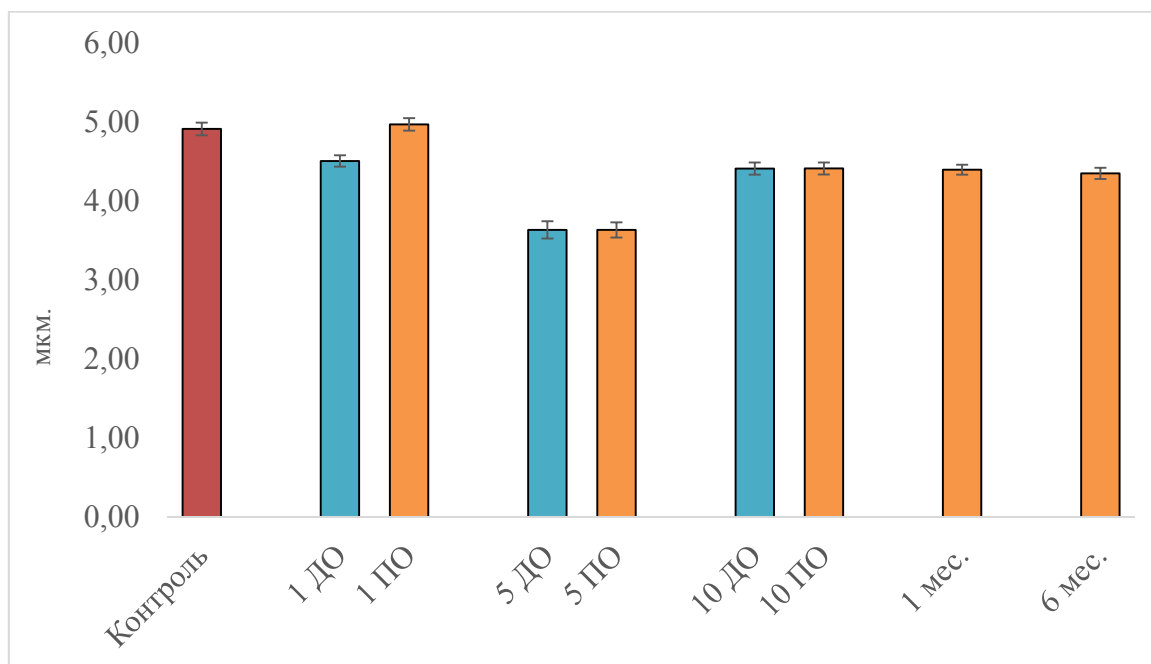


Рис. 3. Радиус лимфоцитов (обозначения см. рис. 1)

Из рисунка видно, что среднестатистическое распределение лимфоцитов (без их разделения на субпопуляции: малые, средние и большие) по линейным размерам для здоровых и больных достоверно не различается и находится в пределах физиологической нормы: $4,91 \pm 0,08$ мкм контрольная группа и $4,50 \pm 0,07$ мкм для пациентов до лечения. Проведение первого сеанса освечивания крови сопровождается увеличением радиуса клеток на 10%. К пятому сеансу терапии отмечается общее изменение качественного состава основных клеток иммунной системы в сторону преобладания малых лимфоцитов в общем количестве их совокупной популяции. Визуально регистрируемого воздействия когерентного излучения на состав пула клеток не выявлено: средние размеры клеток (радиус) в обеих сравниваемых группах (5 ДО и 5 ПО) остаются неизменными и составляют $3,63 \pm 0,10$ мкм. К десятому сеансу достигается стабилизация неоднородной группы клеток лимфоидного ряда, их средний радиус сохраняется в пределах 4,35–4,41 мкм.

В научной литературе приводятся результаты исследований лазерного излучения различных диапазонов на общую дыхательную активность митохондрий, выделенных из различных источников (печени, мышечной ткани). Так, в работе [8] авторы отмечают, что после использования низкоинтенсивной лазерной терапии возрастает мышечная производительность в условиях эксперимента (крысы) и клинических испытаний. Согласно результатам исследований, эффект достигается за счет увеличения мембранного потенциала митохондрий и повышения выработки АТФ. В этом аспекте выявленная в данной работе

активация митохондрий в условиях *in situ* у пациентов с АГ находится в полном согласии с данными литературы. В работе [9] авторы отмечают, что лазерное излучение зеленой части спектра при длине волны 532 нм является более эффективным по сравнению с красным, имеющим длину волны 650 нм. Облучение выделенных из печени крыс органелл в условиях *in vitro* зеленым лазерным светом способствует более чем двукратному повышению респираторной активности митохондрий, измеряемой оксиграфом.

Применение в нашей работе НИЛИ с длиной волны 525 нм сопровождалось закономерным повышением общей оксигеназной активности митохондрий, оцениваемой ростом маркера дыхательной активности – диформаза. Согласно результатам проведенных исследований, одной из основных мишеней для непосредственного воздействия квантов света выступает ключевой фермент, участвующий одновременно в цикле трикарбонных кислот и являющийся переносчиком электронов в дыхательной цепи митохондрий, – сукцинатдегидрогеназа. Зафиксированные паттерны повышенной дыхательной активности после сеансов освечивания свидетельствуют о возможности терапевтического воздействия лазерного излучения на клетки и системы организма.

Увеличение радиуса лимфоцитов, наблюдаемое после первого сеанса НИЛИ, также может быть связано с изменением энергопродукции/энергопотребления в клетках, изменением проницаемости мембран [10]. Так, авторы работы [11] отмечают, что в условиях велоэргометрии при повышенных нагрузках (70% VO_{2max} в течение 90 мин) уже в первые 15 мин происходит изменение клеточного состава лимфоцитов, который затем стабилизировался и оставался на протяжении всего остального времени тестирования постоянным. Данное обстоятельство может свидетельствовать о глубоких качественных перестройках в организме, которые наиболее явно проявляются во время первого сеанса лазерной терапии.

Заключение

Результаты проведенных клинко-диагностических исследований больных с артериальной гипертензией свидетельствуют о направленности воздействия лазерного облучения на нормализацию клеточного дыхания и компенсацию энергетического дефицита, сопровождающего патологический процесс. Терапевтическое воздействие низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 525 нм приводит к достоверному повышению общей оксигеназной активности митохондрий лимфоцитов и способствует таргетной активации ключевого фермента дыхательной цепи – сукцинатдегидрогеназы.

Высокая информативность, быстрота проведения и возможность оценки метаболической активности митохондрий *ex tempore* в условиях *in situ* позволяют рекомендовать цитобиохимический метод к использованию в клинической практике для

повышения эффективности лазерной терапии, научного обоснования объемов лечебных процедур и периода ремиссии заболевания. Применение классической схемы, включающей 10 процедур по 10 мин, обеспечивает достоверное значимое повышение энергопродукции и сохранение энергетического баланса клеток на временной отрезок не менее 6 месяцев.

Список литературы

1. Доклад Всемирной Организации Здравоохранения: «Десять основных заболеваний, обуславливающих смертность». [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death#:~:text=The%20top%20global%20causes%20of,birth%20asphyxia%20and%20birth%20trauma%20C>. (дата обращения: 16. 12. 2020).
2. D'Souza M.J., Li R.C., Gannon M.L., Wentzien D.E. 1997-2017 Leading Causes of Death Information Duetto Diabetes, Neoplasms, and Diseases of the Circulatory System, Issues Cautionary Weight-Related Less onto the US Population at Large. IEEE Netw. 2019. P. 1-6. DOI: 10.1109/ICESI.2019.8863033.
3. Wunsch G., Gourbin C. Mortality, morbidity and health in developed societies: a review of data sources. Genus. 2018. Vol. 74 (1). P. 2. DOI: 10.1186/s41118-018-0027-9.
4. Попов А.В., Максимов Н.Н., Бывальцев А.С. Анализ и прогноз показателей заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистой патологии у городских и сельских жителей // Известия Самарского научного центра РАН. 2014. № 5-2. С. 927-929.
5. Schwalm J.D., McKee M., Huffman M.D., Yusuf S. Resource Effective Strategies to Prevent and Treat Cardiovascular Disease. Circulation. 2016. Vol. 133 (8). P. 742-755. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.008721.
6. Кондрашова М.Н., Захарченко М.В., Хундерякова Н.В., Маевский Е.И. Цитобioхимический способ определения активности сукцинатдегидрогеназы, окисления эндогенной янтарной кислоты, сигнального действия микромолярных концентраций янтарной кислоты, его применение для количественной оценки уровня адренергической регуляции в организме, среда и набор для осуществления. // Патент РФ № 2364868. Патентообладатели: Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН) (Ru). Кондрашова Мария Николаевна (Ru). Открытое акционерное общество "Диод" (Ru). Дата начала действия патента: 2007.11.20. Бюл. № 23.
7. Кондрашева М.Н., Хундерякова Н.В., Захарченко М.В. Оригинальный цито-био-химический метод выявления индивидуальных различий физиологического состояния

организма по комплексной характеристике (паттерну) активности сукцинатдегидрогеназы // *Фундаментальные исследования*. 2009. №. 10. С. 27-43.

8. Ferraresi C., Kaippert B., Avci P., Huang Y.Y., de Sousa M.V., Bagnato V.S., Parizotto N.A., Hamblin M.R. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochem Photobiol*. 2015. Vol. 91 (2). P. 411-416. DOI: 10.1111/php.12397.

9. Osipov A.N., Machneva T.V., Buravlev E.A., Vladimirov Y.A. Effects of Laser Radiation on Mitochondria and Mitochondrial Proteins Subjected to Nitric Oxide. *Front Med (Lausanne)*. 2018. Vol. 5. P. 112. DOI: 10.3389/fmed.2018.00112.

10. Torchi A., Simonelli F., Ferrando R., Rossi G. Local Enhancement of Lipid Membrane Permeability Induced by Irradiated Gold Nanoparticles. *ACS Nano*. 2017 Vol. 11 (12). P. 12553-12561. DOI: 10.1021/acsnano.7b06690.

11. Gimenez M., Mohan-Kumar T., Humbert J.C., De Talance N., Buisine J. Leukocyte, lymphocyte and platelet response to dynamic exercise. Duration or intensity effect? *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1986. Vol. 55 (5). P. 465-70. DOI: 10.1007/BF00421638.