

УДК 612+57.042+57.043+574.24

Н. В. АКУЛИЧ

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ
У ПАЦИЕНТОВ С ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА**

Могилевский государственный университет им. А. А. Кулешова, Беларусь

(Поступила в редакцию 03.02.2014)

Введение. Ранее нами было показано, что внутрисосудистое лазерное облучение крови (ВЛОК) у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) способствует обновлению клеточной популяции эритроцитов периферической крови, что приводит к увеличению площади поверхности эритроцитов [1] и к изменению состава жирных кислот мембраны [2].

Повышенное до лечения количество эритроцитов достоверно снижалось после проведения каждого сеанса ВЛОК. Феномен эритропении, наблюдаемый нами, долгое время не находил исчерпывающего объяснения. В фундаментальных работах исследователей в этой области было обращено внимание на антиишемический эффект низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), положительное его влияние на гемостаз, реологические свойства крови и т. д. [3]. В учебниках и руководствах при описании механизмов действия красного лазера указывается [4, 5], что ВЛОК оказывает био- и иммуностимулирующее, противовоспалительное, десенсибилизирующее, антибактериальное, детоксикационное, трофико-регенераторное и обезболивающее действие, улучшает микроциркуляцию и обмен веществ, повышает устойчивость организма к неблагоприятным факторам и повышает жизненный тонус, чем (в первом приближении) объяснялись механизмы терапии при помощи НИЛИ. Такая однозначность формулировок хотя и не исключала наличия других механизмов НИЛИ, но создавала определенные рамки, которые ограничивали направление научного поиска.

С другой стороны, когда при внутривенном применении НИЛИ у пациентов с ИБС отмечалась плохая воспроизводимость результатов, отсутствие статистически достоверных улучшений в состоянии, обострение болезни [6], то у кардиологов и врачей других смежных специальностей практически отсутствовала возможность внести коррекцию в технологию проводимой терапии (время облучения, количество сеансов и т. д.). Кроме того, такой отрицательный опыт применения ВЛОК практически не влиял ни на методологию проведения терапии, ни на объяснение ее механизмов.

Впоследствии, когда нами были получены данные о росте количества ретикулоцитов после проведения сеансов НИЛИ, было высказано предположение о возникновении эпизодов ишемии после проведения сеанса ВЛОК [1]. Для проверки гипотезы, согласно которой ВЛОК приводит к гибели эритроцитов, была проведена оценка экспрессии фосфатидилсерина на клеточной поверхности эритроцитов пациентов. Установлено [1], что доля эритроцитов, имевших признаки апоптоза, непосредственно после проведения сеанса увеличилась на $45,35 \pm 0,12\%$ ($p < 0,05$), а на следующий день перед проведением сеанса доля Annexin V-позитивных эритроцитов находилась в пределах исходного (до лечения) уровня и составляла $7,83 \pm 0,12\%$. Был сделан вывод, что гибель эритроцитов инициируется НИЛИ и связана с высокой плотностью мощности излучения. Несмотря на эти результаты, невыясненными остаются особенности эритрона в динамике курсового применения ВЛОК. В частности, необходимо провести анализ морфоденситометрических

характеристик красных кровяных телец периферической крови, а также оценить эффективность эритропоэза.

Цель исследования – выяснение механизмов курсового терапевтического воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения.

Объекты и методы исследования. Основную группу составили 26 пациентов с ИБС в возрасте $46,1 \pm 0,9$ года, находившихся на лечении в Могилевской областной больнице. Контрольную группу составили здоровые добровольцы мужского пола (19 человек в возрасте $40,2 \pm 1,1$ 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 мин, курс лечения – 5 ежедневных сеансов. Первый сеанс начинался в понедельник в 9.00, а заканчивалось лечение в пятницу в 9.45.

Оценку эритроцитов осуществляли на проточном цитофлуориметре Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter, США) и микроскопе проходящего света (Axio Imager A1, Германия), объектив Plan-Neofluar 100×1.3Oil с видеокамерой Axio Cam Mrc5 (Германия), при помощи программы «Диаморф-ЦИТО» (Россия). Морфологический анализ эритроцитов осуществляли с использованием DIC-призм в препаратах, приготовленных по методу «влажной капли». Морфоденситометрию эритроцитов осуществляли по методу проф. А. В. Жукоцкого [7].

После 30-минутного отстаивания цельной крови удаляли надосадочную жидкость и забирали 1 мкл эритроцитов, которые разбавляли фосфатным буфером, осторожно встряхивали на вортексе и через 1–2 мин анализировали на проточном цитофлуориметре. Оценивали электронный объем и боковое светорассеяние пробы. В ходе анализа регистрировали параметры 40 000 клеток.

Оценку ретикулоцитов цельной крови проводили с использованием суправитального красителя акридина оранжевого, подсчет событий осуществляли в двух диапазонах флуоресценции – 530 и более 600 нм [8]. В качестве эталона для сравнительного исследования ретикулоцитов использовали гемоанализатор Sysmex XT-2000i (Япония). Определение экспрессии аннексина V реализовано на цитофлуориметре Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter, США) по протоколу фирмы производителя.

При микроскопировании анализировали следующие показатели размеров эритроцитов: структурные (объем и площадь поверхности эритроцитов), а также характеристики тора (периферическая зона эритроцита), пэллора (центральная зона эритроцита). Оптические и морфологические параметры рассчитывали путем построения «оптического профиля» на гистограмме распределения изображения оптической плотности красных кровяных телец.

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).

Результаты и их обсуждение. В отличие от гематологического анализатора, проточный цитофлуориметр может предоставлять 2 измеряемых и до 10 расчетных параметров клетки. Последние имеют решающее значение для оценки распределения эритроцитов. Поскольку анализ их распределения выявил наличие крупных эритроцитов (так называемое логнормальное распределение), то вместе со средним значением объема эритроцита определялись и другие характеристики распределения эритроцитов по объему.

На протяжении всего курса лечения применение плацебо (инфузия физиологического раствора) у пациентов с ИБС приводило к постепенному снижению объема эритроцитов. К окончанию лечения между средним объемом эритроцитов пациентов и группой контроля различий не выявлено (рис. 1). При использовании в терапии НИЛИ средний объем эритроцитов у пациентов с ИБС сохранялся повышенным на протяжении всего периода лечения. Значение моды объема эритроцитов имело сходную тенденцию, но статистически достоверных изменений выявлено не было.

Необходимо отметить большой разброс величины этой величины при использовании физиологического раствора. Учитывая, что разброс значений моды объема увеличивался к пятой процедуре (при снижении среднего объема эритроцитов и приближении значений к контрольному уровню), можно предположить, что осмотическая резистентность небольшой популяции эритроцитов (7,36 %) пациентов с ИБС была снижена.

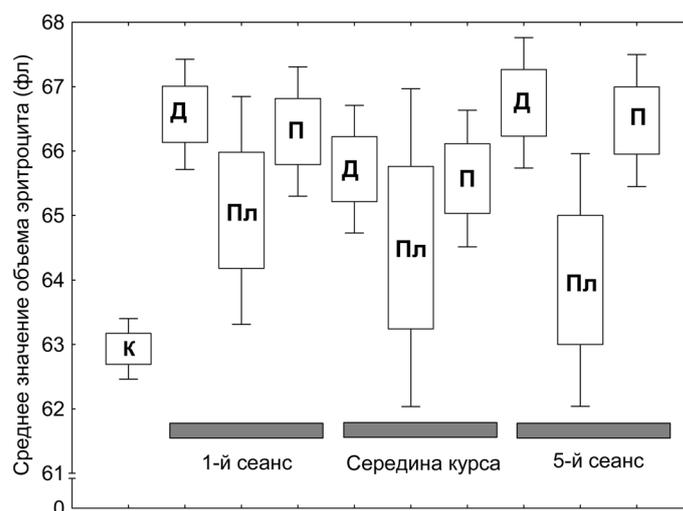


Рис. 1. Объем эритроцитов при проведении сеансов ВЛОК. Здесь и на рис. 2: К – контроль, Д – до сеанса, Пл – плацебо, П – после сеанса

На протяжении всего периода наблюдения сохранялся анизоцитоз ($p < 0,05$). Последний параметр определяли исходя из величины ширины полувысоты гистограммы распределения объема эритроцитов. Таким образом, терапия ВЛОК не привела к нормализации объема эритроцитов, а их объем был выше ($p < 0,05$), чем в группе контроля.

Среднее значение бокового светорассеяния увеличивалось после каждого сеанса ($p < 0,05$), а инфузия физиологического раствора, наоборот, вызывала резкое уменьшение этого параметра.

Анализ мазков крови представленных образцов (более 300 эритроцитов с одного препарата) не выявил увеличения патологических форм эритроцитов как при применении лазера, так и в группе плацебо.

Таким образом, поскольку величина бокового светорассеивания при оценке ядродержащих клеток коррелирует с содержанием и/или конформацией белка в клетке, а эритроцит на 62 % (доля от сухой массы) состоит из гемоглобина, можно предположить, что рост бокового светорассеяния – следствие увеличения концентрации гемоглобина в эритроците.

Проведенный по данным полуавтоматического гемоанализатора анализ средней концентрации гемоглобина в эритроците (МСНС), где МСНС рассчитывали по формуле $МСНС = \text{гемоглобин} / \text{гематокрит}$, не выявил изменений в ходе терапии НИЛИ. Прямое определение средней концентрации гемоглобина в эритроците (данные Sysmex ХТ-2000i) показали небольшой, но статистически достоверный рост – от $325,64 \pm 8,22$ до $342,2 \pm 7,35$ г/л после сеанса ВЛОК соответственно. Статистически значимой корреляционной связи между МСНС и боковым светорассеянием не выявлено.

Таким образом, можно предположить, что курс НИЛИ приводит к удалению эритроцитов с меньшей концентрацией гемоглобина. Принимая во внимание, что, во-первых, скорость синтеза гемоглобина не может превышать 0,5 пг/ч [9], а, во-вторых, концентрация гемоглобина в эритроцитах ниже, чем в ретикулоцитах [10], очевидно, что ВЛОК устраняет из кровотока эритроциты с меньшей концентрацией гемоглобина. Кроме того, средняя концентрация гемоглобина в эритроците, даже определяемая прямым способом, может не отражать состояние эритрона (например, в случае ненормального распределения этого параметра).

Проведенное исследование выявило тесную ($87,43 \pm 11,99$; $p < 0,04$) положительную корреляционную связь между экспрессией аннексина V и величиной бокового светорассеяния эритроцитов, что доказывает инициирование апоптоза эритроцитов под влиянием ВЛОК. Кроме того, поскольку изменение величины бокового светорассеяния эритроцитов не коррелировало с МСНС, наиболее вероятными являются качественные, а не количественные изменения красных кровяных телец.

На следующем этапе был проведен морфоденситометрический анализ красных кровяных телец. В каждой пробе анализировали не менее 100 клеток (рис. 2).

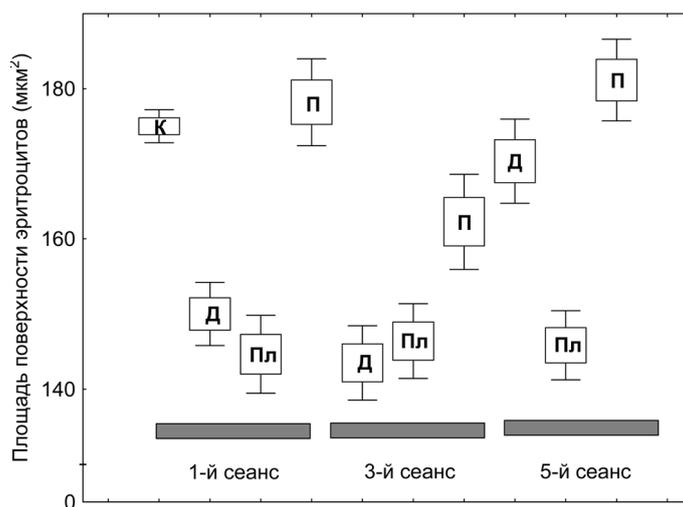


Рис. 2. Площадь поверхности эритроцитов при проведении сеансов ВЛОК

Площадь поверхности эритроцитов (SRBC) увеличивалась ($p < 0,05$) после каждого сеанса, а после четырех проведенных сеансов этот показатель, как и в случае параметра бокового светорассеивания, был выше исходного уровня как до, так и после сеанса. При использовании плацебо площадь поверхности эритроцитов практически не изменялась.

До проведения сеанса диаметр пэллора составлял $2,44 \pm 0,39$ мкм, а после его проведения – $3,83 \pm 0,43$ мкм. После лечения диаметр пэллора вырос до $4,11 \pm 0,22$ мкм. Диаметр пэллора тесно коррелировал ($-0,89$; $p < 0,04$) с толщиной пэллора эритроцитов.

До курса НИЛИ количество ретикулоцитов у пациентов с ИБС превышало аналогичный показатель в контрольной группе и находилось в пределах $1,17 \pm 0,04$ % (см. таблицу). В частности, средний объем и количество ретикулоцитов со средней и высокой интенсивностью флуоресценции были достоверно выше, что указывает на постоянную стимуляцию эритропоэза при верифицированной ишемии миокарда.

Анализ структурно-функциональных параметров ретикулоцитов в динамике курса НИЛИ

Этап НИЛИ \ Параметры	Ret, %	MCV, фл	LFR, %	MFR, %	HFR, %
<i>Группа 1</i>					
	$0,86 \pm 0,04$	$80,8 \pm 4,31$	$90,12 \pm 3,54$	$4,8 \pm 1,64$	$4,14 \pm 0,44$
<i>Группа 2</i>					
До курса НИЛИ	$1,17 \pm 0,04^*$	$70,52 \pm 3,54^*$	$95,14 \pm 4,11^*$	$3,24 \pm 0,15^*$	$1,73 \pm 0,13^*$
Середина курса НИЛИ	$0,99 \pm 0,06^\#$	$71,03 \pm 4,67^*$	$95,42 \pm 3,22^*$	$2,54 \pm 0,11^{*,\#}$	$2,05 \pm 0,13^*$
После курса НИЛИ	$1,54 \pm 0,07^{*,\#}$	$80,53 \pm 3,11^\#$	$97,03 \pm 3,02^*$	$2,42 \pm 0,33^*$	$0,81 \pm 0,65^{*,\#}$

Примечание. Достоверность различий по сравнению с началом терапии: $\#$ – в пределах группы, $*$ – между группами.

В середине курса выявлено снижение как процента ретикулоцитов, так и уровня клеток со средней и высокой интенсивностью флуоресценции. Это можно расценить как срочную реакцию на НИЛИ, проявляющуюся противоишемическим эффектом.

После курса НИЛИ отмечен статистически значимый эритропоэтический эффект терапии: рост процента ретикулоцитов, увеличение их среднего объема со снижением доли ретикулоцитов с высокой интенсивностью флуоресценции.

Кроме подсчета и анализа ретикулоцитов определяли также индекс стимуляции:

$$Hb \text{ (г/л)} - 60 \cdot \sqrt{\text{процент ретикулоцитов}}, \text{ норма} - 85-95 \text{ о. е.}$$

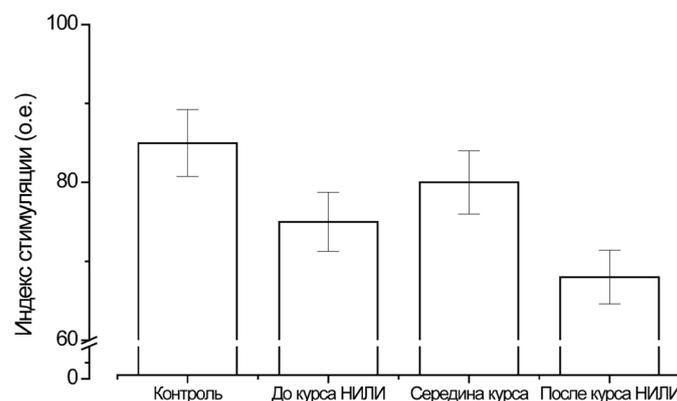


Рис. 3. Индекс стимуляции эритрона при проведении сеансов ВЛОК

Как следует из рис. 3, на протяжении всего периода наблюдения индекс стимуляции у пациентов с ИБС был ниже нормы. С другой стороны, в середине курса отмечался статистически значимый прирост индекса стимуляции с последующим снижением к окончанию терапии.

В настоящее время перечень гипотез о фотобиологическом действии НИЛИ можно ограничить следующими:

- 1) фотоактивация порфирин-содержащих соединений;
- 2) фотоактивация транспорта электронов в митохондриях;
- 3) прямое фотовозбуждение молекулярного кислорода;
- 4) неспецифическое влияние на структуру воды;
- 5) изменение пространственной структуры и функциональной активности биомолекул.

Особенностью большинства работ, посвященных исследованию механизмов действия лазерного излучения [11], является то, что механизмы ВЛОК рассматриваются с позиции физики и биохимии, а объектами их исследований (в большинстве случаев) являются простые модели: растворы, культуры клеток. По нашему мнению, данные, полученные на подобных моделях, далеких от реальных систем и условий, которые присутствуют и функционируют в организме, нельзя экстраполировать на целостный организм.

Таким образом, несмотря на обилие литературных сведений, механизмы положительного терапевтического эффекта НИЛИ при лечении пациентов с ИБС к моменту начала нашей работы были практически не изучены.

В опубликованных нами в 2009–2012 гг. работах была предложена концепция гемической гипоксии, приводящей к стимуляции эритропоза. Подтверждением этой гипотезы являлись полученные данные о газовом составе крови пациентов с ИБС. Так, уровень pO_2 на протяжении всего периода лечения был ниже нормы, а на четвертом сеансе достиг своего минимума – $24,46 \pm 1,11$ мм рт. ст. Снижение парциального давления сопровождалось снижением концентрации гемоглобина и уровня гематокрита непосредственно после сеанса.

Поскольку носители кислорода со сниженным P_{50} (повышенным сродством к O_2), используются как средство направленной доставки O_2 в ишемизированную ткань [12], то эритроциты с повышенным сродством к гемоглобину, по нашему мнению, являются компенсаторным механизмом у пациентов с ишемией миокарда.

Принято считать, что поглощение света приводит к активации антиоксидантных ферментов. В том случае, когда речь идет о клетках здорового человека, небольшая ишемия немедленно компенсируется. У пациентов с ИБС доля функционально неполноценных эритроцитов, вероятно, выше. Как следствие, ВЛОК инициирует секвестрацию и разрушение патологически измененных и деформированных НИЛИ клеток.

По нашему мнению, сеансы НИЛИ вызывают индуцируемый сфероцитоз эритроцитов. Они становятся неспособными к деформации в микрососудистом русле и удаляются из кровотока, хотя обнаружить эритроциты с подобными морфологическими признаками нам не удалось. Вероятно, они удалялись за один пассаж по сосудистому руслу. Поддержание необходимого количества эритроцитов обеспечивалось стимуляцией эритропоза (отсюда рост количества ретикулоцитов).

Выводы

1. Терапия ВЛОК не приводит к нормализации объема эритроцитов: на протяжении всего курса лечения ИБС низкоинтенсивным лазерным облучением крови сохранялся макро- и анизоцитоз, патологических форм эритроцитов зарегистрировано не было.

2. Выявлена сеансовая зависимость дифрактометрических характеристик эритроцитов, которые тесно коррелировали с величиной экспрессии аннексина V у больных ишемией миокарда.

3. Доказано сеансовое и курсовое обновление популяции эритроцитов, механизм которого заключается в стимуляции эритропоэза, вероятно, за счет инициирования сфероцитоза внутрисосудистым лазерным облучением крови.

Исследование проведено при финансовой поддержке Могилевского областного исполнительного комитета.

Литература

1. Акулич Н. В. Радиация и Чернобыль: материалы междунар. науч. конф. Минск, 2011. С. 13–14.
2. Осипенко А. Н., Акулич Н. В., Бирюков А. Е., Орлов Д. А. // Кардиология. 2011. Т. 19, № 6. С. 42–51.
3. Акулич Н. В., Марочков А. В., Осипенко А. Н. и др. // Журн. ГГМУ. 2009. № 2 С. 98–102.
4. Пономаренко Г. Н., Турковский И. И. Биофизические основы физиотерапии. М., 2006. – 176 с.
5. Улащик В. С. Физиотерапия. Универсальная медицинская энциклопедия. Минск, 2008. – 640 с.
6. Марочков А. В. Внутрисосудистое лазерное облучение крови, механизмы взаимодействия и клиническое применение. Минск, 1996. – 85 с.
7. Kopylov V. F., Zhukotsky A. V., Kogan E. M. et al. // Biomedical Options: materials of III SPIE's Int. Symp. 1994. P. 141. Paper 2136A-21.
8. Tanke H. J., Nieuwenhuis I. A. B., Koper G. J. M. et al. // Cytometry. 1980. Vol. 1, N 5. P. 313–320.
9. Луговская С. А., Почтарь М. Е., Долгов В. В. Гематологические анализаторы: интерпретация анализа крови М.; Тверь, 2007. – 112 с.
10. Mast A., Blinder M., Lu Q. et al. // Blood. 2002. Vol. 99, N 4. P. 1489–1491.
11. Залесская Г. А., Улащик В. С. // Журн. прикл. спектроскопии. 2009. Т. 76, № 1. С. 51–75.
12. Samaja M., Crespi N., Guazzi M., Vandegriff K. D. // Eur. J. Appl. Physiol. 2003. Vol. 90. P. 351–359.

N. V. AKULICH

EFFICIENCY OF THE THERAPEUTIC ACTION OF LOW-INTENSITY LASER IRRADIATION IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

Summary

Comprehensive research of the influence of the course of use of intravascular laser irradiation of blood on the erythron of patients with ischemic heart disease is conducted. The erythron changes accompanied by the modification of membranes and the renewal of the cellular population of red blood cells of peripheral blood are detected.