

ВЛИЯНИЕ СВЕТОВОГО ИЗЛУЧЕНИЯ БЛИЗКОГО ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА НА КРЫС, ОЦЕНИВАЕМОЕ ПО АКТИВНОСТИ СУКЦИНАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ НА МАЗКЕ КРОВИ

© 2015 г. Н.В. Хундерякова, А.В. Захарченко, М.В. Захарченко, Х. Мюллер*, Н.И. Федотчева, М.Н. Кондрашова

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 3;*

**Advanced Natural Research Institute in memoriam Leonhard Euler, Munich, Germany*

E-mail: mkondrashova23@inbox.ru, nkhunderyakova@gmail.com

Поступила в редакцию 06.08.15 г.

Исследовано биологическое действие светового излучения ближнего инфракрасного диапазона (длина волны 850 нм), модулированного акустическим воздействием с частотой 101 Гц. Работа проведена на крысах, эффект регистрировали по активности сукцинатдегидрогеназы в лимфоцитах на мазке крови на фоне введения активирующей дозы адреналина, которое моделирует состояние организма на начальных этапах патогенного воздействия (стресса). Показано выраженное регулирующее влияние инфракрасного излучения на активность сукцинатдегидрогеназы у активированных адреналином животных. Инфракрасное излучение оказывает гомеостазирующее действие, снижая степень ингибирования или активации фермента, индуцированных адреналином. На контрольных животных инфракрасное излучение не оказывает заметного влияния. Таким образом, путем модуляции активности сукцинатдегидрогеназы инфракрасным излучением поддерживается энергообеспечение в митохондриях за счет самого мощного субстрата окисления – янтарной кислоты, что особенно сильно проявляется при стрессовых воздействиях.

Ключевые слова: митохондрии, лимфоциты, сукцинатдегидрогеназа, адреналин, излучение ближнего инфракрасного диапазона, модулированное акустическими частотами.

Одной из актуальных задач современной фундаментальной медицины является определение функционального состояния митохондрий в организме человека. Общеизвестно, что эти органеллы ответственны за поддержание уровня здоровья и патогенные сдвиги. Особенно важно выявление начальных изменений состояния митохондрий, которые предшествуют развитию выраженных клинических симптомов. Однако этому препятствует традиционный метод выделения митохондрий из клетки, при использовании которого нарушается их нативное состояние. Много лет наша группа искала способ максимально возможного сохранения нативного состояния митохондрий в процессе их выделения. Нами был предложен усовершенствованный вариант цитохимического метода исследования ферментов митохондрий в лимфо-

цитах крови на мазке [1–4]. Для лучшего сохранения свойств митохондрий были использованы современные биохимические среды. Сочетание цитохимического и биохимического подходов в нашем методе отражено в его названии – цитобиохимический.

В результате успешного подбора условий нам удалось наблюдать большие, никогда не наблюдаемые ранее амплитуды ответов выделенных митохондрий на введение адреналина *in vivo* (порядка 200–400% и выше). Цитобиохимический метод оценки активности сукцинатдегидрогеназы (СДГ) митохондрий в лимфоцитах показал высокую чувствительность к физиологическим изменениям в организме. Важным преимуществом метода является то, что данные для одного индивидуума статистически достоверны, так как основаны на измерении множества (100–700) окрашенных объектов в лимфоцитах на одном мазке. Кроме того, возможности метода значительно расширены благодаря введению дополнительных проб с

Сокращения: СДГ – сукцинатдегидрогеназа, ИКИ – световое излучение ближнего инфракрасного диапазона, модулированное акустическим воздействием с частотой 101 Гц.

субстратами, ингибиторами и другими регуляторами активности фермента, а также благодаря улучшению способа облучения окрашенных объектов.

Высокая чувствительность метода обеспечивает выявление различных функциональных состояний митохондрий в организме, в том числе даже при индивидуальных различиях здоровых обследуемых. В данной работе цитобиохимический метод применен для выявления биологического действия модулированного акустической частотой 101 Гц излучения ближнего инфракрасного диапазона, создаваемого аппаратом «Curator», разработанным в Институте исследования космической энергии (Мюнхен, Германия) на основе теории Х. Мюллера о глобальной инвариантности [5–7].

Согласно этой теории, основные частоты собственных колебаний широкого класса процессов, близкие к 101 Гц, возбуждают в клетке оптимальные гармоничные колебания. Они создаются в приборе путем акустической модуляции инфракрасного излучения. Эти частоты стимулируют восстановительные процессы в организме. Экспериментальные данные показывают, что воздействие излучателя аппарата «Curator» индуцирует адаптивный ответ в костном мозге мышей *in vivo* и оказывает антиканцерогенное действие [8,9]. Показано также противовоспалительное и биостимулирующее действие красного и инфракрасного излучения других диапазонов и He-Ne-лазера [10,11]. Все они активируют защитные системы организма.

В данной работе действие светового излучения красного и ближнего инфракрасного диапазона (640–850 нм), модулированного акустической частотой 101 Гц (далее по тексту – ИКИ), оценивали по активности СДГ, которая осуществляет окисление янтарной кислоты в митохондриях. Янтарная кислота является наиболее мощным субстратом окисления, используемым при повышенных нагрузках на организм [1].

Активность СДГ может изменяться в широком диапазоне, от гиперактивации до ингибирования. От активности СДГ сильно зависит физиологическое состояние организма. Активность СДГ в организме регулируется симпатической нервной системой и адреналином [2]. Цитобиохимический метод позволил обнаружить неизвестные ранее тонкие градации активности СДГ и выявить ее регуляторы [12–14].

Представлялось вероятным, что действие ИКИ может быть связано с влиянием на активность окисления янтарной кислоты в организме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве источника светового излучения ближнего инфракрасного диапазона с длиной волны 640–850 нм, модулированного акустической частотой 101 Гц (22 мВт/см²), использовали выпускаемый в Германии прибор Curator Applikator Nr: 100 10 (M.L. Kindling GmbH 31137, Hildesheim www.kindling.de).

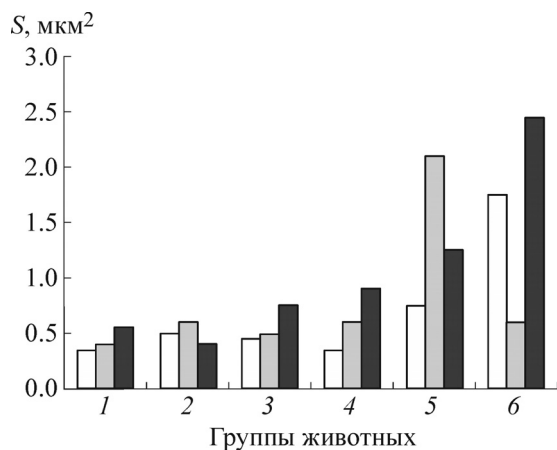
Опыты проведены на крысах (самцы линии Вистар массой 200–220 г), выращенных в виварии ИТЭБ РАН. В опыте использовали в один день по три животных. Исследования проводили в одно и то же время – с 10 до 12 часов дня. Наблюдались вариации состояния групп животных в разные дни. Это согласуется с нашими предыдущими наблюдениями и данными других авторов о вариациях состояния организма в разные дни в зависимости от погодных условий и других геофизических факторов [15,16]. Ввиду большой статистической достоверности результатов для каждой группы, такие вариации отражают реальное изменение показателей в разные дни.

Каждый эксперимент включал: а) опыт на животном без воздействия – контроль, б) при введении адреналина внутривенно, в физиологической стимулирующей дозе 25 мкг/100 г массы тела за 30 мин до декапитации животного и в) введение адреналина и спустя 10 мин воздействие ИКИ в течение следующих 10 мин. Излучатель ИКИ располагали поперек спинки животного.

Свежеприготовленные мазки крови фиксировали в течение 30 с 60%-м ацетоном, забуференным 10 мМ HEPES, pH 5,2–5,4, при комнатной температуре. Затем ополаскивали дистиллированной водой и высушивали на воздухе.

Активность СДГ измеряли по восстановлению нитросинего тетразолия в свежеприготовленной мазке крови по описанной ранее методике [3] в среде, содержащей 125 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 1,22 мМ нитросинего тетразолия хлорида с добавкой 5 мМ янтарной кислоты в течение 1 ч при 37°C, pH 7,2 ± 0,05. После инкубации мазки докрашивали ядерным красителем нейтральным красным (0,5%) в течение 8 мин.

Мазки после развития окраски нитросинего тетразолия анализировали на микроскопе Микмед-2 («Ломо», Россия), соединенном с видеокамерой MINTRON CCD MTV-1 802 CB («Кандела», Россия) при 100-кратном увеличении под масляной иммерсией. На каждой мазке выбирали 30 лимфоцитов, которые подвергали количественному анализу с помощью программы Image Tool, версия 2 (The University of Texas



Регуляция активности СДГ в лимфоцитах крыс при воздействии ИКИ. Светлые столбцы – интактные животные, серые – после внутрибрюшинного введения адреналина 25 мкг на 100 г массы животного, темные – 10 мин воздействия ИКИ после введения адреналина.

Health Science Center at San Antonio, США). В качестве характеристики активности фермента в клетках на изображениях автоматически определялась площадь, занятая восстановленным продуктом реакции – формазаном. Критерием присутствия формазана считалось превышение оптической плотности изображения, соответствующей фоновому уровню (150 единиц в шкале градаций серого цвета от 0 (черный) до 255 (белый)). Величины активностей выражены в средней площади объекта (S), полученной делением общей окрашенной площади на число объектов [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение воздействия ИКИ на активность сукцинатдегидрогеназы. Животные положительно воспринимают воздействие прибора, успокаиваются, начинают дремать. Исследования проведены на шести группах крыс по три животных в каждой – контрольное животное и две крысы, активированные введением физиологической дозы адреналина 25 мкг на 100 г массы за 30 мин до декапитации, на одну из которых дополнительно воздействовали ИКИ в течение вторых 10 мин после введения адреналина. Адреналин вводили для создания активированного состояния (состояния стресса), на фоне которого дополнительное воздействие может быть ярче выявлено.

Выявление разных уровней состояний митохондрий и зависимость действия ИКИ от исходного состояния животного. При проведении исследований цитобиохимическим методом вы-

являются различия уровня активности СДГ в разные дни, характерные для всей группы. Вариации состояния однородных групп животных, а также человека ранее неоднократно были показаны цитохимическими, биохимическими и физиологическими исследованиями. Это могло быть обусловлено сезонными изменениями, перепадами атмосферного давления и температуры и иными влияниями. Часто опыты и контроли к ним ставили в разные дни, более того, набирали опытную и контрольную группу в течение продолжительного времени. Статистическая обработка помогает устранить эти календарные различия. Мы предпочли вариант постановки эксперимента на трех животных в один день и в сжатый срок по времени (10–12 ч). Это позволяет учитывать вариабельность состояния всей группы животных в разные дни. При этом состояние трех исследованных в один день животных было сходным.

Действие ИКИ на СДГ мы оценивали в сравнении с уровнем активности СДГ у первых двух животных – контрольного и после введения адреналина. На рисунке группы расположены в нарастающем порядке зависимости от величины активности СДГ при окислении 5 мМ янтарной кислоты у контрольных животных. Для большей части животных (группы 1–4) характерно состояние покоя с низкой активностью СДГ. При низкой активности СДГ контрольного животного (площадь окрашивания формазаном около 0,4 мкм²) наблюдается очень слабая активация адреналином и видно, что на этом фоне ИКИ в основном, кроме группы 2, усиливает эту активность до также невысокого по абсолютной величине уровня (1,0 мкм²).

Регулирующее действие ИКИ ярко выражено при высоких значениях активности СДГ (площадь окраски формазана около 0,8 и 1,8 мкм²) у контрольных животных в группах 5 и 6. Действие адреналина на фоне активированного состояния СДГ в группе 5 приводит к существенному дополнительному повышению активности. Воздействие ИКИ «компенсирует» природу активности, снижая ее до умеренных величин. Для группы 6, судя по очень высокой активности у контрольного животного, характерна гиперактивация СДГ, типичная при стрессовом состоянии [1–3]. На фоне столь сильной активации дополнительное воздействие адреналином приводит к ингибированию СДГ. Это свидетельствует о переходе гиперактивации фермента в ингибирование, которое характерно для патогенного стресса. На таком фоне ИКИ снимает ингибирование СДГ и приводит к значительному увеличению ее активности до высоких значений, не наблюдаемых ранее в наших экспериментах.

В совокупности полученные данные показывают отсутствие влияния ИКИ на спокойных животных и выраженное регулирующее действие – на активных.

Это явление объясняется различным исходным структурным состоянием исследуемого фермента [17–19]. В неактивном, латентном состоянии молекулы ферментов плотно упакованы, а при активации переходят в развернутое состояние. В активированном состоянии ферменты более подвержены действию регуляторов. При этом хорошо исследовано воздействие на активность фермента различных веществ-регуляторов. Менее изучено влияние такого физического фактора, как излучение. Наши данные показывают, что излучение также оказывает различное влияние на фермент в латентном и в активированном состоянии.

Как показано в данной работе, на фоне активации наблюдаются два противоположно направленных эффекта от воздействия ИКИ. Это полностью аналогично действию такого модулятора активности СДГ, как изолимонная кислота, описанному ранее (12). Оно объясняется различием состояния фермента, а не разницей в механизме действия регулятора. Действие регулятора в обоих случаях состоит в усилении энергетической регуляции дыхания. Энергетическая регуляция мембранным потенциалом и уровнем АТФ состоит в снижении скорости дыхания при достижении максимума этих показателей. Таким образом, при отсутствии расхода энергии тормозится дыхание, при этом активность СДГ падает и клетка переходит в состояние покоя, в котором восстановительные процессы идут за счет работы других ферментов. При патологии в дыхательной цепи происходят утечки потенциала по разным причинам, в том числе вследствие разобщения процессов дыхания и накопления энергии. В результате дыхание не снижается, а даже увеличивается. По активности СДГ наблюдается гиперактивация с последующим автоингибированием СДГ щавелевоуксусной кислотой. Таким образом, стадии гиперактивации и ингибирования СДГ являются следствием патогенного усиливающегося ослабления энергетической регуляции. Поддержание ее на более мягкой стадии приводит к восстановлению регуляции и снижению активности СДГ, т.е. к устранению гиперактивности. На более глубокой стадии, когда ослабление регуляции приводит к автоингибированию СДГ, восстановление энергетической регуляции приводит к его устранению, т.е., к повышению активности [12]. Таким образом, при кажущейся противоречивости двух эффектов, механизм их одинаков и понятен.

Такое действие характерно для регуляторов энергетического обмена, в частности, изолимонной и янтарной кислот. Оно названо нами ранее гомеостазирующим действием.

В настоящей работе показано, что и излучение может оказывать модулирующее, гомеостазирующее действие на состояние ферментов. Это очень важный факт в малоизученной области регуляции активности ферментов при биофизических воздействиях.

Таким образом, ИКИ поддерживает основные процессы энергообеспечения в митохондриях за счет окисления янтарной кислоты путем модуляции активности СДГ. Это действие особенно сильно проявляется при больших нагрузках.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 13-04-01049а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. N. Kondrashova, M. V. Zakharchenko, and N. V. Khunderyakova, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 2036 (2009).
2. M. V. Zakharchenko, A. V. Zakharchenko, N. V. Khunderyakova, et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45** (1), 190 (2013).
3. М. Н. Кондрашова, М. В. Захарченко, Н. В. Хундерякова и др., в кн.: *Инновационные методы диагностики в медицине* (НП «Сибак», Новосибирск, 2013), сс. 10–58.
4. M. N. Kondrashova, M. V. Zakharchenko, et al., in: *Dehydrogenases*, Ed. by R. A. Canuto (Dept. of Experimental Medicine and Oncology, Turin, Italy, 2012), pp. 235–264.
5. H. Muller and M. N. Kondrashova, *Raum&zeit* **143**, 75 (2006).
6. H. Muller, *Progress in Physics* **3**, 62 (2010).
7. H. Muller, *Progress in Physics* **2**, 72 (2009).
8. С. И. Заичкина, О. М. Розанова, А. Р. Дюкина и др., *Бюлл. эксперим. биологии и медицины* **4**, 407 (2009).
9. С. И. Заичкина, О. М. Розанова, А. Р. Дюкина и др., *Биофизика* **58** (5), 897 (2013).
10. Т. Й. Кару, *Успехи соврем. биологии* **121**, 110 (2001).
11. T. I. Karu, *Photochem. Photobiol.* **84**, 1091 (2008).
12. М. Н. Кондрашова, М. В. Захарченко, Н. В. Хундерякова и др., *Биофизика* **58** (1), 106 (2013).
13. Н. В. Хундерякова, С. А. Плясунова, Е. Г. Литвинова и др., *Биофизика* **59** (6), 1101 (2014).
14. М. В. Захарченко, Н. В. Хундерякова и М. Н. Кондрашова, *Биофизика* **56** (5), 840 (2011).
15. С. Э. Шноль, *Биофизика* **58** (2) 357, 2013.
16. С. Э. Шноль, *Космофизические факторы в случайных процессах* (Svenska Fisikarkivet, Stockholm, 2009).
17. Л. А. Блюменфельд, *Проблемы биологической физики* (Наука, М., 1977).
18. Л. А. Блюменфельд, *Решаемые и нерешаемые проблемы биологической физики* (УРСС, М., 2002).
19. А. В. Финкельштейн, *Физика белка* (КДЦ, М., 2002).

Effects of Light Near-Infrared Radiation on Rats Assessed by Succinate Dehydrogenase Activity in Lymphocytes on Blood Smears

N.V. Khunderyakova*, A.V. Zakharchenko*, M.V. Zakharchenko*, H. Muller,
N.I. Fedotcheva*, and M.N. Kondrashova***

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Advanced Natural Research Institute in memoriam Leonhard Euler, Munich, Germany*

Biological effects of light near infrared radiation (850 nm), with modulation acoustic frequency of 101 Hz, was studied. The study was conducted on rats, the effect was recorded by succinate dehydrogenase activity in lymphocytes on the blood smear after administration of the activating dose of adrenaline, which simulates the state of the organism in the early stages of the pathogenic effects (stress). A pronounced regulating effect of infrared radiation on the activity of succinate dehydrogenase in animals activated by adrenaline was shown. Infrared radiation has a normalizing effect reducing the degree of inhibition or activation of the enzyme induced by adrenaline and had no effect on the control animals. Thus, by modulating the activity of succinate dehydrogenase infrared radiation regulates energy production in the mitochondria supported by the most powerful oxidation substrate – succinic acid, which is especially pronounced under stress.

Key words: mitochondria, lymphocytes, succinate dehydrogenase, adrenaline, near infrared radiation