

ФЕРМЕНТЫ-АНТИОКСИДАНТЫ В ЭРИТРОЦИТАХ БОЛЬНЫХ ПРИ РЕФЛЕКСОТЕРАПИИ

Погосян А.С.

(Пушино, Московская область)

В настоящей работе проведено исследование состояния антиокислительной системы в эритроцитах больных при рефлексотерапии. Показано, что повышенные при разных заболеваниях содержание малонового диальдегида и активность каталазы в эритроцитах снижаются к нормальному уровню после курса рефлексотерапии. Активность супероксиддисмутазы в клетках больных не отличается от нормы, но после курса рефлексотерапии превышает нормальный уровень. Активность глутатионпероксидазы снижена в 2 раза в эритроцитах пациентов, нормализуется после рефлексотерапии у больных с нормальным или пониженным кровяным давлением. Таким образом, рефлексотерапия стабилизирует нарушенное при заболеваниях перекисное окисление липидов и улучшает состояние антиокислительной системы в эритроцитах.

ERYTHROCYTE ANTIOXIDANT ENZYMES IN ACUPUNCTURED PATIENTS

A.S. Poghosyan

(Pushchino, Moscow Region)

Erythrocyte antioxidant system in acupunctured patients was studied. Malondialdehyde and catalase levels were shown to be increased in patients and returned to the control values following acupuncture. Superoxide dismutase activity was similar in controls and patients but elevated after acupuncture. Glutathione peroxidase being lowered 2-fold originally in patients was normalized with treatment in those exhibiting normal blood pressure. Thus, acupuncture seems to stabilize lipid peroxidation and to improve antioxidant status of erythrocytes.

Иглокалывание относится к древнейшим из известных методов Китайской медицины. До последнего времени на Западе оно признавалось нетрадиционным способом лечения, и громадный, многовековой опыт применения иглокалывания в странах Востока пока не имеет полного научного обоснования. Иглотерапия (современное определение – рефлексотерапия) используется в реабилитационных отделениях некоторых больниц в качестве вспомогательного инструмента для симптоматической терапии всевозможных заболеваний, при лечении которых нежелательны, неизвестны или неэффективны общепринятые методы лечения. Техника рефлексотерапии состоит в том, что тонкие иглы вставляются в особые документированные точки на теле, называемые акупунктурными точками, в которых, как полагают, концентрируется энергия тела.

В настоящее время рефлексотерапия внедрена во многие лечебные учреждения и помогает в борьбе с многочисленными заболеваниями: ожирением, инсультами, нарушениями в системе гипоталамус-гипофиз-яичники, почечной недостаточностью, при устранении необъяснимых болей и многих других, с которыми не справляется традиционная медицина. Однако биохимические механизмы, лежащие в основе благоприятного действия рефлексотерапии на состояние здоровья у больных, остаются невыясненными. Предполагается, что ведущими в действии рефлексотерапии являются механизмы, основанные на принципе гомеостаза. Актуальным представляется исследование нарушений энергетического обмена в эритроцитах при патологии и возможного его восстановления после лечения: эти клетки человека наиболее доступны, а протекающие в них при рефлексотерапии биохимические процессы пока совершенно не изучены. В частности, неизвестно, изменяется ли антиокислительный статус эритроцитов при рефлексотерапии.

Целью данной работы было оценить изменения клинических показаний и биохимических показателей эритроцитов, характеризующих антиокислительный статус, у больных при лечении методом рефлексотерапии.

Клинические исследования проводились в отделении восстановительного лечения больницы Пущинского научного центра

РАН. В течение четырех лет обследовали 198 пациентов в возрасте 22-75 лет с различными заболеваниями, условно разделенными на следующие группы:

I – Болезни опорно-двигательного аппарата (артриты, артралгии, артрозы и др.) – число наблюдений 99;

II – Гинекологические заболевания (аднекситы, кисты яичников, стерильность и др.) – число наблюдений 29;

III – Бронхо-легочные заболевания (бронхиальная астма, хронические бронхиты, последствия перенесенной пневмонии и др.) – число наблюдений 18;

IV – Астено-депрессивные состояния и болезни периферической нервной системы (невриты, невралгии, неврозы) – число наблюдений 52.

Эффективность терапии оценивали по субъективным ощущениям у больных (сон, наличие боли, функция органа, работоспособность, аппетит, настроение) и по объективным показателям (пульс, артериальное давление (АД), данные ультразвукового обследования и лабораторного анализа крови).

Пациенты получали рефлексотерапию в течение одного или двух двухнедельных курсов. Количество сеансов за время одного курса – 9-11. Перерыв между первым и вторым курсами составлял обычно 1-1,5 месяца. Рефлексотерапию проводили амбулаторно, ежедневно, круглыми иглами диаметром 0,35 мм из нержавеющей стали. Акупунктурными точками служили, как правило, G11 – цюй-чи, E36 – цзу-сан-ли, RP6 – сань-инь-цзяо, G14 – хэ-гу, MC6 – ней-гуань, TR5 – вай-гуань, V60 – кун-лунь и др. Глубина введения иглы – до возникновения специфических ощущений (ломоты, распирания, давления, тяжести, тепла, чувства тока). Время экспозиции – 20 минут. При лечении гинекологических больных применяли также аурикулопунктуру (ухоиглотерапию). В этом случае использовали иглы в акупунктурных точках 55 (ЦНС), 22 (железы внутренней секреции), 23 (яичник), 28 (гипофиз).

Следует также отметить, что в данной работе проведено сравнительное исследование действия рефлексотерапии на указанные клинические и биохимические показатели, но не влияние конкретного заболевания на эти же показатели. Поэтому в приведенных далее таблицах пациенты объединены в группы не

по типу заболевания, а по возрасту, АД и изменению физиологического состояния.

Особое внимание уделялось клиническому анализу крови, особенно лейкоформуле (забор крови осуществлялся утром натощак в первый и последний дни каждого курса).

Для биохимических исследований периферическую кровь отбирали у 52 пациентов. В пробирки, установленные в лед, добавляли 200 мкл гепарина (10 ЕД/мл) и 200 мкл крови и центрифугировали при 1000g в течение 10 минут. Все процедуры проводились при температуре +4°C. Эритроциты отделяли от плазмы и дважды промывали охлажденным 0,9%-м раствором NaCl путем центрифугирования при 1000g в течение 10 минут. Осажденные эритроциты суспендировали в 0,9%-м физрастворе. Для получения лизата 0,25 мл суспензии свежих или замороженных эритроцитов добавляли к 0,5 мл буферного раствора, содержащего 50 мМ триэтаноламин, рН 7,4, и 0,02% сапонина.

Малоновый диальдегид в лизате эритроцитов измеряли фотометрически по образованию окрашенного комплекса тиобарбитурата с малоновым диальдегидом [1]. 0,1 мл лизата эритроцитов добавляли в реакционную смесь, содержащую 0,2% додецилсульфата натрия, 7,5% уксусной кислоты, рН 3,5, и 0,02% тиобарбитуровой кислоты, и смесь помещали в кипящую водяную баню. После инкубации в течение 1 часа пробы охлаждали до комнатной температуры и колориметрировали при 535 нм. Расчет концентрации малонового диальдегида в эритроцитах проводили с использованием коэффициента молярной экстинкции $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [2].

Активность каталазы определялась спектрофотометрически [3] с 30 мМ перекисью водорода в качестве субстрата. Реакцию запускали добавлением лизата эритроцитов. Убыль поглощения регистрировали при 240 нм и комнатной температуре.

Активность супероксиддисмутазы (СОД) определяли спектрофотометрически [4] при 550 нм в ксантин-ксантиноксидазной системе с нитротетразолием синим (НТС) в качестве акцептора. Реакционная смесь содержала 50 мМ карбонатный буфер, рН 10,2, 100 мкМ K^+ -ЭДТА, 45 мкМ НТС, 350 мкМ ксантин и 0,007 Ед/мл ксантиноксидазы в общем объеме 2,81 мл. Реакцию запускали добавлением 10 мкл лизата эритро-

цитов. Одна единица активности СОД соответствовала количеству фермента, вызывающему 50% торможение восстановления НТС.

Активность глутатионпероксидазы определяли по уменьшению абсорбции НАДФН в присутствии окисленного глутатиона [5]. 25-50 мкл лизата эритроцитов добавляли в реакционную смесь общим объемом 2,6 мл, содержащую 100 мМ фосфатный буфер, окисленный глутатион и 0,23 мМ НАДФН. Реакцию запускали добавлением 288 мкМ H_2O_2 и регистрировали светопоглощение при 340 нм.

Полученные данные обрабатывали статистически методом вариационной статистики по Стьюденту.

Результаты работы и обсуждение

Клинический анализ

Объективное улучшение состояния здоровья после курса рефлексотерапии наблюдалось у пациентов всех возрастных групп (табл. 1).

Таблица 1. Эффективность рефлексотерапии в зависимости от возраста пациентов при разных заболеваниях

Изменение состояния здоровья	Возраст (лет) и количество (n) больных					
	<29 n =21	30-39 n =34	40-49 n =24	50-59 n = 59	60-69 n = 50	>70 n = 10
Значительное улучшение	6	12	9	29	22	1
Улучшение	13	18	10	27	21	7
Без эффекта	2	4	5	3	7	2

Указано количество больных в каждой возрастной группе, субъективно и объективно выражающих изменение состояния здоровья.

В группе пациентов с заболеваниями опорно-двигательного аппарата после курса лечения состояние значительно улучшилось у 49 из 99, умеренно улучшилось у 41 пациента, и у девяти пациентов не наблюдалось лечебного эффекта.

Среди 29 больных с гинекологической патологией значительное улучшение состояния было у восьми пациенток, некоторое улучшение состояния – у 15 пациенток; у 6 больных не наблюдалось положительного результата.

При бронхо-легочных заболеваниях состояние значительно улучшилось у 4 из 18 пациентов, умеренно улучшилось у 11, ос-

талось без изменения у 3.

Из 52 больных с неврологической патологией в результате лечения значительное улучшение состояния наступило у 18, умеренное улучшение – у 29, осталось без изменения у 5.

В целом эффективность рефлексотерапии для пациентов всех групп составила 91-100%.

В качестве дополнительного критерия эффективности рефлексотерапии мы использовали лейкограмму крови. Как известно, повышение общего числа лейкоцитов свидетельствует о протекании воспалительного процесса в организме. Из литературы известно также об изменении лейкограммы при рефлексотерапии.

После терапии наблюдались уменьшение общего количества лейкоцитов в периферической крови, уменьшение скорости оседания эритроцитов, нормализация соотношения лимфоциты/сегментоядерные нейтрофилы.

У всех обследованных пациентов АД не изменялось после курса лечения и у некоторых больных слабо снижалось в течение курса. Аналогичные результаты были получены в литературе.

Биохимический анализ

Результаты биохимического анализа эритроцитов приведены в таблицах 2 и 3.

Концентрация МДА, как показатель интенсивности перекисного окисления мембранных липидов, в эритроцитах больных оказалась повышенной на 60-75% при сравнении с этим показателем у здоровых лиц (табл. 2). Повышенная концентрация МДА снижалась в эритроцитах больных, имеющих нормальное АД, и полностью нормализовалась в клетках крови пациентов, имеющих повышенное АД.

Таблица 2. Влияние рефлексотерапии на концентрацию малонового диальдегида, активность глутатионпероксидазы и каталазы в эритроцитах больных.

Изменяемый показатель	Здоровые лица (контроль) n=30	Пациенты с нормальным АД		Пациенты с повышенным АД	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Концентрация МДА, нмоли на 1 мл клеток	142,23±17,8	226,3±23*n =19	196,3±21*n =8	248,6±27,3*n =15	150,4±3,4*n =5

Измеряемый показатель	Здоровые лица (контроль) n=30	Пациенты с нормальным АД		Пациенты с повышенным АД	
		До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
Глутатионпероксидаза, мкмולי/мин на 1 мл клеток	16,9±0,85	8,95±1,1*n =14	14,8±1,3*n =14	7,45±0,76*n =16	9,9±1,5*n =12
Каталаза, сек ⁻¹ на 1 мл клеток	17,67±1,02	21,56±1,4*n =33	19,16±0,76*n =24	24,3±1,4*n =24	16,94±1,0*n =19

Приведены средние значения и среднеквадратичные отклонения от средних.

*P<0,01 при сравнении с контрольным уровнем; **P<0,05 при сравнении с показателем до лечения.

Активность глутатионпероксидазы, приблизительно в 2 раза сниженная в эритроцитах пациентов, повышалась после лечения, приближаясь к контрольному показателю (табл. 2), но не достигая его в группе больных, имеющих повышенное АД.

Активность каталазы, повышенная у пациентов обеих групп, полностью восстанавливалась к контрольному значению после сеанса иглорефлексотерапии (табл. 2).

Активность СОД была одинаковой в эритроцитах пациентов с нормальным АД и пациентов с повышенным АД перед лечением и не отличалась от нормы – при усреднении по всем полученным данным в каждой группе больных (табл. 3). В клетках пациентов обеих групп активность этого фермента повышалась незначительно (приблизительно на 10%), но достоверно после курса рефлексотерапии.

При более тщательном анализе индивидуальных результатов в отношении активности СОД удалось выявить необычную закономерность. В эритроцитах одной подгруппы больных с повышенным АД активность СОД оказалась много выше (на 23%), а в другой подгруппе – существенно ниже (на 14%) контрольного уровня (табл. 3). После курса терапии активность СОД, повышенная в эритроцитах больных первой подгруппы, снижалась на 47%, а активность СОД, пониженная в эритроцитах больных второй подгруппы, повышалась на 50%.

Таблица 3. Влияние рефлексотерапии на активность супероксиддисмутазы (СОД) в эритроцитах больных.

Пациенты	Супероксиддисмутазы, Ед/мл			
	До лечения	n	После лечения	n
Здоровые лица (контроль)	1181±62	16		
Пациенты с нормальным АД	1155±44	18	1277±50 ⁺⁺	16
Пациенты с повышенным АД	1162±68	27	1294±85 ⁺	14
а) Пациенты с повышенным АД, в эритроцитах которых перед лечением активность СОД выше контрольного уровня	1456±56*	9	986±69 ⁺⁺	6
б) Пациенты с повышенным АД, в эритроцитах которых перед лечением активность СОД ниже контрольного уровня	1015±43*	18	1525±48 ⁺⁺	8

Одна единица активности СОД соответствует количеству фермента, вызывающему

50%-ое торможение восстановления нитротетразолия синего в ксантин-ксантинооксидазной системе.

Приведены средние значения и среднеквадратичные отклонения от средних.

*P<0,01 при сравнении с контрольным уровнем; ⁺P<0,05, ⁺⁺P<0,01 при сравнении с показателем до лечения.

Таким образом, после курса рефлексотерапии у абсолютного большинства больных состояние здоровья улучшилось субъективно и объективно, и ни у одного из 198 лиц не наблюдалось ухудшения состояния. Биохимически результаты терапии проявляются в адаптивном изменении количественных показателей, характеризующих как окислительный стресс (малоновый диальдегид), так и антиокислительный статус (ферменты).

Наши результаты (табл. 1-3) в целом подтверждают данные литературы в том, что рефлексотерапия улучшает физиологическое состояние у больных и изменяет в сторону нормализации определенные биохимические свойства эритроцитов [6]. Они расширяют имеющиеся в литературе результаты, поскольку впервые описывают изменения активности ферментов-антиоксидантов в эритроцитах человека после сеанса рефлексотерапии. Наконец, наши данные впервые показали, что в биохимический механизм действия рефлексотерапии вовлекается система антиокислительной защиты эритроцитов. Тот факт, что

повышенная перед лечением больных активность СОД в эритроцитах снижается после сеанса иглорефлексотерапии, а пониженная перед лечением активность СОД повышается после лечения (табл. 3), представляет собой новый феномен, не может быть объяснен на современном уровне знаний и требует дальнейшего изучения.

Литература.

1. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979, 95(2), 351-358
2. Ernster L., Nordenbrand K. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1967, 10, 574-580
3. Aebi H.E. Catalase. In Bergmeyer H.U., ed., *Methods of Enzymatic Analysis*, vol. 3, p. 273-286. New York, Wiley, 1984.
4. Beauchamp C., Fridovich I. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 1971, 44, 276-287
5. Lawrence R.A., Burk R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1976, 71, 952-958
6. Уоррен Ф. Медицинская акупунктура. Киев: Вища школа, 1981