

УДК 577.152:537.87

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРОВИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ И ОТДЕЛЬНЫЕ ЗВЕНЬЯ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ

© 2001 г. Л.Т. Рязанцева, О.В. Башарина, В.Г. Артюхов

Воронежский государственный университет

Выявлен факт повышения функциональной активности нейтрофилов при лазерном облучении (540 нм) крови в диапазоне доз $0,3 \div 1,2$ Дж/см². Обсуждается механизм лазерной предстимуляции клеток, обусловленной протеканием свободнорадикальных реакций, приводящих к увеличению проницаемости мембраны для Ca²⁺. Обнаружена взаимосвязь функционирования компонентов антиоксидантной системы с процессами генерации активизированных кислородных метаболитов. Показано корректирующее действие луча лазера (0,6; 1,2 Дж/см²) на каталитическую активность супероксиддисмутазы и каталазы нейтрофилов.

В последние годы широкое распространение в клинической практике получило применение низкоинтенсивного лазерного излучения. Метод лазеротерапии оказался эффективным при лечении воспалительных заболеваний различной этиологии: сепсиса, перитонита, гнойного холангита, панкреатита, послеоперационной пневмонии и др. [1]. Излучение аргонового лазера (488/514 нм), YAG-лазера применяют в офтальмологии для лечения интраокулярных и периокулярных опухолей [2,3], в нейрохирургии [2,4], для удаления вирусноиндуцированных опухолей [2,5]. Предпосылкой фотохимически индуцированной стимуляции в биосистемах является поглощение лазерного излучения биотканью. До настоящего времени неизвестно, какая длина волны является наиболее подходящей для биохимических реакций при биостимуляции. При решении задач биостимуляции необходимо знать, на какие компоненты биосистемы надо воздействовать, чтобы запустить биохимические реакции, приводящие к ожидаемому эффекту. Поэтому эффективность лазерного облучения (ЛО) будет зависеть прежде всего от длины волны излучения, поглощаемого хромоформными группами компонентов биосистемы. Примером является так называемая "терапия голубым светом", применяемая при лечении гипербилирубинемии, которая встречается у новорожденных детей. Под действием этого света конформация билирубина изменяется таким образом, что организм может выделять этот продукт.

Элементом первой линии защиты в системе поддержания гомеостаза являются нейтрофильные лейкоциты. Поэтому для анализа механизма биологического дей-

ствия внутрисосудистого лазерного облучения крови на организм крайне интересно было выяснить, как ЛО влияет на функциональный потенциал нейтрофилов (НФ).

МЕТОДИКА

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной венозной крови (50 Ед/мл) здоровых доноров центрифугированием крови при 4000 об/мин (40 мин, 20°С) на двойном градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho=1,077$ и $1,119$ г/мл).

Гематопорфирин с полосой Соре с $\lambda_{\max}=387$ нм ($\epsilon=48 \cdot 10^3$ моль⁻¹см⁻¹) [4] получали из гемоглобина человека по прописи [6].

В опытах использовали твердотельный лазер на монокристалле аллюмината иттрия, легированного неодитом ($\lambda=540$ нм), Nd:YA. Мощность лазерного излучения определяли с помощью измерителя ИМО-24. Облучение суспензии Нф в р.Хенкса (3 мл, $5 \cdot 10^5$ клеток/мл) и крови (3 мл) проводили в термостатируемой кювете ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) при непрерывном перемешивании. Мощность луча лазера составляла 0,43 мВт, диаметр светового пятна – 0,7 см. Все исследования были проведены в диапазоне доз $0,3 \div 1,2$ Дж/см².

Определение функциональной активности фагоцитов проводили путем измерения люминол-зависимой хемиллюминесценции (ХЛ) с использованием биохимического люминометра БХЛ-06 М. С этой целью кювету, содержащую нейтрофильные лейкоциты ($5 \cdot 10^5$ клеток/мл), помещали в измерительную камеру люминометра, затем в суспензию вводили люминол в конечной концентрации $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л и в течение 40 с проводили запись спонтанной ХЛ. После этого в кювету добав-

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРОВИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ

ляли стимулятор фагоцитов – латекс (0,2 мг/мл) и регистрировали хемилюминесценцию стимулированных Нф. Измерение ХЛ-ответа нейтрофилов проводили при постоянном перемешивании и температуре 37°C.

Активность Ca^{2+} -АТФазы мембран нейтрофильных лейкоцитов регистрировали через 2 часа после облучения по методу, описанному в работе [7].

Активность супероксиддисмутазы (СОД) в супернатанте определяли по ингибированию восстановления нитросинего тетразолиевого (“Serva”, Германия) супероксидрадикалом, генерированным фотоокислением рибофлавина (“Reanal”, Венгрия) в присутствии ТЕМЕД [8]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое обеспечивает ингибирование скорости восстановления нитросинего тетразолиевого на 50%.

Для определения каталазной активности использовали метод, основанный на учете оставшегося после действия фермента пероксида водорода титрованием раствором перманганата калия [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении функциональной активности НФ было обнаружено, что ЛО (0,3÷1,2 Дж/см²) крови сопровождается усилением продукции активизированных метаболитов кислорода (АМК) (рис. 1). Видно, что происходит возрастание ХЛ-ответа Нф на после-

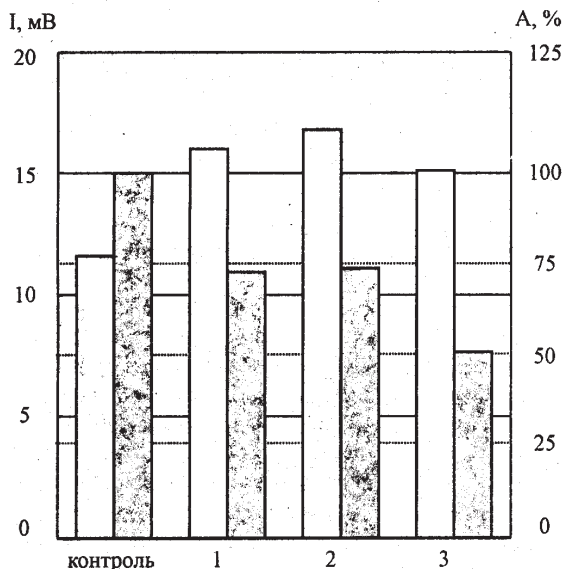


Рис. 1. Активность нейтрофилов и Ca^{2+} -АТФазы в условиях лазерного облучения в дозах 0,3 (1), 0,6 (2) и 1,2 Дж/см² (3):
 □ - интенсивность хемилюминесценции стимулированных нейтрофилов, мВ;
 ▨ - активность Ca^{2+} -АТФазы, %

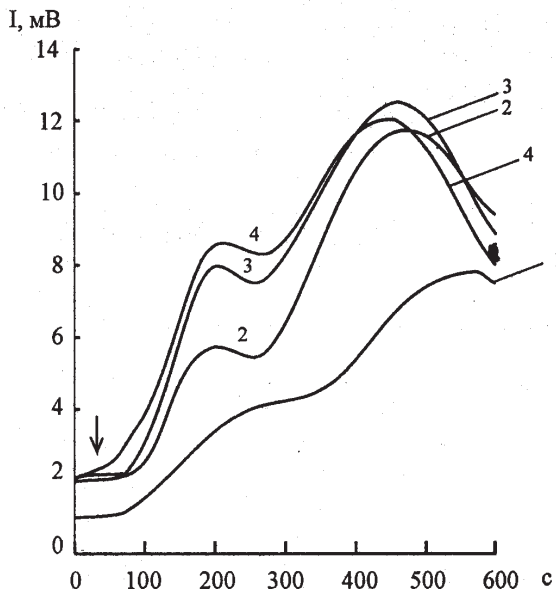


Рис. 2. Влияние лазерного облучения суспензии Нф на ХЛ-ответ нейтрофилов, индуцированный добавлением латекса (ψ), в присутствии ГП: 1 - ХЛ-ответ клеток до облучения, 2-4 - ХЛ-ответ облученных Нф в присутствии ГП в концентрациях: 2.10⁻¹⁶ (2) 4.10⁻¹⁶ (3) и 8.10⁻¹⁶ моль/л (4). По оси абсцисс - время от начала регистрации сигнала, с; по оси ординат - интенсивность хемилюминесценции, мВ. Доза лазерного облучения - 0,6 Дж/см²

дующую после ЛО стимуляцию латексом; максимальная активация наблюдается при дозе 0,6 Дж/см² и составляет 45%. Интенсивность ХЛ стимулированных Нф зависит от уровня АМК в системе, следовательно, от скорости протекания процессов, в результате которых они образуются, т. е. от работы НАДФН-оксидазного комплекса, дегрануляции Нф с освобождением миелопероксидазы (МПО) и уровня ее активности. Ранее нами было выявлено активирующее действие луча лазера на функциональные свойства МПО и скорость выброса ее в экстрацеллюлярное пространство в процессе фагоцитоза [10].

Для вскрытия механизма действия ЛО на Нф были проведены эксперименты на модельных системах с использованием экзогенного сенсibilизатора - гематопорфирина (ГП). Было обнаружено, что действие луча лазера в дозе 0,6 Дж/см² на суспензию Нф в присутствии ГП (2·10⁻¹⁶÷8·10⁻¹⁶ моль/л) сопровождается повышением интенсивности ХЛ-ответа стимулированных Нф (рис. 2); фотоактивация клеток составляет более 50%. Повышение уровня спонтанной ХЛ облученных клеток в присутствии модификатора позволяет говорить о лазер-индуцированном пероксид-

ном окислении липидов (ПОЛ). Важно отметить, что наибольший фотодинамический эффект наблюдается, когда модификатор находится в клеточной мембране или сорбирован на ней [10].

Поскольку процессы, протекающие в стимулированных Нф, Ca^{2+} -зависимые, то логично думать, что усиление ХЛ-ответа облученных фагоцитов является следствием повышения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . При изучении влияния ЛО крови на работу Ca^{2+} -насосов, ответственных за поддержание Ca^{2+} -гомеостаза в клетке, было установлено, что ЛО инактивирует Ca^{2+} -АТФазу (рис. 1). Так как регуляция ферментативной активности интегральных белков осуществляется на уровне молекулярных взаимодействий белка и аннулярных липидов [11], то изменение липидного микроокружения модифицирует организацию функционально-активной конформации белка в мембране. Продукты ПО фосфолипидов оказывают, по-видимому, ингибирующее воздействие на каталитический участок Ca^{2+} -насосов. Вместе с тем, при лазериндуцированном ПОЛ изменяется и поверхностный потенциал мембраны, что в свою очередь приводит к изменению активности Ca^{2+} -АТФазы.

Так как при ЛО крови повышается вероятность образования АМК, необходимо было выяснить, как ЛО влияет на антиоксидантную систему (АОС) крови. Методом люминол-зависимой ХЛ было обнаружено, что ЛО крови в изучаемом диапазоне доз приводит к повышению СОД-активности плазмы (рис. 3), очевидно, свя-

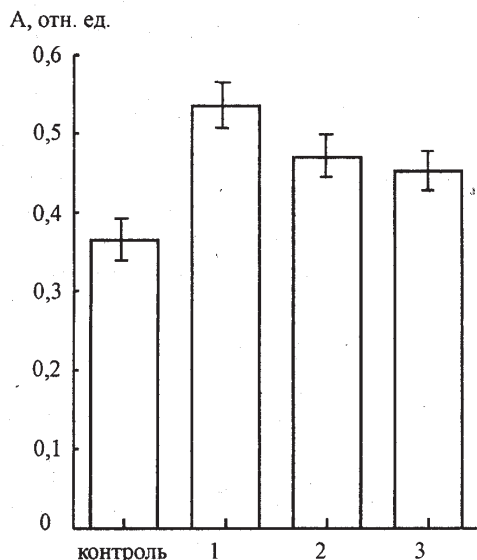


Рис. 3. Влияние лазерного облучения крови на СОД-активность плазмы. Дозы лазерного облучения: 0,3 (1), 0,6 (2) и 1,2 Дж/см² (3). За контроль принимали СОД-активность плазмы до облучения

занное в первую очередь с активацией СОД - ключевого фермента АО защиты, который характеризуется полосомами поглощения с λ_{max} , равными 530, 560 нм [12].

При изучении зависимости активности СОД и каталазы от дозы лазерного облучения крови было выявлено, что действие ЛО имеет неоднаправленный характер и зависит от исходных показателей антиоксидантной системы. По исходным показателям активности ферментов АОС исследуемые доноры были разделены на 2 группы: 1 - группа доноров с исходными показателями активности ферментов, отличающимися от среднего в область меньших значений; 2 - группа доноров, показатели СОД- и каталазной активности которых превышают средние значения. Полученные результаты в этом направлении представлены в таблице.

Таблица

Влияние лазерного облучения крови на активность супероксиддисмутазы и каталазы нейтрофилов

№ группы	Активность, ед/мг белка			
	До облучения	Доза облучения, Дж/см ²		
		0,3	0,6	1,2
1) СОД	0,304±0,025	0,452±0,026	0,504±0,03	0,525±0,036
1) каталаза	0,074±0,006	0,118±0,007	0,099±0,005	0,092±0,005
2) СОД	0,669±0,046	0,906±0,054	0,551±0,03	0,514±0,03
2) каталаза	0,172±0,013	0,177±0,01	0,168±0,01	0,098±0,005

ЛО крови в дозе 0,3 Дж/см² индуцирует фотоактивацию изучаемых ферментов обеих групп доноров. После облучения образцов крови 1-ой группы доноров в дозе 0,6 Дж/см² наблюдается повышение активности СОД и каталазы на 66 и 34% соответственно; увеличение дозы облучения не приводит к дальнейшим достоверным изменениям каталитической активности изучаемых ферментов. ЛО крови с высокими исходными исследуемыми показателями приводит к снижению СОД-активности до средних значений. Фотоинактивация каталазы индуцируется лучом лазера в дозе 1,2 Дж/см² и составляет 43%. Таким образом, обнаружено корректирующее действие луча лазера на функциональную активность супероксиддисмутазы и каталазы Нф-лейкоцитов в системе крови.

Проведенное исследование действия лазерного излучения на функциональные свойства Нф и активность Ca^{2+} -АТФазы дает основание говорить о влиянии ЛО на Ca^{2+} -зависимые пути активации клетки. Повышение концентрации Ca^{2+} в Нф в результате, с одной стороны, увеличения проницаемости мембраны для ионов Ca^{2+} , и, с другой стороны, снижения активности Ca^{2+} -АТФазы приводит к активации кальций-зависимых процессов: секреторной дегрануляции и генерации активных форм кислорода НАДФН-оксидантной системой. Следовательно, ЛО крови индуцирует прайминг (предстимуляцию) Нф-лейкоци-

МОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ОБЛУЧЕНИЯ КРОВИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ

тов. Кроме того, дозозависимое повышение АФК в облученных клетках регулирует активность цитозольных ферментов АОС - СОД и каталазы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Илларионов В.Е.* Основы лазерной терапии. М.: Респект. 1992. 122 с.
2. Прикладная лазерная медицина. / Под ред. Х.-П. Бермена, Г.И. Мюллера. Пер. с нем. М.: Интерэкспресс. 1997. 356 с.
3. *Carruth I.A., McKenzie A.L.* Medical Laser, Science and clinical practice. Bristol and Boston. 1986. Chapter 4. Ophthalmology. P. 81-105.
4. *Crullo L., Koth A.* Anaesthesiologic considerations in laser neurosurgery. Neurosurg. Rev. // 1985. № 3. P. 261-266.
5. *Aranoff B.L.* The State of Art in General Surgery and Surgical Oncology. Lasers Surg. Med. // 1986. № 6. P. 376-382.
6. *Блюменфельд Л.А.* Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода. М. Сов. Наука. 1957. 134 с.
7. *Финашин А.В., Крутин В.Д., Товстяк В.В.* // Укр. биохим. Журн. 1997. Т. 69. № 1. С. 99-103.
8. *Чумаков В.Н., Осинская Л.Ф.* // Вопр. мед. химии. 1977. № 6. С. 712-721.
9. *Землянухин А.А.* Практикум по биохимии. Воронеж. Изд-во ВГУ. 1993. С. 106-108.
10. *Артюхов В.Г., Башарина О.В., Рязанцева Л.Т.* // Теория и практика сорбционных процессов: Межвузовский сборник научных трудов. Воронеж. 2000. № 26. С. 160-164.
11. *Артюхов В.Г., Наквасина М.А.* Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами: Учеб. пособие. Воронеж: Изд-во ВГУ. 2000. 296 с.
12. *Дубинина Е.Е., Туркин В.В., Бабенко Г.А.* // Биохимия. 1992. Т.57. № 12. С. 1892-1898.