

УДК 615.849.19

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СИНЕГО, ЗЕЛЕННОГО И КРАСНОГО ДИАПАЗОНОВ НА СВОБОДНО-РАДИКАЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В КРОВИ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ЭНДОТОКСИЧЕСКОМ ШОКЕ

Т.В. Мачнева*, Н.В. Космачева, Ю.А. Владимиров, А.Н. Осипов

Российский государственный медицинский университет, Москва 117997,
ул. Островитянова 1; тел./факс 8(495)4341174; эл. почта: machneva_tv@mail.ru

Целью данной работы было исследование влияния низкоинтенсивного лазерного излучения синего (441,2 нм), зелёного (532,5 нм) и красного (632,8 нм) диапазонов на свободнорадикальные процессы в крови крыс при экспериментальном эндотоксическом шоке. В работе использовали модель эндотоксического шока, получаемую интраперитонеальным введением липополисахарида В (25 мг/кг). Были проведены измерения функциональной активности лейкоцитов крови (методом люминол-зависимой хемилюминесценции), супероксиддисмутазной активности плазмы крови (методом с нитросиним тетразолием) и окисления липидов мембран эритроцитов (по измерению флуоресценции цис-паринариевой кислоты). Обнаружено, что низкоинтенсивное лазерное излучение оказывает сильное влияние на все исследуемые процессы как в группах животных, которым вводили липополисахарид В, так и в контрольных группах. Наиболее выраженное действие излучения наблюдали в группах животных, которым вводили липополисахарид. В этих группах лазерное излучение вызывало возрастание всех исследуемых показателей. При дозе облучения (0,75 Дж/см²) наиболее эффективным оказалось излучение в зеленом диапазоне спектра. При дозе 1,5 Дж/см² сильное влияние оказывало излучение, как в зелёной, так и в красной областях спектра. Обсуждаются возможные механизмы наблюдаемых процессов.

Ключевые слова: эндотоксический шок, низкоинтенсивное лазерное излучение, хемилюминесценция, активные формы кислорода, лейкоциты, супероксиддисмутазная активность, свободнорадикальное окисление липидов.

ВВЕДЕНИЕ. Сепсис (эндотоксический шок, синдром системного воспаления (ССВ)) и последующий синдром полиорганной недостаточности (СПН) являются наиболее серьезными проявлениями внедрения бактериальной инфекции. Сегодня СПН - одна из частых причин смерти и довольно распространенный патофизиологический процесс. Около 1% всех больных и до 20-30% больных в реанимационных палатах так или иначе имеют

* - адресат для переписки

в анамнезе СПН [1]. Механизм развития эндотоксического шока в ответ на попадание бактериальных липополисахаридов (ЛПС) в организм включает в себя выброс таких медиаторов как интерлейкины, фактор некроза опухоли, оксид азота и активные формы кислорода, эйкозаноиды, фактор активации тромбоцитов и некоторые другие [2]. В результате секреции этих соединений, среди которых одну из важных ролей играют оксид азота и активные формы кислорода, происходит падение артериального давления, вазоплегия, апоптоз, ацидоз и СПН. Продукция оксида азота может приводить, кроме описанных выше процессов, к образованию нитрозильных комплексов гемсодержащих и негемовых белков, что вызывает ингибирование их ферментативной активности. Взаимодействие же оксида азота с супероксидными радикалами, продуцируемыми фагоцитами, может приводить к образованию пероксинитрита, сильного окислителя и индуктора перекисного окисления липидов. В настоящей работе мы попытались выяснить каким образом на модели эндотоксического шока могут изменяться продукция радикалов фагоцитами, супероксиддисмутазная активность плазмы крови и перекисное окисление липидов клеточных мембран при введении липополисахарида. Кроме того, мы исследовали воздействие лазерного излучения на эти процессы, предполагая, что действие излучения приведёт к частичному или полному разрушению образовавшихся нитрозильных комплексов и восстановлению их функции [3].

МЕТОДИКА.

Материалы. В работе использовали следующие реактивы: стандартный раствор Хенкса (Институт полиомиелита и вирусного энцефалита, РФ); β -никотинамидадениндинуклеотид (NADH) (“AppliChem”, Дания), 5-метилфенозинметасульфат (ФМС) (“Fluka”, Швейцария), НСТ (*n*-нитротетразолий синий) (ДиаМ, Россия), гепарин (5000 Ед), (Московский эндокринный завод), диметилсульфоксид (ДМСО) и медицинский эфир для наркоза (“Химмед”, Россия), липополисахарид В (ЛПС) (Lipopolysaccharides from *Escherichia coli* 0111:B4; “Sigma”, США), зимозан и люминол (“Serva”, США), цис-паринариевая кислота (цисПК) (“Molecular probes”, США). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации “ос.ч” и “х.ч”.

Животные. В работе использовали самцов белых беспородных крыс (НПЦ “Гидробиос”, РФ) в возрасте 3-4 месяца и массой 250-300 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария, по 1 особи в клетке, получали комплексный гранулированный корм и имели свободный доступ к воде. Всего в исследовании были сформированы 14 групп экспериментальных животных (табл. 1).

Процедура забора крови. У крыс из ретробульбарных синусов с помощью пастеровских пипеток забирали 1 мл крови в пластиковые пробирки Vacuette (“Greiner Bio-One”, Австрия) для клинических исследований с Li-гепарином, дополнительно добавляя в них раствор гепарина в физиологическом растворе в расчете 100 ед. гепарина на 1 мл крови. Забор крови производился 2 раза для каждого животного с интервалом 4 часа. Первый раз (0 ч от начала эксперимента) кровь собирали у крыс из правого ретробульбарного синуса до введения веществ (раствора липополисахарида или в контрольных группах – физиологического раствора) и до облучения. Второй раз кровь получали через 4 ч из левого ретробульбарного синуса. При обработке данных использовали отношение значений исследуемых параметров крови второго забора крови (в 4 ч) к первому (0 ч).

Таблица. Экспериментальные группы животных.

№ группы	Группы крыс	Количество крыс в группе	Воздействие		
			ЛПС, мг/кг	Облучение	
				Доза облучения, Дж/см ²	Длина волны излучения, нм
1	Контрольная	10	0	0	—
2	Шок	10	25	0	—
3	Облучение	5	0	0,75	441,2
4		6	0	0,75	532,5
5		5	0	0,75	632,8
6		4	0	1,5	441,2
7		4	0	1,5	532,5
8		10	0	1,5	632,8
9	Облучение + шок	5	25	0,75	441,2
10		5	25	0,75	532,5
11		4	25	0,75	632,8
12		4	25	1,5	441,2
13		4	25	1,5	532,5
14		5	25	1,5	632,8

Процедура выделения плазмы крови, лейкоцитов и эритроцитов крови крыс. Пробирку с кровью центрифугировали 7 минут при 400 g на центрифуге СМ-6 (Россия). После центрифугирования самый верхний слой (плазма крови) отбирали в пластиковые пробирки по 0,5 мл и замораживали. Из среднего слоя (лейкоцитарной плёнки) выделяли лейкоциты по методу Boyum [4] с некоторыми модификациями. Для этого собирали лейкоцитарную пленку, переносили её в пластиковую пробирку, добавляли до 10 мл 0,83% NH_4Cl и выдерживали 5 минут для проведения щадящего гемолиза, попавших в пробу эритроцитов. Далее клетки дважды отмывали в стандартном растворе Хенкса (рН 7,45). К конечному клеточному осадку добавляли стандартный раствор Хенкса с таким расчётом, чтобы количество клеток было $1,5 \times 10^5$ в 150 мкл. Выход лейкоцитов составлял 85-95%. Жизнеспособность клеток, определяемая в тесте с трипановым синим, была не менее 97%. Пробирки с клетками хранили в темноте в воде со льдом. Клетки использовали в течение 5 ч.

Для выделения эритроцитов использовалась самая нижняя фракция после отбора плазмы крови и лейкоцитарной плёнки. Эритроциты отмывали в стандартном растворе Хенкса (рН 7,45) дважды (900 g, 10 мин.). К конечному клеточному осадку добавляли 4 мл стандартного раствора Хенкса. После подсчёта клетки замораживали в пластиковых пробирках по 1,5 мл в количестве 1×10^9 клеток в пробирке.

Расчёт количества клеток проводили с помощью камеры Горяева.

Процедура экстракции липидов из эритроцитов крови крыс. В день измерения флуоресценции цис-паринариевой кислоты в липидах мембран эритроцитов размораживали образцы эритроцитов и центрифугировали при 4°C и 4600 g 30 мин. на центрифуге Rotina 38R ("Hettich zentrifugen", Германия). Далее надосадочную жидкость отбрасывали (в осадке оставались тени эритроцитов). Для разделения липидной и белковой фракций применяли экстракцию в системе хлороформ : метанол : вода в отношении 5 : 1 : 4. Экстракцию проводили в пластиковых пробирках на 1 мл на вортексе ("Yellow line TTS2", США) при максимальных оборотах (2500 об/мин.) в течение 30 с,

затем на ультразвуковой бане (“Сапфир”, ЗАО ПКФ, Россия) 60 с и снова на вортексе до полного растворения осадка. После экстракции суспензию снова центрифугировали при 4°C и 4600 g 30 мин. Затем осторожно отбирали нижний хлороформенный слой, содержащий липидный экстракт из теней эритроцитов.

Модель эндотоксического шока и методика проведения эксперимента. Использовали стандартную модель получения эндотоксического шока [5-7]. Для этого крысам вводили липополисахарид В из расчёта 25 мг/кг. В контрольных группах животным вводили эквивалентное количество физиологического раствора. Все инъекции делали внутрибрюшинно сразу после первого забора крови.

Для проведения эксперимента каждая крыса вводилась в состояние наркоза, затем проводился забор крови и вводился ЛПС в группах с шоком. Через 3 ч после начала эксперимента в соответствующих группах крысам проводили лазерное облучение уха. А через 4 ч – осуществлялся повторный забор крови. В обоих случаях (в начале эксперимента – 0 ч и через 4 ч) из крови выделяли лейкоциты – для определения их функциональной активности, плазму крови для определения супероксиддисмутазной активности и эритроциты – для регистрации уровня окисления липидов. Все три выбранных параметра исследования, с нашей точки зрения, наиболее информативны в описании свободнорадикальных процессов в крови. При этом отражаются как прооксидантные (регистрация уровня окисления липидов мембран эритроцитов) и антиоксидантные (изменении супероксиддисмутазной активности плазмы крови) показатели, а также возможные последствия изменения этих параметров (исследование функциональной активности лейкоцитов).

Таким образом, все исследуемые образцы в данной работе получали дважды – в 0 и через 4 ч после начала эксперимента. Результаты исследования были представлены в виде отношения исследуемых параметров в 4 и в 0 ч соответственно. Выбор такого временного интервала обусловлен наиболее быстрым и существенным развитием эндотоксического шока к 4 ч после инфицирования, т.е. в данном случае после введения ЛПС [8].

Процедура облучения животных. В работе использовались гелий-кадмиевый лазер с длиной волны излучения 441,2 нм (“Plasma”, Россия), твёрдотельный лазер с длиной волны излучения 532,5 нм (“LaserCompact”, Россия) и гелий-неоновый лазер УЛФ-01 с длиной волны излучения 632,8 нм (Россия), которые относятся к синему, зелёному и красному диапазонам видимого спектра соответственно. Далее в тексте для сокращения возможно использование выражений “облучение синим, зелёным или красным лазерами”, что означает облучение лазерами в синем, зелёном или красном диапазонах видимого спектра соответственно. Мощность лазерного излучения измерялась на уровне уха и составляла для синего лазера 20 мВт, а для красного и зелёного 9 мВт. В эксперименте использовали одинаковые дозы облучения. Облучение проводили через 3 часа после первого забора крови. Животных вводили в наркоз, после чего облучали внутреннюю поверхность уха таким образом, чтобы центр пучка лазера попадал на центр облучаемой зоны. Группы крыс без облучения подвергались тем же манипуляциям, но не облучались. Расчёт дозы облучения проводился по стандартной и указанной нами ранее методике [9, 10].

Измерение люминол-зависимой хемилюминесценции лейкоцитов крови крыс. Процедура измерения хемилюминесценции (ХЛ) лейкоцитов была стандартной и подробно представлена в предыдущих работах [9, 10]. Объём пробы

составлял 3 мл, количество клеток в пробе – 150 тысяч. Также в состав пробы входили 100 мкл люминола (4×10^{-3} М) и 200 мкл зимозана (2,0 мг/мл).

Добавление зимозана приводило к активации лейкоцитов, после чего регистрировали активированную ХЛ (рис. 1). Интенсивность ХЛ выражали в отн. ед., характеризующих разность между максимальным уровнем активированной ХЛ и уровнем спонтанной ХЛ (без зимозана). Функциональную активность оценивали по хемилюминесцентному ответу в виде отношения I_{II}/I_I , где I_I – интенсивность хемилюминесценции лейкоцитов, выделенных из крови в начале эксперимента (0 ч, до введения препаратов и облучения), I_{II} – интенсивность хемилюминесценции лейкоцитов, выделенных из крови через 4 ч после начала эксперимента (рис. 2).

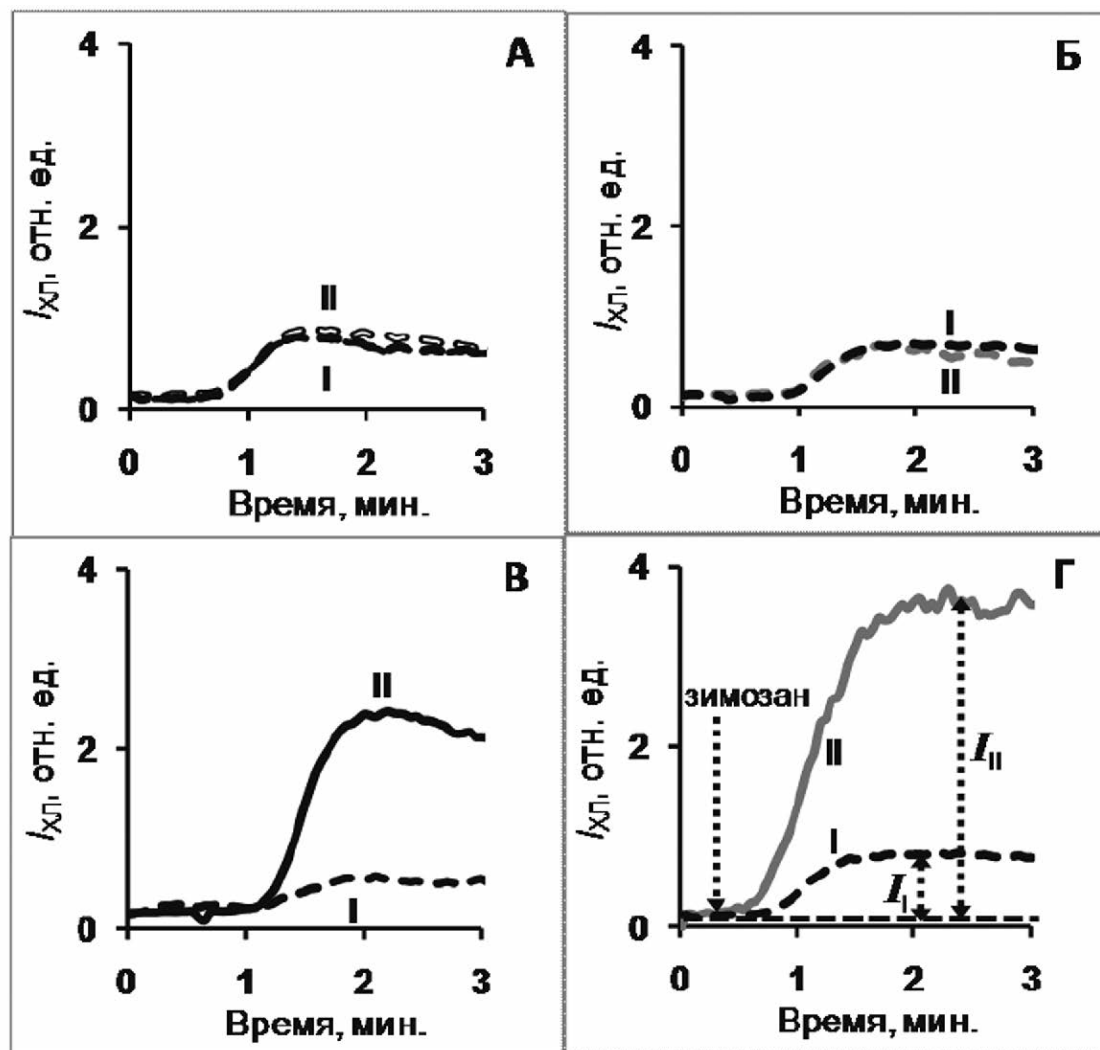


Рисунок 1.

Типичные кривые хемилюминесценции лейкоцитов крови крыс без (А, В) и с введением (Б, Г) липополисахарида. А, Б - без облучения. В, Г - с облучением гелий-неоновым лазером (632,8 нм) в дозе 1,5 Дж/см². По оси ординат $I_{ХЛ}$ - интенсивность хемилюминесценции лейкоцитов.

I (на всех графиках) - без облучения, без липополисахарида, начало эксперимента, первый забор крови, 0 ч. II (на всех графиках) - второй забор крови, 4 ч после первого забора крови.

IIА - без облучения, без липополисахарида. IIБ - без облучения, с липополисахаридом (25 мг/кг).

IIВ - с облучением, без липополисахарида. IIГ - с облучением, с липополисахаридом.

I_I - интенсивность хемилюминесцентного ответа в 0 ч, I_{II} - в 4 ч.

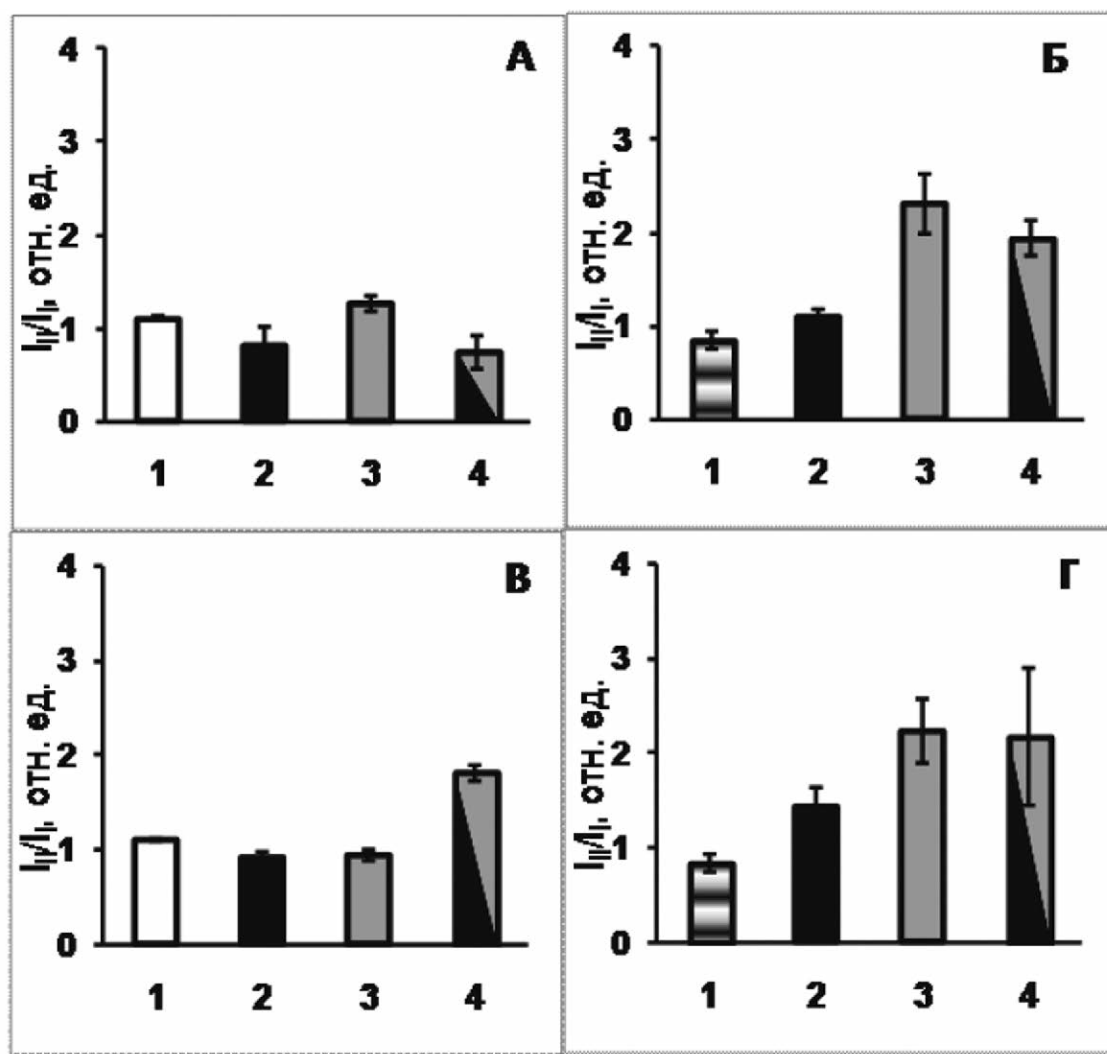


Рисунок 2.

Влияние лазерного излучения на функциональную активность лейкоцитов крови крыс без (А, В) и с введением (Б, Г) липополисахарида. Дозы облучения: 0,75 Дж/см² (А, Б) и 1,5 Дж/см² (В, Г). 1 - без облучения, 2 - облучение лазером в синем (441,2 нм), 3 - в зелёном (532,5 нм), 4 - в красном (632,8 нм) диапазонах спектра.

По оси ординат: I_{II}/I_I , где I_{II} - максимальная интенсивность хемилюминесценции лейкоцитов, выделенных из крови через 4 часа после начала эксперимента (второй забор крови), I_I - максимальная интенсивность хемилюминесценции лейкоцитов, выделенных из крови в начале эксперимента (первый забор крови, 0 ч).

Определение супероксиддисмутазной активности плазмы. На данном этапе работы использовали стандартную методику, где в качестве системы генерации супероксидных радикалов применяли реакцию окисления восстановленного β -никотинамидадениндинуклеотида 5-метил-феназинметасульфатом [11]. В качестве перехватчика радикалов использовали нитросиний тетразолий. Подробное описание метода представлено нами ранее [9]. Результаты выражали в виде относительной супероксиддисмутазной активности (СОД-активность, $A_{\text{СОД}}$) плазмы крови, рассчитанной как отношение $A_{\text{СОД II}}/A_{\text{СОД I}}$, где $A_{\text{СОД I}}$ - СОД активность плазмы крови, выделенной из крови в начале эксперимента (0 ч), $A_{\text{СОД II}}$ - СОД активность плазмы крови через 4 ч после начала эксперимента.

Регистрация флуоресценции *цис*-паринариевой кислоты в присутствии липидов, экстрагированных из эритроцитов крови крыс. Для регистрации флуоресценции *цис*-паринариевой кислоты в присутствии липидов, экстрагированных из эритроцитов крови крыс, использовали стандартную методику [12-15, 20] и флуориметр Fluorescence spectrophotometer MPF-4 ("Hitachi", Япония). В кювету для флуоресценции добавляли 250 мкл хлороформенного экстракта, содержащего липиды из 1 миллиарда эритроцитов и 10 мкл 260 мкМ раствора *цис*-паринариевой кислоты в этаноле, а затем измеряли флуоресценцию *цис*-паринариевой кислоты в диапазоне 350–500 нм при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{ex}}=310$ нм (рис. 3). Далее исследуемую пробу выдерживали в термостате при 37°C 60 мин. Затем измерение флуоресценции повторялось. При совместном инкубировании липидов тений эритроцитов и *цис*-паринариевой кислоты при 37°C происходило окисление *цис*-паринариевой кислоты, что наблюдали по уменьшению интенсивности в спектре её флуоресценции. Для контроля проводили инкубирование в тех же условиях одной только *цис*-паринариевой кислоты без тений эритроцитов. При этом снижения свечения кислоты не происходило (результаты не представлены), что свидетельствует об отсутствии процесса её автоокисления.

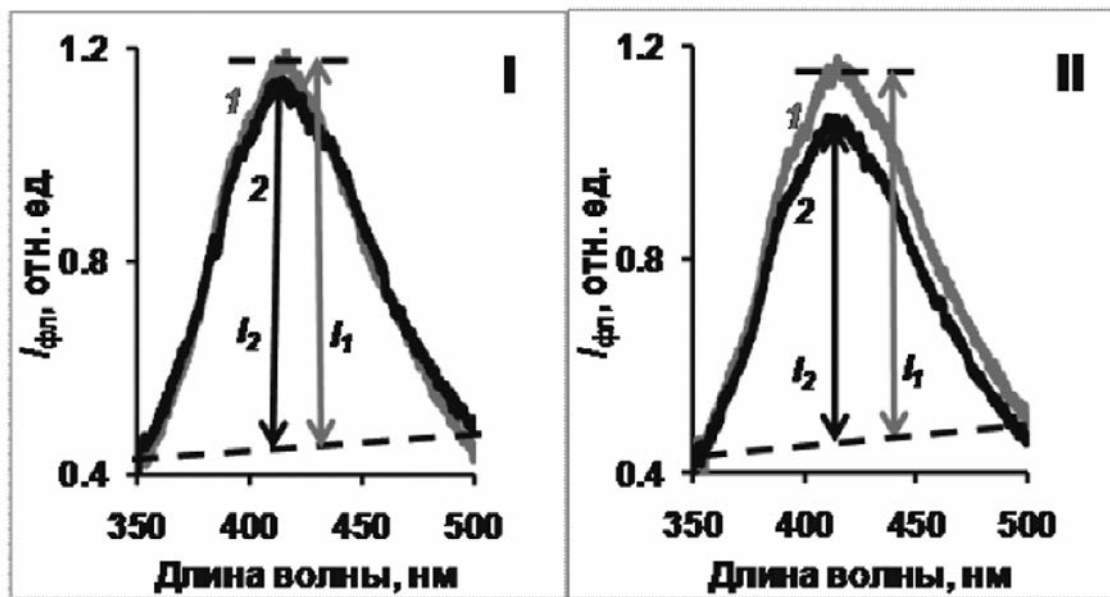


Рисунок 3.

Типичные кривые флуоресценции *цис*-паринариевой кислоты в липидах, экстрагированных из эритроцитов крови крыс. Представлены кривые, полученные для крысы, которой вводили липополисахарид (25 мг/кг) и облучали лазером (532,5 нм, 0,75 Дж/см²). I - 0 ч после начала эксперимента (первый забор крови). II - 4 ч после начала эксперимента (второй забор крови). Липополисахарид вводили сразу после первого забора крови.

Облучение проводили через три часа после начала эксперимента. 1 (на всех графиках) - 0 мин инкубации липидов эритроцитов с *цис*-паринариевой кислотой. 2 (на всех графиках) - 60 мин инкубации липидов эритроцитов с *цис*-паринариевой кислотой при 37°C в темноте. По оси ординат: $I_{\text{фл}}$ - интенсивность флуоресценции *цис*-паринариевой кислоты в липидах эритроцитов. Длина волны возбуждения - 310 нм, флуоресценции - 416 нм. По результатам данного исследования рассчитывали процент падения флуоресценции: $\text{ПФ} = 100\% (I_1 - I_2)/I_1$.

При обработке результатов рассчитывали процент падения флуоресценции (ПФ):

$$\text{ПФ} = 100\% \frac{(I_1 - I_2)}{I_1},$$

где I_1 и I_2 – максимальные интенсивности флуоресценции в 0 мин и через 60 мин инкубации пробы при 37°C соответственно. Результаты представляли в виде отношения процентов падения флуоресценции в начале эксперимента ПФ_I (0 ч) и через 4 ч после начала эксперимента ПФ_{II}: ПФ_{II} / ПФ_I.

Статистическая обработка результатов. Данные представлены в виде среднего значения ± ошибка средней.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Исследования проводили на группах крыс без шока и с шоком. В обоих случаях контрольные группы не подвергались облучению лазером. В опытных же группах проводили лазерную терапию в синем, зелёном или красном диапазонах видимого спектра в двух дозах – 0,75 Дж/см² и 1,5 Дж/см². Подробное описание экспериментальных групп представлено в таблице. В группах животных без шока мы имели возможность исследовать действие собственно лазерного облучения на изучаемые параметры. В группах животных с шоком, с одной стороны, представляют интерес особенности фотовоздействия на свободнорадикальные процессы в условиях их начального изменения, с другой стороны, - важно оценить эффективность низкоинтенсивного видимого излучения в коррекции исследуемых процессов в условиях шока.

В первой серии экспериментов мы исследовали изменения функциональной активности лейкоцитов в крови крыс, которым вводили ЛПС В, а также действие лазерного облучения. Функциональную активность клеток оценивали по интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции в ответ на добавление зимозана.

Типичные кинетические кривые хемилюминесценции лейкоцитов животных, подвергшихся действию ЛПС и/или излучения He-Ne лазера, представлены на рисунке 1. Можно видеть, что введение ЛПС вызывает незначительное снижение хемилюминесценции лейкоцитов через 4 ч (рис. 1Б), в то время как в контрольной группе активность лейкоцитов за это время несколько увеличивалась (рис. 1А). Облучение животных светом He-Ne лазера само по себе или в сочетании с введением липополисахарида приводило к возрастанию хемилюминесцентного ответа в 2-3 раза.

Представляло интерес сравнить действие лазерного излучения разных длин волн и различной интенсивности. С этой целью мы использовали 3 типа лазеров: He-Ne (красный, 632,8 нм), твёрдотельный (зелёный, 532,5 нм) и He-Cd лазер (синий, 441 нм). Данные всех экспериментов представлены на рисунке 2. В контрольной группе животных (не подвергавшихся ни действию лазерного излучения, ни ЛПС) активность белых клеток крови практически не изменялась (наблюдалось возрастание в 1,11±0,02 раз) (рис. 2А,В, столбец 1), а у крыс, которым вводили липополисахарид, уменьшалась немного, но статистически достоверно (p=0,002) до 0,85±0,09 раз (рис. 2Б,Г, столбец 1). Необходимо отметить, что для оценки достоверности различий между экспериментальными группами животных мы использовали непараметрический критерий Манна-Уитни, так как количество особей в выборках было недостаточное (от 4 до 10 – см. табл. 1) для точной параметрической оценки. Полученные результаты согласуются с данными

литературы [16] и свидетельствуют о снижении продукции лейкоцитами активных форм кислорода, продуцируемых NADPH-оксидазой и миелопероксидазой, а также об угнетении способности к хемотаксису и агрегации при эндотоксиновом шоке [16-18]. Такое угнетение функций лейкоцитов при введении ЛПС является следствием чрезмерной активации этих клеток, вследствие прямого контакта рецепторов лейкоцитов с ЛПС, что в конечном итоге приводит к полной дисфункции этих клеток [16, 19].

При лазерном облучении в дозе 0,75 Дж/см² в группах животных без введения ЛПС (рис. 2А, столбцы 2-4) нами не обнаружено достоверного изменения функциональной активности лейкоцитов.

Однако в группах животных, получавших ЛПС (рис. 2Б), мы наблюдали статистически достоверное увеличение активности лейкоцитов во всех группах. Можно видеть, что при облучении лазером в зелёном (рис. 2Б, столбец 3) и красном (рис. 2Б, столбец 4) диапазонах спектра происходило возрастание хемилюминесценции клеток в $2,31 \pm 0,32$ ($p=0,003$) и $1,93 \pm 0,19$ ($p=0,007$) раза соответственно. После облучения синим лазером также происходил рост хемилюминесцентного ответа лейкоцитов, но менее выраженный ($1,11 \pm 0,07$ ($p=0,03$)).

При увеличении дозы лазерного облучения до 1,5 Дж/см² (рис. 2В,Г) более эффективным оказалось облучение красным лазером. Так, в группе животных, не получавших инъекцию ЛПС (рис. 2В, столбец 4), обнаружено увеличение хемилюминесцентного ответа лейкоцитов в $1,81 \pm 0,07$ ($p=0,0001$) раза. С другой стороны, в группе животных, которым вводили ЛПС (рис. 2Г, столбец 4), наблюдалось возрастание активности в $2,17 \pm 0,73$ раз, однако оно не было статистически достоверным ($p=0,5$).

У животных, не получавших ЛПС (рис. 2В), облучение синим (рис. 2В, столбец 2) и зелёным (рис. 2В, столбец 3) лазером практически не приводило к изменению активности клеток ($0,93 \pm 0,05$ ($p=0,01$) и $0,95 \pm 0,06$ ($p=0,02$) раз соответственно). В случаях, когда животным вводили ЛПС (рис. 2Г), лейкоциты активировались в $1,44 \pm 0,18$ ($p=0,01$) и $2,23 \pm 0,34$ ($p=0,01$) раз для синего (рис. 2Г, столбец 2) и зеленого (рис. 2Г, столбец 3) диапазонов соответственно.

В следующей серии экспериментов мы проводили измерение процессов перекисного окисления в липидах мембран эритроцитов крыс. Для этого мы использовали метод, основанный на измерении флуоресценции *цис*-паринариевой кислоты (цисПК) [12-15, 20]. Известно, что флуоресценция цисПК снижается при её окислении свободными радикалами. На рисунках 3 I и II приведены спектры флуоресценции цисПК, полученные при её инкубации с липидами в течение 60 мин. Уровень снижения свечения цисПК свидетельствует о количестве быстро окисляемых липидов в образце. Для сравнения изменений в липидах мы рассчитывали процент падения флуоресценции: $ПФ = 100\% (I_1 - I_2)/I_1$. Результаты представляли в виде отношения процентов падения через 4 ч ($ПФ_{II}$) к соответствующей величине в начале эксперимента ($ПФ_I$). Необходимо отметить, что инкубация цисПК в отсутствие липидов мембран эритроцитов не приводила к снижению её флуоресценции (данные не приведены).

На рисунке 4 приведены результаты исследования окисления липидов эритроцитарных мембран животных, которым вводили ЛПС и на которые воздействовали лазерным излучением. Мы обнаружили, что при инкубации цисПК с липидами эритроцитов животных, которым вводили ЛПС (рис. 4А,Б,В,Г, столбец 1), не происходит сильных изменений флуоресценции цисПК ($0,68 \pm 0,06$ и $0,58 \pm 0,05$) соответственно.

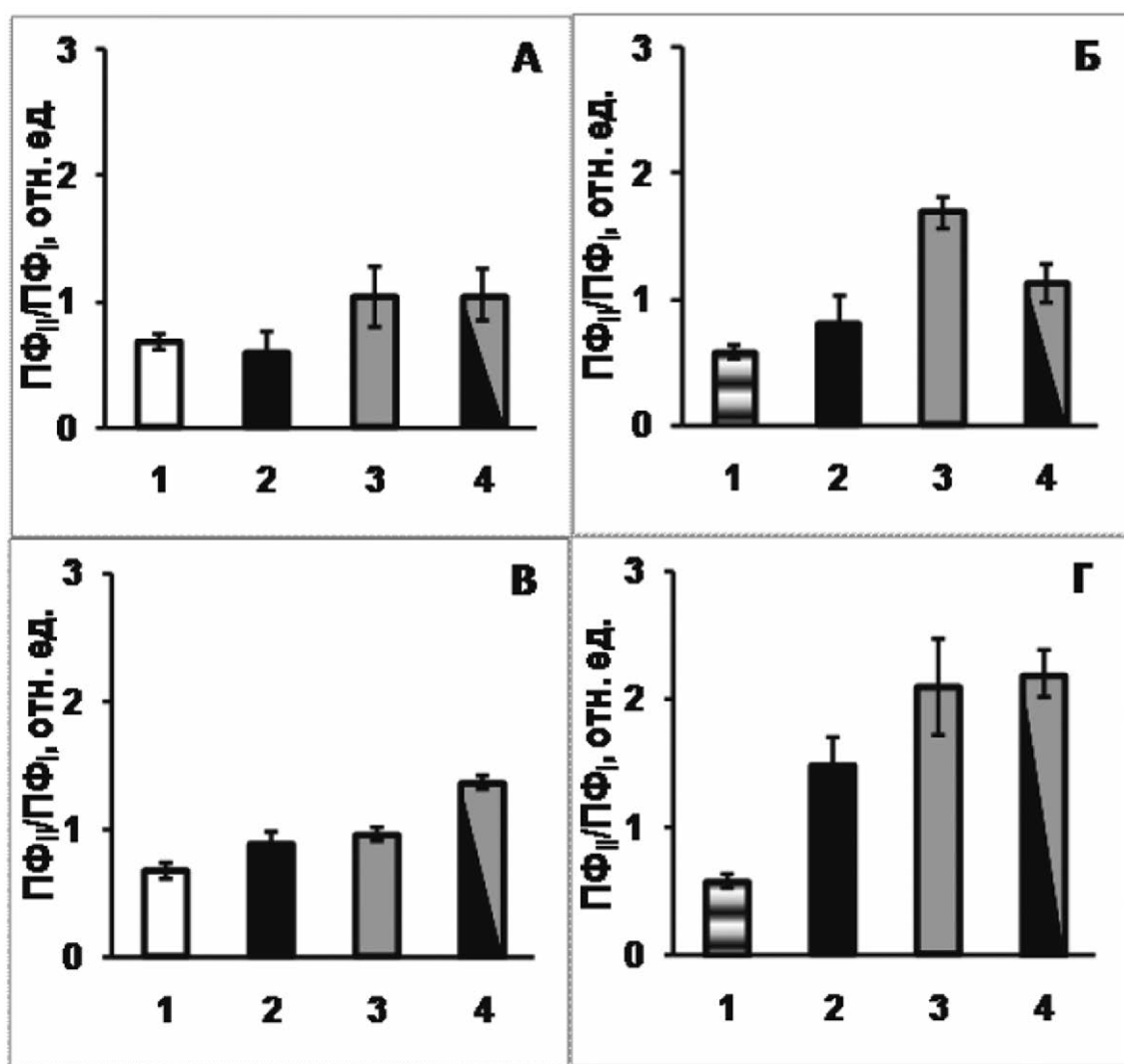


Рисунок 4.

Влияние лазерного излучения на флуоресценцию *цис*-паринариевой кислоты в липидах, экстрагированных из мембран эритроцитов крыс без (А, В) и с введением (Б, Г) липополисахарида. Дозы облучения: 0,75 Дж/см² (А, Б) и 1,5 Дж/см² (В, Г). 1 - без облучения, 2 - облучение лазером в синем (441,2 нм), 3 - в зелёном (532,5 нм), 4 - в красном (632,8 нм) диапазонах спектра. По оси ординат: $PFI/PFII$, где PFI и $PFII$ - % падения флуоресценции *цис*-паринариевой кислоты в липидах эритроцитов, выделенных из крови в начале эксперимента (первый забор крови, 0 ч, PFI) и через 4 ч после начала эксперимента (второй забор крови, $PFII$) соответственно.

При облучении в дозе 0,75 Дж/см² животных, которым не вводили ЛПС, в синем и зелёном диапазонах спектра, достоверного отличия от контроля также обнаружено не было (рис. 4А, столбцы 2,3). Облучение красным лазером вызывало статистически достоверный рост изменений в интенсивности флуоресценции, который составил $1,05 \pm 0,20$ ($p=0,03$). Однако, в группах крыс, которым вводили ЛПС и кроме того облучали зелёным лазером (рис. 4Б, столбец 3), происходило заметное увеличение окисления липидов в $1,69 \pm 0,12$ ($p=0,001$) раза. При облучении красным лазером изменения составляли $1,14 \pm 0,15$ ($p=0,03$) раза. Облучение же синим лазером (рис. 4Б, столбец 2) практически не дало никакого эффекта.

При дозе $1,5 \text{ Дж/см}^2$ действие лазерного излучения оказалось более выраженным. Так, в группах животных, которым не вводили ЛПС (рис. 4В), наблюдалось увеличение уровня окисления липидов после облучения красным лазером (рис. 4В, столбец 4) в $1,37 \pm 0,05$ ($p=0,0002$) раза, и зелёным лазером (рис. 4В, столбец 3) – в $0,96 \pm 0,06$ ($p=0,02$) раза. После облучения синим лазером (рис. 4В, столбец 2) достоверного эффекта выявлено не было.

В группах крыс, которые получали инъекцию ЛПС (рис. 4Г), облучение красным лазером (рис. 4Г, столбец 4) способствовало усилению окисления липидов в $2,19 \pm 0,19$ раза ($p<0,001$), облучение зелёным лазером (рис. 4Г, столбец 3) – в $2,09 \pm 0,37$ раза ($p<0,01$), а синим лазером (рис. 4Г, столбец 2) – в $1,47 \pm 0,22$ раза ($p<0,01$).

В последней серии экспериментов мы исследовали изменение супероксиддисмутазной активности ($A_{\text{СОД}}$) плазмы крови при действии лазерного облучения на крыс при введении ЛПС (рис. 5).

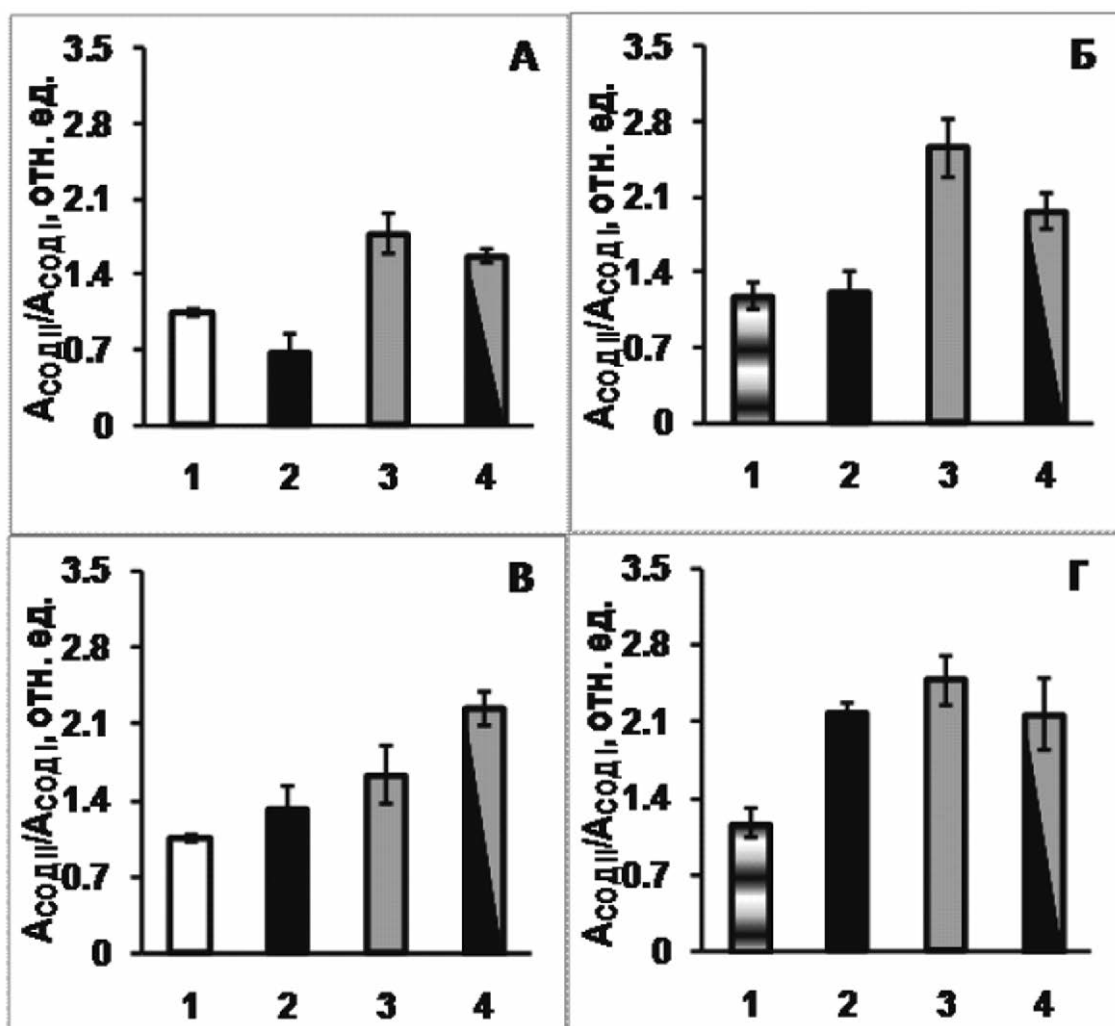


Рисунок 5.

Влияние лазерного излучения на супероксиддисмутазную активность плазмы крови крыс без (А, В) и с введением (Б, Г) липополисахарида. Дозы облучения: $0,75 \text{ Дж/см}^2$ (А, Б) и $1,5 \text{ Дж/см}^2$ (В, Г). 1 - без облучения, 2 - облучение лазером в синем (441,2 нм), 3 - в зелёном (532,5 нм), 4 - в красном (632,8 нм) диапазонах спектра. По оси ординат: $A_{\text{СОД II}}/A_{\text{СОД I}}$, где $A_{\text{СОД II}}$ и $A_{\text{СОД I}}$ - СОД активность плазмы крови крыс, выделенной в начале эксперимента (первый забор крови, 0 ч, $A_{\text{СОД I}}$) и через 4 ч после начала эксперимента (второй забор крови, $A_{\text{СОД II}}$) соответственно.

Мы обнаружили, что в контрольной группе животных (без ЛПС и без облучения) (рис. 5А,В, столбец 1) за 4 ч эксперимента $A_{\text{СОД}}$ практически не изменялась; соотношение $A_{\text{СОД II}} / A_{\text{СОД I}}$ составляло $1,05 \pm 0,03$. В группе животных, которым вводили ЛПС (рис. 5Б,Г, столбец 1), прирост СОД активности: $A_{\text{СОД II}} / A_{\text{СОД I}} = 1,17 \pm 0,12$ был статистически недостоверен.

При дозе облучения $0,75 \text{ Дж/см}^2$ в группах животных, которым не вводили ЛПС и облучали зелёным (рис. 5А, столбец 3) и красным (рис. 5А, столбец 4) лазерами, происходило увеличение СОД активности плазмы крови в $1,78 \pm 0,19$ ($p < 0,001$) и $1,57 \pm 0,06$ ($p < 0,01$) раз соответственно. В группе крыс, облучённых синим лазером (рис. 5А, столбец 2), мы обнаружили падение $A_{\text{СОД}}$ в $0,68 \pm 0,16$ ($p < 0,003$) раз. В группах животных, которым вводили ЛПС мы наблюдали увеличение $A_{\text{СОД}}$ после облучения зелёным лазером (рис. 5Б, столбец 3) в $2,56 \pm 0,27$ ($p < 0,003$) раз и красным лазером (рис. 5Б, столбец 4) – в $1,97 \pm 0,17$ ($p < 0,03$) раза.

Увеличение дозы лазерного облучения до $1,5 \text{ Дж/см}^2$ (рис. 5В,Г) почти во всех группах привело к росту СОД активности плазмы крови. Так, в группах животных, которые не получали ЛПС и подвергались облучению красным (рис. 5В, столбец 4) и зелёным (рис. 5В, столбец 3) лазером, отмечено увеличение $A_{\text{СОД}}$ в $2,24 \pm 0,14$ ($p < 0,0001$) и в $1,63 \pm 0,27$ ($p < 0,02$) раза соответственно. В группах животных, которым вводили ЛПС (рис. 5Г) при облучении всеми тремя типами лазеров, было обнаружено выраженное возрастание СОД активности плазмы. При этом облучение синим лазером (рис. 5Г, столбец 2) увеличивало СОД активность в $2,18 \pm 0,09$ раза ($p < 0,01$), зелёным – в $2,47 \pm 0,22$ раза ($p < 0,001$), а красным – в $2,17 \pm 0,32$ раза ($p < 0,08$).

ОБСУЖДЕНИЕ. Из трёх исследованных нами параметров изменение супероксиддисмутазной активности плазмы крови является наиболее чувствительным показателем при изучении влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на развитие процесса эндотоксического шока. Возрастание $A_{\text{СОД}}$ может свидетельствовать о том, что лазерное облучение само по себе вызывает оксидативный стресс (рис. 5А,В). При введении ЛПС (рис. 5Б,Г) данный эффект существенно возрастает. Эти результаты согласуются с данными по изменению уровня окислительных процессов в липидах мембран эритроцитов (рис. 4). Можно полагать, что повышение уровня свободнорадикальных процессов в липидах мембран эритроцитов вызывает ответное изменение в системе антиоксидантной защиты. С другой стороны, окисление липидов в мембранах таких клеток, как лейкоциты, может вызывать прайминг, то есть изменение их активности [21, 22] (рис. 2). Изменение активности лейкоцитов при шоковом состоянии может иметь двоякий эффект и требует дальнейшего исследования. С одной стороны, увеличение функциональной активности лейкоцитов позволит снизить количество нитрозильных комплексов гемсодержащих и негемовых соединений, а повышенная продукция оксида азота лейкоцитами должна способствовать улучшению микроциркуляции. С другой стороны, увеличение количества активных форм кислорода может вести к повреждению мембран интактных клеток (например, эритроцитов; см. рис. 4) и нарушению их функций. Возросшая продукция супероксид анион-радикала может приводить к взаимодействию с оксидом азота и образованию токсичного пероксинитрита. При этом изменение уровня окисления липидов коррелирует с изменением антиоксидантной активности (рис. 4, 5).

Необходимо отметить, что при малых дозах облучения ($0,75 \text{ Дж/см}^2$) наиболее выраженные эффекты наблюдались при облучении в зелёном

диапазоне спектра. При увеличении дозы облучения до 1,5 Дж/см² эффективность излучения возрастала, как в зеленой, так и в красной областях спектра. Во всех случаях наиболее эффективная доза облучения для красного лазера была больше, чем для синего и зелёного. Это может быть косвенным подтверждением гипотезы о порфиринах, как первичных фотоакцепторах [22, 23], поскольку экстинкция порфиринов снижается от синей к красной области спектра [24]. Незначительные эффекты в синей области спектра по сравнению с красной и зелёной могут быть следствием того, что для достижения максимального эффекта в синем диапазоне необходимо использовать меньшую дозу облучения, чем 0,75 Дж/см².

ВЫВОДЫ. Подводя итог, можно отметить следующее: индукция эндотоксического шока немного снижает способность лейкоцитов образовывать свободные радикалы, обнаруживаемые по хемилюминесценции, и практически не изменяет интенсивность перекисного окисления липидов и антиоксидантную активность плазмы крови. Лазерное облучение само по себе вызывает слабое повышение продукции радикалов лейкоцитами или интенсификацию перекисного окисления, но в сочетании с введением ЛПС эти эффекты усиливаются.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, гранты 10-04-01147а и 08-04-01074-а.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Anonimous* (1990) MMWR Morb. Mortal Wkly Rep., **39**, 31-34.
2. *Wolkow P.P.* (1998) Inflamm. Res., **47**, 152-166.
3. *Osipov A.N., Borisenko G.G., Vladimirov Y.A.* (2007) Biochemistry (Moscow), **72**, 1491-1504.
4. *Boyum A.* (1968) Scand. J. Clin. Invest., **21**, 77-89.
5. *Karima R., Matsumoto S., Higashi H., Matsushima K.* (1999) Mol. Med. Today, **5**, 123-132.
6. *Victor V.M., Guayerbas N., Garrote D., Del Rio M., De la Fuente M.* (1999) Biofactors, **10**, 347-357.
7. *Kozlov A.V., Staniek K., Haindl S., Piskernik C., Öhlinger W., Gille L., Nohl H., Bahrami S., Redl H.* (2006) Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., **290**, 543-549.
8. *Мазуркевич Г.С., Багненко С.Ф.* (2004) Шок: теория, клиника, организация противошоковой защиты, Изд-во Политехника, Санкт-Петербург.
9. *Мачнева Т.В., Протопопов Д.М., Владимиров Ю.А., Осипов А.Н.* (2008) Биофизика, **53**, 894-901.
10. *Клебанов Г.И., Шураева Н.Ю., Чичук Т.В., Осипов А.Н., Руденко Т.Г., Шехтер А.Б., Владимиров Ю.А.* (2005) Биофизика, **50**, 1137-1144.
11. *Halliwel B., Gutteridge J.M.C.* (2001) Free Radicals in Biology and Medicine, Изд-во Oxford University Press, National institute of educational library, Singapore.
12. *Steenbergen R.H., Drummen G.P., Op den Kamp J.A., Post J.A.* (1997) Biochim. Biophys. Acta, **1330**, 127-137.
13. *Van den Berg J.J., Kuypers F.A., Qju J.H., Chiu D., Lubin B., Roelofsen B., Op den Kamp J.A.* (1988) Biochim. Biophys. Acta, **944**, 29-39.
14. *McKenna R., Kezdy F.J., Epps D.E.* (1991) Anal. Biochem., **196**, 443-450.

15. *Kagan V.E., Ritov V.B., Tyurina Y.Y., Tyurin V.A.* (1998) *Methods Mol. Biol.*, **108**, 71-87.
16. *Pascual C., Karzai W., Meier-Hellmann A., Bredle D.L., Reinhart K.* (1997) *Intensive Care Med.*, **23**, 743-748.
17. *Vilim V., Wilhelm J.* (1989) *Free Radic. Biol. Med.*, **6**, 623-629.
18. *Barroso-Aranda J., Zweifach B.W., Mathison J.C., Schmid-Schonbein G.W.* (1995) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **25**, S23-S29.
19. *Victor V.M., Minano M., Guayerbas N., Del Rio M., Medina S., De la Fuente M.* (1998) *Mol. Cell Biochem.*, **189**, 25-31.
20. *Sklar L.A.* (1980) *Mol. Cell. Biochem.*, **32**, 169-177.
21. *Клебанов Г.И., Чичук Т.В., Владимиров Ю.А.* (2001) Биологические мембраны, **18**, 42-50.
22. *Владимиров Ю.А.* (1994) Три гипотезы о механизме действия лазерного облучения на клетки и организм человека, Изд-во Института Биомедицинской Химии РАМН, Москва.
23. *Клебанов Г.И., Чичук Т.В., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А.* (2005) Биофизика, **50**, 713-718.
24. *Гуринович Г.П., Севченко А.Н., Соловьев К.Н.* (1963) Успехи физических наук, **LXXIX**, 173-234.

Поступила: 14. 05. 2010.

EFFECTS OF LOW POWER LASER RADIATION OF BLUE, GREEN AND RED RANGES ON FREE RADICAL PROCESSES IN RAT BLOOD IN ENDOTOXIC SHOCK

T.V. Machneva, N.V. Kosmacheva, Yu.A. Vladimirov, A.N. Osipov

Russian State Medical University, ul. Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997 Russia;
tel./fax: +7(495)4341174; e-mail: machneva_tv@mail.ru

This study was performed to investigate the effects of low power laser radiation in blue (441.2 nm), green (532.5 nm) and red (632.8 nm) wavelength ranges on free radical processes in experimental endotoxic shock in rats. The experimental model was produced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide B (25 mg/kg) (LPS). The following parameters were assayed in the study: the chemiluminescent assay (to evaluate the free radical production by blood leukocytes), nitro blue tetrazolium assay (to monitor the superoxide dismutase activity of plasma) and *cis*-parinaric acid fluorescence (to estimate the intensity of lipid peroxidation in erythrocyte membranes). It was found that the low power laser radiation significantly influenced all investigated processes, in animals both treated and untreated without LPS injection. The most pronounced effects were observed in all groups of animals subjected to the low power laser radiation: at the dose of 0.75 J/cm² green laser was most effective and at the dose of 1.5 J/cm² green and red lasers provided maximal effects. The mechanisms of the observed phenomena are discussed.

Key words: endotoxic shock, low power laser radiation, chemiluminescence, reactive oxygen species, leukocytes, superoxide dismutase activity, lipid peroxidation.