

Гизингер О.А.¹, Москвин С.В.², Зиганшин О.Р.¹, Шеметова М.А.³**Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на изменения функциональной активности и скорости НАДФ-оксидазной реакции нейтрофилов периферической крови человека (экспериментальное исследование)**

Gizinger O.A., Moskvin S.V., Ziganshin O.R., Shemetova M.A.

Influence of low-intensity laser irradiation at functional activity and rate of NADPH-oxidase reaction of human peripheral blood neutrophils (an experimental study)¹ ГБОУЗ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Челябинск;² ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины ФМБА России», г. Москва;³ ГБУЗ «ЧООКВД», г. Челябинск

Представлены результаты изучения функциональной активности нейтрофилов, выделенных из периферической крови здоровых доноров. На экспериментальной модели изучены дегрануляционные возможности клеток и зарегистрировано усиление лизосомальной дегрануляции, происходящее под действием низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ). Была исследована активность одного из ключевых ферментов-оксидаз I типа, восстанавливающих молекулярный кислород-НАДФ-оксидазы. Установлено, что НИЛИ (длина волны – 635 нм, непрерывный режим, плотность мощности – 0,12 мВт/см²) стимулирует активность НАДФ-оксидазы, при этом экспозиция 90–100 с (1,5 мин) является оптимальной, что необходимо учитывать при использовании технологий лазерной терапии. *Ключевые слова:* нейтрофилы, лизосомальные гранулы, дегрануляция, НАДФ-оксидаза, низкоинтенсивное лазерное излучение.

The obtained results show functional activity of neutrophils isolated from the peripheral blood of healthy donors. In the experimental model, the authors studied degranulation abilities of cells. They noted an increase in lysosomal degranulation under low-intensity laser irradiation (LILI). The activity of one of key oxidase I-type enzymes which restores molecular oxygen-NADPH oxidase was studied. In the experiment, it has been found out that LILI with wavelength 635 nm, continuous mode, power density 0.12 mW/cm² stimulates NADPH-oxidase activity; optimal exposure time is 90–100 sec (1.5 min). These findings should be taken into account while applying laser therapy techniques. *Key words:* neutrophiles, lysosomal granules, degranulation, NADPH-oxidase, low-intensity laser irradiation.

Введение

Поиск способов избирательного воздействия на отдельные этапы развития иммунного ответа является одной из приоритетных задач биологии и фундаментальной медицины [1, 3, 4, 8]. Перспективным подходом к решению данной проблемы может являться применение низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в качестве неспецифического физического фактора, стимулирующего функциональную активность нейтрофилов – клеток с широким функционалом и потенциалом по осуществлению иммунобиологического надзора в общей системе гомеостаза [2]. Активация нейтрофильных гранулоцитов (НГ) представляет собой специфический амплификационный и эффекторный компонент иммунного ответа [1, 3, 4]. Активация рецепторов нейтрофила запускает каскад киназ, действующих на транскрипционный фактор NF-κB, который транслоцируется в ядро и осуществляет транскрипцию около 120 генов, ответственных за активацию клетки [5]. На следующем этапе происходит активация каспаз, НАДФ-оксидазной системы, что вызывает образование активных форм кислорода. Активированный нейтрофил может осуществлять биоцидные функции либо реализуя фагоцитарный потенциал, либо с помощью выделения наружу биологически активных продуктов, осуществляя процесс дегрануляции [4]. Регистрация изменений функционально-метаболического статуса нейтрофилов в результате воздействия НИЛИ может стать полезной при выборе параметров излучения в исследовательских мероприятиях по изучению имму-

нотропных эффектов, проведение которых, в свою очередь, чрезвычайно перспективно в клиническом плане, поскольку полученные результаты дадут возможность оптимизировать методики лазерной терапии.

Известно, что нейтрофилы являются как активными участниками процесса фагоцитоза, так и секретирующими клетками, способными высвободить широкий спектр микробоцидных компонентов: эндогенных антимикробных пептидов, синтезировать вазоактивные и хемотаксические липидные медиаторы [5]. Поглощение лазерного света приводит к изменению метаболических процессов и, как следствие, функциональной активности [1, 3, 12]. Нейтрофил, активизируясь, мобилизует содержимое гранул, секретировав его в эндоцитозные вакуоли или наружу, в окружающую среду, проявляя при этом свой бактерицидный потенциал. Секреторная дегрануляция активированных лазерным излучением нейтрофилов сопутствует практически всем формам его реактивности, в том числе и респираторному взрыву, при котором происходит резкое увеличение потребления кислорода [8, 10]. Одним из ключевых ферментов, участвующих в восстановлении молекулярного кислорода является НАДФ-оксидаза, осуществляющая транспорт электронов от НАДФ-цитозоля к молекулярному кислороду. НИЛИ, нормализуя функциональные дефекты системы нейтрофильных гранулоцитов, вполне может служить физическим стимулятором активности НАДФ-оксидазы, сниженной при угнетении биоцидных возможностей нейтрофила. Кроме того, определенный

уровень активности НАДФ-оксидазы необходим для образования супероксиданиона, поддержания глутатионового цикла, образования оксида азота из аминокислоты аргинина при участии Ca^{2+} -зависимой NO-синтазы [1, 2]. Известны также и другие Ca^{2+} -зависимые внутриклеточные процессы, активируемые НИЛИ, в которых прямо или косвенно принимает участие НАДФ-оксидаза [7, 8].

Необходимо более детально разобраться в действии энергии лазерного света на дегрануляционные возможности и скорость НАДФН-оксидазной реакции нейтрофилов. Нейтрофилы выделялись из периферической крови здоровых доноров. Выбор донорских нейтрофилов как объекта исследования обусловлен, с одной стороны, их полифункциональной ролью в поддержании защитной реакции организма [2, 9], а с другой – определенной простотой, связанной с отработанной методикой выделения и исследования функций этих клеток.

Цель исследования: в эксперименте *in vitro* на примере сброса лизосомальных гранул изучить дегрануляционные возможности нейтрофилов и скорость НАДФН-оксидазной реакции при воздействии лазерного излучения.

Материалы и методы

Для выделения нейтрофилов использована кровь здоровых доноров в возрасте 20 ± 5 лет. От всех доноров-добровольцев было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с основами законодательства РФ об охране здоровья граждан и о правилах проведения клинической практики.

Для получения нейтрофилов использовали 15,0 гепаринизированной (10–15 ЕД/мл гепарина) периферической крови. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси в двойном градиенте плотности стерильных растворов фикола-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляла 1,075–1,077, нижнего – 1,093–1,095. Объем каждого градиента – 1,5 мл. Через 40 мин центрифугирования при 1500 об./мин на границе между градиентами образовывалось кольцо гранулоцитов с чистотой 98–100%. Кольцо нейтрофилов собирали, переносили в стерильные центрифужные пробирки, трижды отмывали от градиента стерильным физиологическим раствором хлорида натрия, центрифугировали при 1500 об./мин в течение 10 мин и доводили до концентрации 5×10^6 клеток/мл. Опытные и контрольные пробы, содержащие взвесь нейтрофилов, подвергали инкубации при температуре 37 °С для исключения влияния разницы температур на активность клеток. Количество проб, состоящих из взвеси нейтрофилов – 60 (30 проб контрольных, состоящих из «неактивированных» нейтрофилов; 30 проб опытных, состоящих из нейтрофилов, на которые воздействовали НИЛИ). При проведении эксперимента учитывали, что термин «неактивированные нейтрофилы» принимается условно, т. е. без лазерного облучения, поскольку их инкубация происходила не в физиологических условиях, а *in vitro*.

Параметры лазерного воздействия: длина волны 635 нм, непрерывный режим, плотность мощности

0,12 мВт/см², экспозиция 10, 30, 90, 120, 150 с в автоматическом режиме таймера и 100 с – ручное выключение (особенности лазерного терапевтического аппарата). Световое поле для облучения взвеси клеток конфигурировали таким образом, чтобы в любой точке значение отклонения плотности светового потока было не более чем на 10%, что обеспечивало практически одинаковые условия для равномерного облучения всей суспензии нейтрофилов.

Подсчет лизосомальной активности проводили по методу И.С. Фрейдлин (1986). Для определения лизосомальной активности 0,2 мл взвеси нейтрофилов в физиологическом растворе (концентрация 5×10^6 клеток/мл) соединяли с 0,02 мл раствора акридинового оранжевого в концентрации 2 мкг/мл. Клетки инкубировали 30 мин при 37 °С. После 30-минутной инкубации пробы центрифугировали при 1500 об./мин в течение 5 мин. Каплю осадка помещали на предметное стекло, накрывали покровным стеклом и микроскопировали под масляной иммерсией в потоке сине-фиолетового света люминесцентного микроскопа «МикМед» (г. Санкт-Петербург). Определение активности фермента НАДФН-оксидазы в нейтрофилах было осуществлено спектрофотометрическим способом на спектрофотометре Shimadzu (Япония). В состав пробы входил К,Na-фосфатный буфер, взвесь нейтрофилов в концентрации 5×10^6 нейтрофилов/мл, субстрат НАДФН (0,5 нмоль/мл) («БиохимМак», Россия). Активность фермента определяется по скорости НАДФН-оксидазной реакции, которую рассчитывали по убыли поглощения субстрата НАДФН при 340 нм за счет его окисления по формуле:

$$v = (\Delta D \cdot 60 \cdot 1000) / (\epsilon \cdot t \cdot \alpha),$$

где v – скорость реакции, пмоль/(мин · 10³ клеток); ΔD – измеренная убыль оптической плотности за период измерения; t – период измерения, с; ϵ – коэффициент миллимолярной экстинкции, равный 6,22 мМ; α – количество клеток в пробе; 60 – коэффициент пересчета секунд в минуты; 1000 – коэффициент пересчета на 1000 клеток. Результаты исследования представляли графически по методу Корниш–Боумана. Вместо обычной формы записи уравнения Михаэлиса–Ментен в виде зависимости w от s использовали преобразованную форму – зависимость V от K_m ,

$$V = v + v/s \times K_m,$$

где v – скорость реакции, пмоль/(мин · 10³ клеток); s – концентрация НАДФН, нмоль/мл; K_m – константа Михаэлиса, мкМ; V – максимальная скорость реакции, пмоль/(мин · 10 кл). Для пары значений v и s строили график $v(s)$, K_m и V определяли графически.

Полученные результаты исследований были подвергнуты обработке методами вариационной статистики с помощью пакета прикладных программ «Statistica for Windows» базисная версия. Результат считался достоверным при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В экспериментальной модели был изучен процесс дегрануляции лизосомальных гранул нейтрофильными гранулоцитами (НГ) и изменение содержания данны-

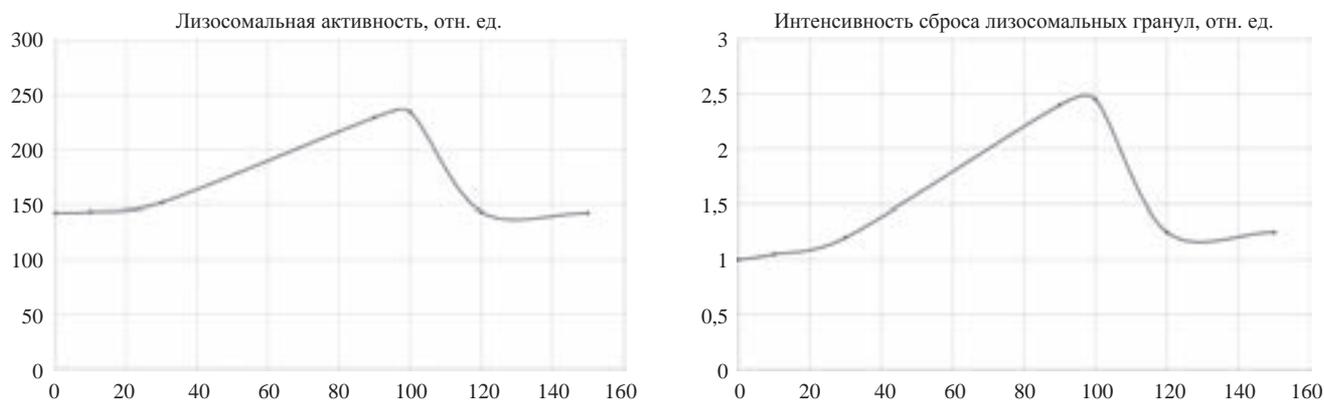


Рис. 1. Лизосомальная активность и интенсивность сброса лизосомальных гранул нейтрофилов, выделенных из периферической крови доноров при действии НИЛИ (635 нм, непрерывный режим, 0,12 мВт/см²) в зависимости от экспозиции (с)

ми клетками фермента НАДФ-оксидазы под действием НИЛИ в непрерывном режиме за различные временные промежутки. За рабочую гипотезу принято предположение о том, что изменение дегрануляции лизосом лейкоцитов может быть связано с изменением концентрации фермента НАДФ-оксидазы, причем усиление дегрануляционных возможностей находится в пропорциональной зависимости от выработки этого фермента. Было показано, что максимальная активность лизосом и сброс лизосомальных гранул происходят при экспозиции 90–100 с при возникновении плато при экспозициях 120 и 150 с ($p < 0,05$). При меньших экспозициях освещивания НИЛИ НГ (10 и 30 с) выраженного эффекта также не наблюдалось ($p > 0,05$, $p = 0,9$) (рис. 1).

Таким образом, НИЛИ красного спектра при параметрах воздействия (длина волны 635 нм) является физическим стимулом, усиливающим экзоцитоз нейтрофилами лизосомальных гранул *in vitro*. Ответ нейтрофилов на лазерное воздействие, выражающийся в резком усилении их лизосомальной активности при оптимальной экспозиции 90–100 с, позволяет предположить, что воздействие НИЛИ является «триггером», стимулируя экзоцитоз гранул нейтрофилов, что в конечном итоге приводит к усилению метаболических процессов в нейтрофиле, в частности, усилению выработки фермента НАДФ-оксидазы. Этот результат косвенно подтверждает высказанное ранее предположение о ведущей роли ионов кальция, высвобождаемых из внутриклеточных депо [7, 8], которые, как известно, распространяются в виде волн с периодом 100 с (рис. 2) [11].

Для изучения активности фермента НАДФ-оксидазы в серии опытов, в аналогичных условиях выделенные из крови доноров нейтрофилы подвергали лазерному освещиванию при температуре 37 °С, для чего в силиконизированную кювету со светоизолированными стенками вносился 1 мл раствора Хенкса, содержащий 5×10^6 нейтрофилов/мл. Параллельно проводили определение активности НАДФ-оксидазы интактных нейтрофилов. Анализ воздействия НИЛИ на нейтрофилы, выделенные из периферической крови доноров, показал его стимулирующее влияние. При облучении суспензии нейтрофилов, выделенных из периферической крови доноров, отмечено достоверное изменение скорости НАДФН-оксидазной реакции: более чем в 6 раз отно-

сительно неактивированных НИЛИ нейтрофилов и более чем в 2 раза относительно показателей у НГ после 30-секундной экспозиции (табл. 1).

Таблица 1
Скорость НАДФН-оксидазной реакции нейтрофилов (пмоль/мин·10³ клеток) при воздействии НИЛИ (635 нм, непрерывный режим, 0,12 мВт/см²) в зависимости от экспозиции

Экспозиция, с	Неактивированные нейтрофилы (n = 30)	Нейтрофилы, активированные НИЛИ (n = 30)
Исходный уровень	1,03 ± 0,3	2,13 ± 0,12*
10	1,09 ± 0,07	3,08 ± 0,21*
30	1,07 ± 0,05	3,67 ± 0,15*
90	1,01 ± 0,08	7,27 ± 0,30*
100	1,08 ± 0,06	7,60 ± 0,32*
120	1,11 ± 0,05	5,99 ± 0,10*
150	1,05 ± 0,01	6,91 ± 0,19*

Примечание. * – достоверность различий показателей по отношению к «неактивированным» нейтрофилам.

Максимальные значения НАДФ-оксидазной активности регистрировались при экспозиции в 90 и 100 с и продолжали регистрироваться, хотя и в меньшей степени, при экспозиции в 120–150 с. Показано, что экспозиция лазерного воздействия в течение 90–100 с позволяет создать максимально эффективные и оптимальные условия усиления активности фермента, возможно, за счет максимальной концентрации Ca²⁺ в этот период времени. Вероятнее всего, усиление скорости протекания

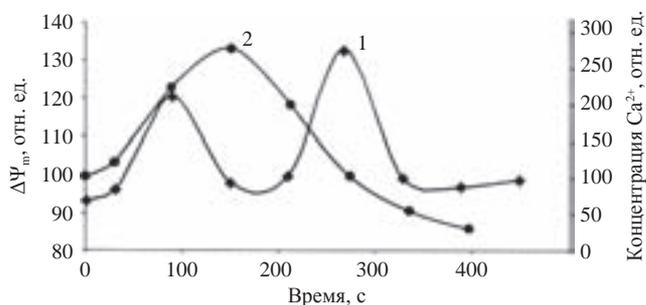


Рис. 2. Изменение концентрации Ca²⁺ (1) в цитозоле и редокс-потенциала митохондрий ΔΨ_m (2) под действием лазерного излучения (длина волны 647 нм, 0,1 мВт/см², экспозиция 15 с) на фибробласты крайней плоти человека (Alexandratou E. et al., 2002)

НАДФН-оксидазная реакция у нейтрофилов происходит вследствие активации под действием НИЛИ биосинтеза нуклеиновых кислот и белков, окислительно-восстановительных реакций, действия ферментных систем, в том числе гексозомонофосфатного шунта и НАДФ-оксидазы, и, как известно, все эти процессы являются Ca^{2+} -зависимыми [7]. Полученные в результате исследования данные также подтверждают предположение, согласно которому НИЛИ приводит к лазер-индуцированному усилению активности окислительно-восстановительных мессенджеров и, как следствие, респираторному взрыву фагоцитов [12].

Дальнейшее увеличение экспозиции приводило к снижению скорости реакции НАДФН-оксидазы нейтрофилов; не выявлено достоверных различий по скорости оксидазной реакции между активированными НИЛИ и «неактивированными» нейтрофилами ($p = 0,93$, $p > 0,005$). Полученные нами результаты исследования согласуются с результатами Е.Б. Меньшиковой с соавт. [5], обозначившими данную ситуацию как процесс, «возможно, связанный с энергетическим перенасыщением акцепторных систем клетки».

Выводы

1. Оптимальный временной интервал воздействия НИЛИ (635 нм, непрерывный режим, 0,12 мВт/см²) на нейтрофилы периферической крови *in vitro* составляет 90–100 с, что приводит к достоверному усилению лизосомальной активности нейтрофильных гранулоцитов и усилению процесса дегрануляции лизосомальных гранул.
2. Достоверные изменения показателей НАДФН-оксидазной активности нейтрофильных гранулоцитов, выделенных из периферической крови доноров, зарегистрированы при оптимальной экспозиции 90–100 с.
3. В методиках лазерной терапии, направленных на регулирование иммунной системы, необходимо задавать оптимальную экспозицию 90–100 с (1,5 мин), не более.

Литература

1. *Гизингер О.А.* Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы и факторы мукозального иммунитета: Дисс. ... докт. биол. наук. Челябинск, 2010. 356 с.
2. *Гизингер О.А., Ишпахтина К.Г., Колесников О.Л.* Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы периферической крови доноров в условиях эксперимента // Иммунология. 2009. Т. 36. № 5. С. 263–267.
3. *Горьшинов И.И., Ковальчук Л.В., Конопля А.И. и др.* Функциональная активность лейкоцитов человека под влиянием инфракрасного лазерного облучения // Иммунология. 1998. № 2. С. 32–34.
4. *Киселева Р.Е., Кузьмичева Л.В., Дарькина Ю.А., Романова Е.В.* Динамика активности мембраносвязанных ферментов в нейтрофилах под влиянием низкоэнергетического гелий-неонового лазера // Успехи современного естествознания. 2001. № 10. С. 55–59.
5. *Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К.* Окислительный стресс. Прооксиданты и антиоксиданты. М.: РАН, 2006. 223 с.
6. *Москвин С.В.* Системный анализ эффективности управления биологическими системами низкоэнергетическим лазерным излучением: Автореф. дисс. ... докт. биол. наук. Тула, 2008. 38 с.
7. *Москвин С.В.* Эффективность лазерной терапии. Серия «Эффективная лазерная терапия». Т. 2. М.–Тверь: Триада, 2014. 896 с.
8. *Нечипуренко Н.И., Паиковская И.Д., Степанова Д.И., Василевская Л.А.* Механизмы действия и биологические эффекты НИЛИ // Мед. новости. 2008. № 2. С. 123–130.
9. *Тихомирова Е.И.* Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на цитокиновую активность макрофагов и нейтрофилов *in vitro* при фагоцитозе бактерий // Мед. иммунол. 2007. Т. 9. № 2–3. С. 165.
10. *Чернова Н.И., Перламутров Ю.Н., Москвин С.В.* Цитомегаловирусная инфекция у сексуально активных пациентов репродуктивного возраста. Современные подходы к лечению // Клини. дермат. и венерол. 2014. Т. 12. № 2. С. 61–64.
11. *Alexandratou E., Yova D., Handris P. et al.* Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy // Photochemical & Photobiological Sciences. 2002. Vol. 1 (8). P. 547–552.
12. *Karu T., Smolyaninova N., Zelenin A.* Long-term and short-term responses of human lymphocytes to He-Ne Laser Irradiation // Lasers in the Life Sciences. 1991. Vol. 4 (3). P. 167–178.

Поступила в редакцию 17.09.2015 г.

Для контактов: Москвин Сергей Владимирович
E-mail: 7652612@mail.ru