

УДК 612.111:615.849.19;577.1

СИСТЕМНОЕ ДЕЙСТВИЕ НЕПРЕРЫВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА РЕДОКС-СТАТУС ЭРИТРОЦИТОВ В НОРМЕ И ПРИ ВОСПАЛЕНИИ (В ЭКСПЕРИМЕНТЕ)

*Н. Д. Мерзлякова, магистрант второго курса,
тел. 89270266331, Osot0@yandex.ru;
А.Ю. Федотова, инженер-исследователь, ассистент,
тел. 8(8422)327071, tonechkatuzeeva@mail.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет*

Ключевые слова: эритроциты, лазерное излучение, редокс-статус.

Проведена оценка влияния лазера с длинной волны 1270 нм на эритроциты здоровых мышей и особей с индуцированным кожным воспалительным процессом. Выявлено, что лазерное излучение и воспалительный процесс приводят к повышению уровня продуктов перекисного окисления липидов и продуктов окислительной модификации белков, а так же к увеличению активности каталазы. В группе облученных животных с воспалением наблюдается только повышение концентрации малонового диальдегида и увеличение активности каталазы.

Введение. Кожные заболевания являются серьезной проблемой в настоящее время. На сегодняшний день разработаны методы лечения подобных заболеваний лазерами с различными длинами волн, дающие хорошие результаты. В таких методиках, как правило, используются фотосенсибилизаторы – химические вещества способные накапливаться в определенных тканях и в присутствии кислорода приводить к развитию свободно-радикальных реакций. Одним из продуктов этих реакций является синглетный кислород, обладающий выраженным цитотоксическим действием, а в малых дозах оказывающий мембранопротекторное действие[1, 2, 3, 4].

Применение фотосенсибилизаторов сопряжено с некоторыми особенностями и рисками. Большинство из них имеют сложный неоднородный химический состав; длительное время могут задерживаться в организме и являются причиной фототоксичности, что требует от пациента строгого соблюдения светового режима; поглощаются в диапазоне длин волн 600–700 нм, что позволяет достигнуть при прове-

дении фотодинамической терапии биологической эффективности в ткани на небольшой глубине; при выведении фотосенсибилизатора из организма могут нарушаться функции почек [5, 6].

Существуют исследования, доказывающие, что синглетный кислород вырабатывается при облучении ткани лазером с длиной волны 1265-1270 нм.

Для применения синглетного кислорода в терапии кожных заболеваний необходимо исследование механизма его воздействия на организм. Эритроциты представляют собой наиболее подходящий объект изучения, так как и воспалительный процесс, и присутствие активных форм кислорода приводит к изменению их редокс-статуса [4].

Целью данной работы является изучение влияния непрерывного лазерного излучения с длиной волны 1270 нм на функциональное состояние нейтрофилов животных в норме и при индуцированном воспалении.

Материалы и методы исследований. Эксперимент проводился на белых беспородных мышах самцах с массой 25-30 г.

Все животные были разделены на 4 группы. Первая группа - контроль, вторая группа - облученные мыши, третья группа - мыши с индуцированным воспалением, четвертая группа - облученные мыши с индуцированным воспалением. Воспаление у мышей вызывалось по методике Leslie van der Fits и соавторов [7].

Нами использовался крем «Кераворт». На предварительно бритую кожу спины животных наносили тонким слоем крем и втирали до полного впитывания. Каждое животное получало ежедневно 0,05 г крема или 2,5 мг в пересчете на активное вещество. Животные контрольной группы получали аналогичную дозу вазелинового крема. Обработка препаратом проводилась в течение 6 дней.

Облучение проводили инфракрасным полупроводниковым лазером с длиной волны 1270 нм и плотностью потока энергии 28,2 Дж/см². Расстояние от источника излучения до кожи составляет 15 см. Облучение проводили в течение трех дней по 5 минут в день. Животные выводились из эксперимента на следующий день после последнего облучения путем декапитации под эфирным наркозом.

При работе с мышами были выполнены требования в соответствии с правилами гуманного обращения с животными, регламентированные «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР №755 от 12 августа 1977 г., а также положениями Хельсинской Декларации Всемирной Медицинской Ассоциации от 1964 г., дополненной в 1975, 1983, 1989 гг.

Таблица 1 - Содержание продуктов перекисного окисления липидов в эритроцитах контрольной и экспериментальных группах

Группа	МДА (мкмоль/л)	ДК (ед.оп.пл/мл)	КД (ед.оп.пл/мл)	ОШ (ед.оп.пл/мл)
Контроль n=7	238,443±25,781	1,037±0,081	0,191±0,027	0,026±0,003
Облученные животные n=7	281,436±6,798 p=0,337905	1,081±0,019 p=0,179713	0,165±0,017 p=0,654721	0,031±0,007 p=0,522904
Животные с воспалением n=10	555,628±15,6* p=0,0423	0,718±0,008 p=0,2232	0,108±0,009* p=0,0347	0,009±0,001* p=0,0283
Облученные животные с воспалением n=10	601,145±57,939* p=0,0283	0,665±0,001* p=0,0118	0,0915±0,012* p=0,0148	0,005±0,0009* p=0,0057

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от показателей группы контроля

Для оценки редокс-статуса эритроцитов определяли уровень малонового диальдегида (МДА) по методу Л. И. Андреевой (1988) [8]. Уровни диеновых конъюгатов (ДК), кетодиенов (КД) и оснований Шиффа (ОШ) определяли по методу И. А. Волчегорского (1990) [9]. Содержание продуктов окислительной модификации белков (ОМБ) оценивали по методу Levine R. в модификации Е. Е. Дубининой (2006) [10].

Активность каталазы и уровень восстановленного глутатиона (GSH) оценивали по методу А. И. Карпищенко (1999) [11].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного пакета Statistica 6.1 (StartSoft. USA). Для оценки достоверности различий между показателями контрольных и опытных групп использовался U-критерия Манна-Уитни. Различия между группами считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Малоновый диальдегид является вторичным продуктом ПОЛ и служит маркером перекисного окисления липидов [12].

В группах мышей с индуцированным воспалением до и после воздействия лазерного излучения наблюдается повышение уровня МДА при одновременном снижении уровней КД и ОШ. Содержание ДК снижается только в группе облученных животных с воспалением (табл. 1).

Окислительная модификация белков является одной из ранних индикаторов поражения тканей при свободнорадикальной патологии.

Таблица 2 - Содержание продуктов окислительной модификации белков в эритроцитах экспериментальной и контрольной групп

Показатель Группа	Альдегидные группы нейтрального характера $\lambda=366$	Кетонные группы нейтрального характера $\lambda=370$	Альдегидные группы основного характера $\lambda=430$	Кетонные группы основного характера $\lambda=530$
Контроль $n=7$	33,131±3,702	40,552±3,81	22,979±3,122	6,848±0,953
Облученные животные $n=7$	46,861±3,813* $p=0,0180$	60,027±6,719* $p=0,0088$	35,434±4,275* $p=0,0180$	10,682±1,707* $p=0,0088$
Животные с воспалением $n=10$	41,537±0,475* $p=0,0283$	52,971±1,824* $p=0,0423$	28,362±1,689 $p=0,3717$	5,126±0,627 $p=0,1674$
Облученные животные с воспалением $n=10$	34,844±2,912 $p=0,8075$	42,946±3,807 $p=0,8075$	33,06±3,445 $p=0,0618$	6,323±0,328 $p=0,4649$

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от показателей группы контроля.

Окисление белков является более надежным маркером окислительных повреждений по сравнению с окислением липидов, так как образование карбонильных производных происходит быстрее, и они являются более стабильными [13].

Из продуктов ОМБ при индуцированном воспалении значимо повышается уровень альдегидных и кетонных групп нейтрального характера.

Под влиянием лазерного излучения наблюдается повышение уровня альдегидных и кетонных групп как нейтрального, так и основного характера. (табл. 2).

Повышение содержания карбонильных производных окислительной модификации белков позволяют нам предполагать наступление карбонильного стресса в эритроцитах указанных групп.

Каталаза является ферментом антиоксидантной защиты клеток, относится к первому звену внутриклеточной защиты от активных форм кислорода. Она перобразует пероксид водорода с образованием воды и кислорода, предотвращая его накопление в клетке [14].

Статистически значимое увеличение активности каталазы наблюдается во всех экспериментальных группах. Полученные данные позволяют предполагать повышение антиоксидантного статуса эритроцитов

Таблица 3 - Активность каталазы в эритроцитах экспериментальной и контрольной групп

Группа / Показатель	Контроль n=7	Облученные животные n=7	Животные с вос- палением n=10	Облученные животные с вос- палением n=10
Каталаза	59,78±4,885	71,71307±3,234* p=0,0026	95,30433±1,561* p=0,0044	123,6354±11,278* p=0,0044

Примечание: * - данные статистически значимо отличаются от показателей группы контроля.

крови мышей (табл. 3).

Глутатион благодаря своему строению и высокой внутриклеточной концентрации выполняет антиоксидантные функции. Его восстановленная форма наиболее подходит для поддержания редокс-статуса. Снижение уровня GSH ниже показателей нормы подвергает клетку риску развития окислительного повреждения [15].

В нашем экспериментальном исследовании статистически значимого изменения уровня восстановленного глутатиона не наблюдалось.

Заключение. На фоне увеличения МДА и активности фермента каталазы в эритроцитах система редокс-гомеостаз переходит на более высокий уровень функционирования. У облученных животных и особей с индуцированным воспалением отмечается накопление продуктов окислительной модификации белков, что может свидетельствовать о возникновении карбонильного стресса.

Библиографический список:

1. Бакер С., Кочергин Н. Г., Ткаченко С. Б. Современные подходы к терапии ограниченных форм атопического дерматита / С Бакер, Н. Г. Кочергин, С. Б. Ткаченко // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2014. – №1. – С.14-17.
2. Иванова М. С. Клинико-морфологическая характеристика актинических кератозов и их терапия с применением фотодинамической терапии / М. С. Иванова [и др.] // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2013. – №2. – С.7-11.
3. Мартусевич А. А. Влияние синглетного кислорода на антиоксидантную активность плазмы крови *in vitro* и *in vivo* / А.А. Мартусевич // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2014. – №1. – С.55-58.

4. Чунихин А.А. Разработка наносекундного лазерного модуля, встраиваемого в роботизированный многофункциональный хирургический комплекс для малоинвазивной терапии патологии челюстно-лицевой области, и определение эффектов его воздействия на плазму крови/ А.А. Чунихин [и др.] // Современные технологии медицины. – 2016. – №4. – С. 35-39.
5. Гельфонд М.Л. Фотодинамическая терапия в онкологии / М.Л. Гельфонд// Практическая онкология. – 2007. – Т. 8. – № 4. – С. 204-210.
6. Молочков А. В, Лазероиндуцированная термотерапия и фотодинамическая терапия в дерматологии: возможности и перспективы / А. В. Молочков [и др.] // Альманах клинической медицины. – 2014. – №34 – С.30-35.
7. Leslie van der Fits, Sabine Mourits, Jane S. A. Voerman, Marius Kant Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis // J. Immunol. – 2009. – №185. – P.5835-5845
8. Андреева Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лабораторное дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.
9. Волчегорский И.А. Сопоставление различных подходов к определению продуктов перекисного окисления липидов в гептан-изопропаноловых экстрактах крови / И.А. Волчегорский, А.Г. Налимов, Б.Г. Яровинский // Вопросы медицинской химии. – 1989. – №1. – С.127-131.
10. Дубинина Е.Е. Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения/ Е.Е. Дубинина [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1995. – Т. 41(1). – С.24-26.
11. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии и диагностика. Справочник: Т. 2. СПб.: Интермедика; 1999.
12. Ишутина Н. А., Малоновый диальдегид и фактор некроза опухолей альфа при цитомегаловирусной инфекции в период беременности/ Н.А. Ишутина, Н.Н., И.А. Андриевская // Бюл. физ. и пат. дых. – . 2015. – №55. – С.78-81.
13. Richards D.M.C. Membrane proteins are critical targets in free radical mediated cytolysis / D.M.C. Richards, R.T. Dean, W. Jessup // Biochim. Biophys. Acta.- 1988.- Vol. 946.- P.281-288.
14. Безручко Н. В. Каталаза биологических сред организма человека и ее клинико-биохимическое значение в оценке эндотоксикоза / Н. В. Безручко [и др.] // Вестник ТГПУ. – 2012. – С.94-98.
15. Калинина Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов /Е.В. Калинина, Н.Н. Чернов, М.Д. Новичкова/ Успехи биологической химии. – Т.54. – 2014. – С.299-348.

SYSTEMIC EFFECT OF CONTINUOUS LASER RADIATION ON REDOX STATUS OF ERYTHROCYTES IN NORMAL AND INFLAMMATION (IN EXPERIMENT)

Merzlyakova N.D., Fedotova A.Y.

Key words: *red blood cells, laser radiation, redox status.*

The effect of a laser with a wavelength of 1270 nm on the erythrocytes of healthy mice and individuals with induced skin inflammation was evaluated. It was found that laser radiation and inflammation lead to an increase in the level of lipid peroxidation products and products of oxidative modification of proteins, as well as to an increase in the activity of catalase. In the group of irradiated animals with inflammation, only an increase in the concentration of Malon dialdehyde and an increase in the activity of catalase are observed.