

Влияние непрерывного низкоинтенсивного лазерного излучения красного спектра на изменения функциональной активности и скорости НАДФ-оксидазной реакции нейтрофилов периферической крови человека

О.А. ГИЗИНГЕР¹, С.В. МОСКВИН², О.Р. ЗИГАНШИН¹, М.А. ШЕМЕТОВА¹

¹ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, Челябинск, Россия; ²ФГБУ «Государственный научный центр лазерной медицины» ФМБА России, Москва, Россия

Регистрация изменений функционально-метаболического статуса нейтрофилов в результате воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) может стать полезной при выборе параметров освечивания и чрезвычайно перспективна в клиническом плане для оптимизации методик лазерной терапии. В эксперименте *in vitro* на примере сброса лизосомальных гранул изучены дегрануляционные возможности нейтрофилов и скорость их НАДФН-оксидазной реакции при воздействии лазерного света. Показано, что максимальные активность лизосом и сброс лизосомальных гранул происходят при экспозиции 90—100 с, при длине волны 635 нм, генерация света происходила с использованием аппарата ЛАЗМИК, мощности 0,12 мВт/см², при возникновении плато при экспозициях 120 и 150 с. При меньших экспозициях освечивания НИЛИ нейтрофильных гранулоцитов (10 и 30 с) выраженного эффекта также не наблюдалось. Таким образом, НИЛИ красного спектра при определенных параметрах воздействия (длина волны 635 нм) является физическим стимулом, усиливающим экзоцитоз нейтрофилами лизосомальных гранул *in vitro*. Достоверные изменения показателей НАДФН-оксидазной активности нейтрофильных гранулоцитов, выделенных из периферической крови доноров, зарегистрированы при оптимальной экспозиции 90—100 с. В методиках лазерной терапии, направленных на регулирование активности нейтрофильных гранулоцитов, оптимальной экспозицией является 90—100 с.

Ключевые слова: нейтрофилы, лизосомальные гранулы, дегрануляция, НАДФ-оксидаза, низкоинтенсивное лазерное излучение.

The effect of continuous low-intensity laser irradiation of the red spectrum on the changes in the functional activity and speed of NADPH-oxidase response of human peripheral blood neutrophils

O.A. GIZINGER¹, S.V. MOSKVIN², A.R. ZIGANSHIN¹, M.A. SHEMETOVA¹

¹State budgetary educational institution of higher professional education «South Ural State Medical University», Russian Ministry of Health, Chelyabinsk; ²Federal state budgetary institution «State Research Center of Laser Medicine», Russian Federal Medico-Biological Agency, Moscow

Registration of the changes in the functional metabolic status of neutrophils under the influence of low-intensity laser radiation (LILR) can be useful for the choice of the exposure parameters in the studies designed to evaluate immunotropic effects. Such investigations, in their turn, are very promising in clinical terms since their results can be used to optimize the laser therapy techniques. The objective of the present study was to evaluate the degranulation potential of neutrophils and the intensity of their NADPH-oxidase reaction in response to the exposure to laser radiation as exemplified by the release of lysosomal granules *in vitro*. The source of radiation was the LASMIK device operated in the continuous mode at the following parameters: wavelength 635 nm, power density 0.12 mW/cm², exposure time 10, 30, 90, 120, 150 s in the case of the automatic timer control and 100 s in the case of manual shutdown. It was shown that the maximum lysosomal activity and release of lysosomal granules took place at a 90—10 s exposure and a wavelength of 635 nm with the appearance of a plateau within 120 and 150 s after the onset of irradiation. In the case of a shorter exposure of neutrophil granulocytes to LILR (10 and 30 s) no pronounced effect was observed. It means that low-intensity laser radiation of the red spectrum with a wavelength of 635 nm is a physical stimulus reinforcing exocytosis of lysosomal granules by neutrophils *in vitro*. The reliable changes of NADPH-oxidase activity of neutrophil granulocytes isolated from donor peripheral blood are recorded at an optimum exposure time of 90—100 s. It is concluded that the laser therapy techniques, at least those designed to regulate neutrophils should be applied with the optimum exposure time of 90—100 s.

Keywords: neutrophils, lysosomal granules, degranulation, NADPH-oxidase, low-intensity laser irradiation.

Поиск способов избирательного воздействия на отдельные этапы развития иммунного ответа является одной из приоритетных задач биологии и фундаментальной медицины [1—4]. Перспективным

подходом к решению данной проблемы может являться применение низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) в качестве неспецифического физического фактора, стимулирующего функцио-

нальную активность нейтрофилов — клеток с широким функционалом и потенциалом по осуществлению иммунобиологического надзора в общей системе гомеостаза [5]. Активация нейтрофильных гранулоцитов (НГ) представляет собой специфический амплификационный и эффекторный компонент иммунного ответа [1—3]. Активация рецепторов нейтрофила запускает каскад киназ, действующих на транскрипционный фактор NF- κ B, который транслируется в ядро и осуществляет транскрипцию около 120 генов, ответственных за активацию клетки [6]. На следующем этапе происходит активация каспаз, НАДФ-оксидазной системы, что вызывает образование активных форм кислорода. Активированный нейтрофил может осуществлять биоцидные функции, реализуя фагоцитарный потенциал, либо с помощью выделения наружу биологически активных продуктов, осуществляя процесс дегрануляции [3]. Регистрация изменений функционально-метаболического статуса нейтрофилов в результате воздействия НИЛИ может стать полезной при выборе параметров освечивания в исследовательских мероприятиях по изучению иммуотропных 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 микробицидных компонентов (эндогенных антимикробных пептидов), синтезировать вазоактивные и хемотаксические липидные медиаторы [6]. Поглощение лазерного света приводит к изменению метаболических процессов и, как следствие, к функциональной активности [1, 2, 7]. Нейтрофил, активизируясь, мобилизует содержимое гранул, секретировав его в эндоцитозные вакуоли или наружу в окружающую среду, проявляя при этом свой бактерицидный потенциал. Секреторная дегрануляция активированных лазером нейтрофилов сопутствует практически всем формам его реактивности, в том числе и респираторному взрыву, при котором происходит резкое увеличение потребления кислорода [4, 8]. Одним из ключевых ферментов, участвующих в восстановлении молекулярного кислорода, является НАДФ-оксидаза, осуществляющая транспорт электронов к нему от НАДФ-цитозоля. НИЛИ, нормализуя функциональные дефекты системы НГ, вполне может служить физическим стимулятором активности НАДФ-оксидазы, сниженной при угнетении биоцидных возможностей нейтрофила. Кроме того, определенный уровень активности НАДФ-оксидазы необходим для образования супероксид-аниона, поддер-

жания глутатионового цикла, образования оксида азота из аргинина при участии Ca^{2+} -зависимой NO-синтазы [1, 5]. Известны также и другие Ca^{2+} -зависимые внутриклеточные процессы, активируемые НИЛИ, в которых прямо или косвенно принимает участие НАДФ-оксидаза [9, 10].

Необходимо более детально разобраться в действии энергии лазерного света на дегрануляционные возможности и скорость НАДФН-оксидазной реакции нейтрофилов, выделенных из периферической крови здоровых доноров, что и определило цель настоящего исследования. Выбор донорских нейтрофилов как объекта исследования обусловлен, с одной стороны, их полифункциональной ролью в поддержании защитной реакции организма [5, 11], 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 их НАДФН-оксидазной реакции при воздействии лазерного света.

Материал и методы

Для выделения нейтрофилов использовали кровь здоровых доноров в возрасте $20,0 \pm 5,0$ года без тяжелой соматической и инфекционной патологии. От всех доноров-добровольцев было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с основами законодательства РФ «Об охране здоровья граждан, правил проведения клинической практики в РФ», (приказ МЗ РФ №266 от 19.07.2003; приказ Росздравнадзора №2325-Пр/06 от 17.10.2006).

Для получения нейтрофилов использовали 15,0 мл гепаринизированной (10–15 ЕД/мл гепарина) периферической крови. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси в двойном градиенте плотности стерильного раствора фикола-верографина. Плотность верхнего слоя градиента составляла 1,075–1,077 г/мл, нижнего — 1,093–1,095 г/мл. 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

Сведения об авторах:

Гизингер Оксана Анатольевна — д.б.н., доц., проф. каф. микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики, с.н.с. НИИ иммунологии ЮУГМУ, e-mail: ogizinger@gmail.com; Москвин Сергей Владимирович — к.т.н., д.б.н., в.н.с. ГНЦ ЛМ, e-mail: 7652612@mail.ru; Зиганшин Олег Раисович — д.м.н., проф., зав. каф. дерматовенерологии ЮУГМУ, e-mail: cheldv@gmail.com; Шеметова Мария Александровна — врач-дерматовенеролог медицинского центра «СитиМед», e-mail: maria.shemetova@mail.ru

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. Опытные и контрольные пробы, содержащие взвесь нейтрофилов, подвергали инкубации при температуре 37°C для исключения влияния разницы температур на активность клеток. Количество проб, состоящих из взвеси нейтрофилов, — 60 (30 контрольных, состоящих из «неактивированных» нейтрофилов, и 30 опытных, состоящих из нейтрофилов, на которые воздействовали НИЛИ). При проведении эксперимента учитывали, что термин «неактивированные нейтрофилы» принимается условно, т. е. без лазерного освечивания, поскольку их инкубация происходила не в физиологических условиях, а *in vitro*.

Лазерное воздействие проводилось с помощью аппарата Лазмик (Россия). Параметры лазерного воздействия: длина волны 635 нм, непрерывный режим, плотность мощности $0,12 \text{ мВт/см}^2$, экспозиция 10, 30, 90, 120, 150 с в автоматическом режиме таймера и 100 с — при ручном выключении (особенности лазерного терапевтического аппарата). Световое поле для освечивания 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 освечивания 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 в 1 мл) соединяли с 0,02 мл раствора акридинового оранжевого в концентрации 2 мкг/мл. Клетки инкубировали 30 мин при 37°C , после этого 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 (Санкт-Петербург, Россия). Определение активности фермента НАДФН-оксидазы в нейтрофилах осуществлялось с помощью спектрофотометра Shimadzu (Япония). В состав пробы входили К,Na-фосфатный буфер, взвесь нейтрофилов в концентрации 5×10^6 нейтрофилов в 1 мл, субстрат НАДФН (0,5 нмоль/мл) (ЗАО «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 $\cdot 10^3$ 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 использовали преобразованную форму — зависимость V от K_m :

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

где v — скорость реакции (пмоль/мин $\cdot 10^3$ клеток); s — концентрация НАДФН (нмоль/мл); K_m — константа Михаэлиса (мкМ); V — максимальная скорость реакции (пмоль/мин $\cdot 10^3$ клеток). 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 НГ и изменение содержания данными 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 переменной концентрации фермента НАДФ-оксидазы, причем усиление дегрануляционных возможностей находится в пропорциональной зависимости от выработки этого фермента. Было показано, что максимальные 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 освечивания НИЛИ НГ (10 и 30 с) выраженного эффекта также не наблюдалось ($p > 0,05$ и $p = 0,9$ соответственно) (рис. 1).

Таким образом, НИЛИ красного спектра при определенных параметрах воздействия (длина волны 635 нм) является физическим стимулом, усиливающим экзоцитоз нейтрофилами лизосомальных гранул *in vitro*. Ответ нейтрофилов на лазерное воздействие, выражающееся в резком усилении их лизосомальной активности при оптимальной экспозиции 90—100 с позволяет предположить, что оно является триггером, стимулируя экзоцитоз гранул нейтрофилов, что в конечном итоге приводит к усилению метаболических процессов в них, в частности к усилению выработки фермента НАДФ-оксидазы. Этот результат косвенно подтверждает высказанное ранее предположение о ведущей роли ионов кальция, высвобождаемых из внутриклеточных депо [9, 10], которые, как известно, распространяются в виде волн с периодом 100 с (рис. 2) [12].

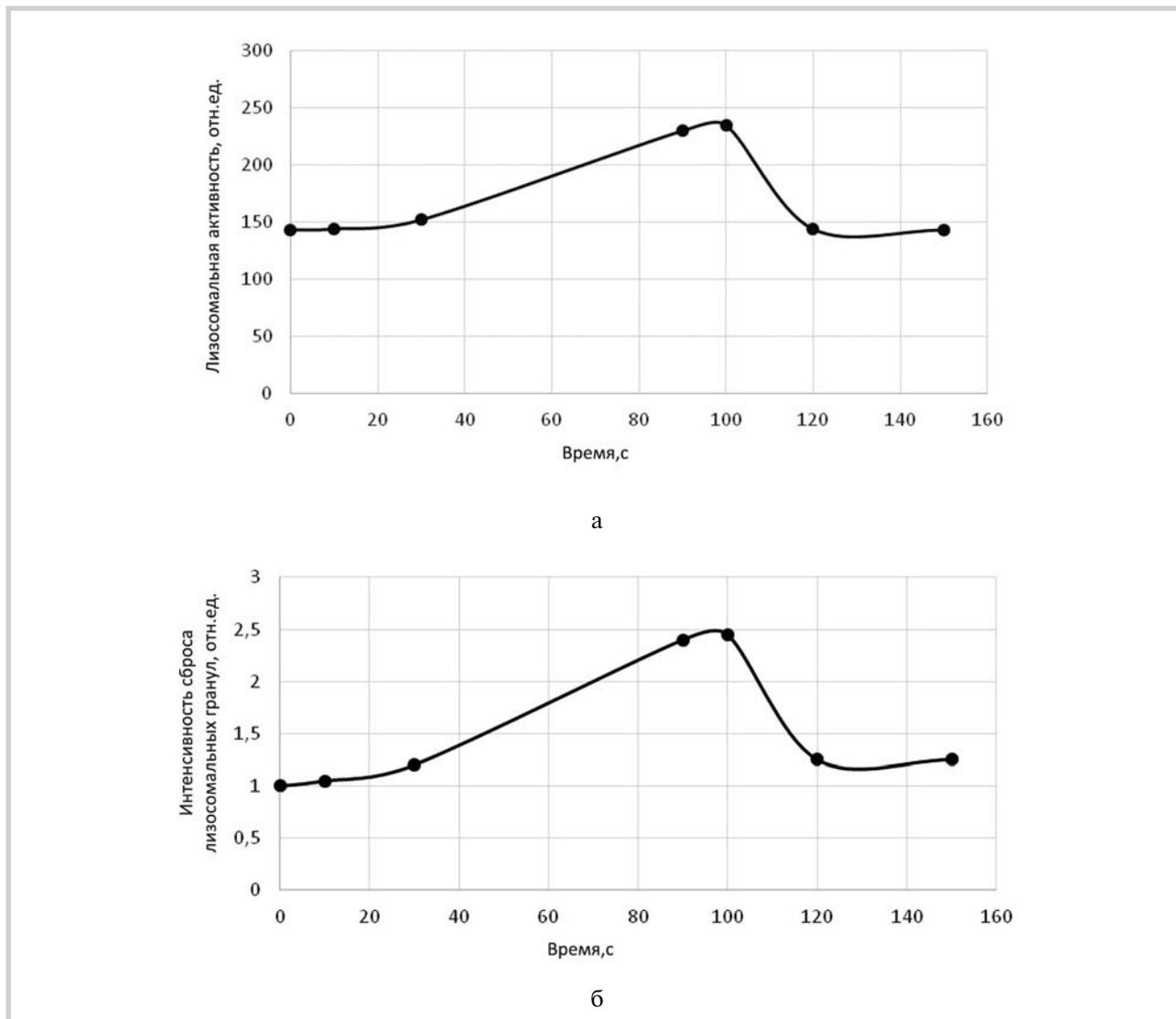


Рис. 1. Лизосомальная активность (а) и интенсивность сброса лизосомальных гранул (б) нейтрофилов, выделенных из периферической крови доноров при воздействии НИЛИ (длина волны 635 нм, непрерывный режим, плотность мощности 0,12 мВт/см²) в зависимости от экспозиции (с).

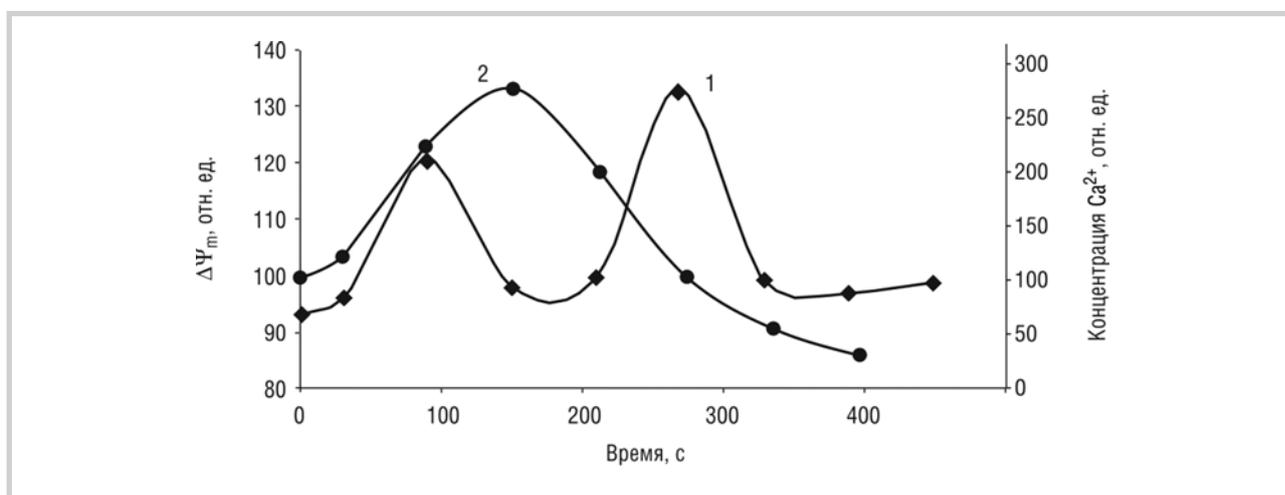


Рис. 2. Изменение концентрации Ca^{2+} (1) в цитозоле и редокс-потенциала митохондрий $\Delta\Psi_m$ (2) под воздействием НИЛИ (длина волны 647 нм, плотность мощности 0,1 мВт/см², экспозиция 15 с) на фибробласты крайней плоти человека [12].

Скорость НАДФН-оксидазной реакции нейтрофилов при воздействии НИЛИ (длина волны 635 нм, непрерывный режим, плотность мощности 0,12 мВт/см²) и без него в зависимости от экспозиции

Экспозиция, с	«Неактивированные» нейтрофилы (n=30), пмоль/мин·10 ³ клеток	Нейтрофилы, активированные НИЛИ (n=30), пмоль/мин·10 ³ клеток
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.

Для изучения активности фермента НАДФ-оксидазы в серии опытов в аналогичных условиях выделенные из крови доноров нейтрофилы подвергали лазерному освещению при температуре 37 °С, для чего в силиконизированную кювету со светоизолированными стенками вносился 1 мл раствора Хенкса, содержащего 5×10⁶ нейтрофилов в 1 мл. Параллельно проводили определение активности НАДФ-оксидазы интактных нейтрофилов. Анализ воздействия НИЛИ на нейтрофилы, выделенные из периферической крови доноров, показал его стимулирующее влияние. При освещении суспензии нейтрофилов, выделенных из периферической крови доноров, отмечено достоверное изменение скорости НАДФН-оксидазной реакции более чем в 6 раз относительно неактивированных НИЛИ нейтрофилов и более чем в 2 раза относительно показателей НГ после 30-секундной экспозиции (см. таблицу). Максимальные значения НАДФ-оксидазной активности регистрировались при экспозиции 90 и 100 с и продолжали наблюдаться, хотя и в меньшей степени, при экспозиции 120—150 с. Показано, что при экспозиции лазерного воздействия 90—100 с создаются максимально эффективные и оптимальные условия усиления активности фермента, возможно, за счет максимальной концентрации Ca²⁺ в этот период времени. Вероятнее всего, увеличение скорости протекания НАДФН-оксидазной реакции 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 Ca²⁺-зависимыми [10]. Полученные в результате исследования данные также подтверждают предположение, согласно которому освещивание НИЛИ приводит к лазериндуцированному усилению активности окис-

лительно-восстановительных мессенджеров и, как следствие, к респираторному взрыву фагоцитов [7].

Дальнейшее увеличение экспозиции приводило к снижению скорости реакции НАДФН-оксидазы нейтрофилов, при этом не выявлено достоверных различий по скорости оксидазной реакции между активированными НИЛИ и «неактивированными» нейтрофилами ($p=0,93$ и $p>0,005$ соответственно). Полученные нами данные согласуются с результатами Е.Б. Меньшиковой и соавт. [6], обозначившими данную ситуацию как процесс, возможно, связанный с энергетическим перенасыщением акцепторных систем клетки.

Выводы

1. Оптимальный временной интервал воздействия НИЛИ (длина волны 635 нм, непрерывный режим, плотность мощности 0,12 мВт/см²) на нейтрофилы периферической крови *in vitro* составляет 90—100 с, что приводит к достоверному усилению лизосомальной активности нейтрофильных и усилению процесса дегрануляции лизосомальных гранул.

2. Достоверные изменения показателей НАДФН-оксидазной активности НГ, выделенных из периферической крови доноров, зарегистрированы при оптимальной экспозиции 90—100 с.

3. В методиках лазерной терапии, по крайней мере, направленных на регулирование иммунной системы, необходимо задавать оптимальную экспозицию 90—100 с (1,5 мин), не более.

Конфликт интересов отсутствует.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, написание текста, редактирование: О.Г., О.З., М.Ш., С.М.

Статистическая обработка данных: С.М.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гизингер О.А. *Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы и факторы мукозального иммунитета*: Дис. ... д-ра биол. наук. Челябинск; 2010:356.
2. Горайнов И.И., Ковальчук Л.В., Конопля А.И., Гапонов А.М. Функциональная активность лейкоцитов человека под влиянием инфракрасного лазерного облучения. *Иммунология*. 1998;(2):32-34.
3. 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):55-59.
4. Нечипуренко Н.И., Пашковская И.Д., Степанова Д.И., Василевская Л.А. Механизмы действия и биологические эффекты НИЛИ. *Медицинские новости*. 2008;(2):123-130.
5. Гизингер О.А., Ишпахтина К.Г., Колесников О.Л. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы периферической крови доноров в условиях эксперимента. *Иммунология*. 2009;36(5):263-267.
6. Меньшикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. *Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты*. М.: РАН; 2006:223.
7. Karu T, Smolyaninova N, Zelenin A. Long-term and short-term responses of human lymphocytes to He-Ne laser irradiation. *Lasers Life Sci*. 1991;4(3):167-178.
8. Чернова Н.И., Перламуртов Ю.Н., Москвин С.В. Цитомегаловирусная инфекция у сексуально активных пациентов репродуктивного возраста. Современные подходы к лечению. *Клиническая дерматология и венерология*. 2014;12(2):61-64.
9. Москвин С.В. *Системный анализ эффективности управления биологическими системами низкоэнергетическим лазерным излучением*: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Тула; 2008:38.
10. Москвин С.В. *Эффективность лазерной терапии*. Серия «Эффективная лазерная терапия». Т. 2. М.-Тверь: Издательство «Триада»; 2014:896.
11. Тихомирова Е.И. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на цитокиновую активность макрофагов и нейтрофилов in vitro при фагоцитозе бактерий. *Медицинская иммунология*. 2007;9(2-3):165.
12. Alexandratou E, Yova D, Handris P, Kletsas D, Loukas S. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. *Photochem Photobiol Sci*. 2002;1(8):547-552. doi:10.1039/B110213N

Поступила 14.08.2015