

Т. Н. Зырянова, А. М. Лисенкова.

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЛИЯНИЯ КРАСНОГО И ИК ИЗЛУЧЕНИЯ НА ОБМЕН ГЛУТАМАТА В ТКАНЯХ КРЫС

Необходимость проведения исследований воздействия излучения видимой и инфракрасной (ИК) областей на организм экспериментальных животных появилась в связи с бурным развитием низкоинтенсивной лазерной терапии, которая осуществлялась вначале только при помощи He-Ne лазера, а в последние годы и полупроводниковыми лазерами, излучающими в ближнем ИК диапазоне. Положительные эффекты лазерной терапии отмечены при лечении заболеваний терапевтического профиля (пневмоний, артритов, кардиологических патологий и др.), а также в дерматологической практике и лечении неврологических заболеваний периферического и центрального генеза [1, 2]. Ввиду сложности взаимодействия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) с биообъектами, современные представления о механизмах общего и местного действия лазерного излучения на живой организм остаются во многом неполными и недостаточно изученными, по-прежнему актуальны проблемы выбора режима облучения. В этом плане несомненный интерес представляло сравнительное изучение действия красного ( $\lambda = 632,8$  нм) и ИК лазеров с различной длиной волны ( $\lambda = 1150$  нм, и  $\lambda = 877$  нм) на активность глутаматдегидрогеназы (ГДГ) – одного из основных ферментов обмена глутаминовой кислоты (ГК), играющей существенную роль в регуляции энергетического обмена митохондрий и являющейся связующим звеном в превращении углеводов и аминокислот на уровне цикла Кребса, а также медиатором синаптической передачи в центральной нервной системе [3]. С учетом мембранотропного действия лазерного излучения, сопровождающегося изменением конформации и структурно-функциональными перестройками мембран [4], было определено содержание продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) – малонового диальдегида (МДА) и активность каталазы – одного из ферментов антиоксидантной защиты, являющегося акцептором НИЛИ в тканях крыс, подвергнутых воздействию лазерного излучения различных длин волн.

Исследования проведены на беспородных белых крысах массой 150-180 г. Для облучения использовали гелий-неоновые лазеры не-

прерывного действия, излучающие в видимой и ближней ИК области ( $\lambda = 632,8$  нм, мощность  $P = 25$  мВт и  $\lambda = 1150$  нм,  $P = 21$  мВт) и полупроводниковый лазер ( $\lambda = 877$  нм,  $P = 10$  мВт). Активность ГДГ, зависящую от никотинамиладениндинуклеотида окисленного (НАД<sup>+</sup>) и восстановленного (НАДН), определяли спектрофотометрически [5], белок – по Лоури [6], количество МДА – по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [7], активность каталазы – спектрофотометрически по убыли  $H_2O_2$  в среде инкубации [8].

Низкоинтенсивное лазерное воздействие красной области спектра ( $\lambda = 632,8$  нм) на теменную и эпигастральную области крыс вызывает изменения скорости синтеза и дезаминирования ГК в головном мозге и печени животных в зависимости от дозы, определяемой экспозицией лазерного света. Самые значительные изменения скорости восстановительного аминирования 2-оксoglутарата (2-ОГЛ) и окислительного дезаминирования глутамата наблюдались при 20-минутной экспозиции лазерного излучения с  $\lambda = 632,8$  нм (доза  $W_E = 22,8$  Дж/см<sup>2</sup>) как в головном мозге, так и в печени экспериментальных животных.

Учитывая высокую биологическую активность лазеров ИК диапазона, связанную с большей глубиной проникновения, в сравнении с лазерным излучением видимой области спектра, была изучена эффективность действия НИЛИ различных длин волн. Все исследованные экспозиции (5-20 минут) ИК лазерного излучения с  $\lambda = 1150$  нм не вызвали достоверных изменений скорости синтеза и дезаминирования ГК, хотя использованные дозы ИК излучения были сопоставимы с дозами красного лазерного излучения. Лишь при 15- и 20-минутной экспозициях была отмечена тенденция к увеличению активности дезаминирующей ГДГ.

Результаты исследования действия НИЛИ ближнего ИК диапазона ( $\lambda = 870$  нм) на активность ГДГ приведены в табл.1. Облучение теменной области в течение 10 и 20 минут вызывало достоверное повышение в головном мозге активности дезаминирующей ГДГ в среднем на 20% и снижение активности аминирующей ГДГ до 20 %. Воздействие на эпигастральную область ближнего ИК излучения приводило к достоверному повышению скорости синтеза и дезаминирования ГК в печени при 10- и 20-минутных экспозициях.

Необходимо отметить, что при действии ИК излучения с  $\lambda = 877$  нм направленность изменений аминирующей и дезаминирующей ГДГ в тканях крыс была такой же, как и при воздействии лазер-

ного излучения красной области спектра. Кроме того, аналогичная ответная реакция со стороны ГДГ наблюдалась при дозах воздействующего НИЛИ ИК спектра почти в 2 раза меньших, чем при лазерном излучении с  $\lambda = 632,8$  нм.

Таблица 1

Активность НАД'- и НАДН-ГДГ в печени и головном мозге белых крыс при ИК-лазерном облучении теменной и эпигастральной областей в зависимости от экспозиции (нмоль НАДН/мг белка за мин), ( $\lambda = 877$  нм,  $P = 10$  мВт)

| Серия опыта      | $W_p, \text{Дж/см}^2$ | Головной мозг    |                   | Печень            |                   |
|------------------|-----------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                  |                       | НАД'-ГДГ         | НАДН-ГДГ          | НАД'-ГДГ          | НАДН-ГДГ          |
| Контроль         |                       | $34,0 \pm 1,2$   | $166,1 \pm 3,2$   | $162,2 \pm 3,8$   | $590,0 \pm 5,4$   |
| Облучение 1 мин  | 0,6                   | $36,0 \pm 1,4$   | $162,8 \pm 3,0$   | $170,3 \pm 1,2$   | $601,8 \pm 4,6$   |
| Контроль         |                       | $35,3 \pm 1,3$   | $161,2 \pm 4,4$   | $161,1 \pm 3,2$   | $603,1 \pm 3,2$   |
| Облучение 10 мин | 6,0                   | $43,4 \pm 1,1^*$ | $129,0 \pm 4,0^*$ | $19,0 \pm 3,0^*$  | $687,5 \pm 2,4^*$ |
| Контроль         |                       | $33,8 \pm 0,8$   | $162,1 \pm 3,4$   | $160,4 \pm 1,8$   | $598,1 \pm 4,0$   |
| Облучение 20 мин | 12,0                  | $39,9 \pm 1,4^*$ | $137,8 \pm 4,2^*$ | $184,4 \pm 2,1^*$ | $669,9 \pm 3,8^*$ |

\* – достоверные изменения активности по отношению к контролю для уровня значимости  $p \leq 0,05$ .

Обнаруженное увеличение активности дезаминирующей ГДГ, снижение активности аминирующей ГДГ, уменьшение содержания аминокислот глутаминовой группы (глутамата, аланина, аспартата) и аммиака, выявленное нами ранее, свидетельствует о том, что в печени и в «большом» (энергетическом) компартменте головного мозга при низкоинтенсивном лазерном воздействии усиливается использование углеродного скелета аминокислот для энергетических целей. Аминокислоты глутаминовой группы служат, вероятно, дополнительным источником для пополнения пула метаболитов цикла Кребса в результате изменения энергетического баланса при лазерном воздействии. Об усилении энергетического обмена при воздействии на животный организм красного и инфракрасного лазерного излучения свидетельствуют литературные данные об увеличении синтеза аденозинмонофосфата (АМФ), циклического аденозинмонофосфата (ц-АМФ), которые активируют ферменты цикла Кребса, об изменении пула адениновых нуклеотидов, сопровождающимся дополнительным синтезом аденозинтрифосфата (АТФ) [4].

Усиление биоэнергетических процессов при лазерном воздействии излучения красной и ближней ИК областей спектра связано в первую

очередь с мембранотропным действием излучения, изменением конформации и структурно-функциональными перестройками мембран, повышением электрохимического потенциала, изменением  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающей способности мембран, изменениями интенсивности течения процессов свободнорадикального окисления в липидной фазе плазматических и митохондриальных мембран [9].

Проведенное определение количества МДА в условиях лазерного облучения ( $\lambda = 632,8$  нм) животных показало, что НИЛИ красной области спектра вызывает незначительное повышение уровня вторичных продуктов ПОЛ (табл.2).

Таблица 2

Активность каталазы и содержание МДА в печени крыс при воздействии НИЛИ с  $\lambda = 632,8$  нм на эпигастральную область

| Серия опытов     | МДА<br>нмоль/мг белка | Каталаза<br>мкмоль/мг белка за мин |
|------------------|-----------------------|------------------------------------|
| Контроль         | $0,72 \pm 0,02$       | $20,5 \pm 3,1$                     |
| Облучение 1 мин  | $0,78 \pm 0,04$       | $21,9 \pm 3,2$                     |
| Контроль         | $0,70 \pm 0,01$       | $21,1 \pm 2,3$                     |
| Облучение 10 мин | $0,85 \pm 0,01^*$     | $24,9 \pm 3,2^*$                   |
| Контроль         | $0,71 \pm 0,05$       | $21,8 \pm 2,4$                     |
| Облучение 20 мин | $0,77 \pm 0,04$       | $25,5 \pm 3,1$                     |

\* – достоверные изменения активности по отношению к контролю для уровня значимости  $p \leq 0,05$

Достоверное повышение количества МДА на 22% обнаружено только при 10-минутной экспозиции. Облучение эпигастральной области крыс лазерным излучением ИК диапазона ( $\lambda = 877$  нм) в течение 10 минут также вызывало повышение содержания МДА на 28% по отношению к контролю. Действие ИК излучения на митохондрии приводило к достоверному снижению уровня МДА при 5-и 10-минутной экспозиции и вызывало тенденцию к повышению количества МДА при 15-минутном воздействии (табл.3).

Выявленную нами незначительную активацию ПОЛ в митохондриальных мембранах при действии на животный организм лазерного излучения красного и ИК спектра следует, вероятно, рассматривать как универсальную реакцию организма на воздействие, т. к. деструктивная роль продуктов ПОЛ проявляется в случае их значительного накопления и ослабления антиоксидантной защиты. При низкоинтенсивном лазерном воздействии ( $\lambda = 632,8$  нм,  $\lambda = 877$  нм) нами обнаружена достоверная активация одного из ферментов антиоксидантной защиты –

каталазы — практически при всех используемых экспозициях (см табл 2, 3)

Таблица 3

Активность каталазы и содержание МДА в печени крыс при воздействии ИК-излучения ( $\lambda = 877 \text{ нм}$ ) в условиях *in vitro* и *in vivo*

| Серия опытов                     | МДА<br>нмоль/мг белка | Каталаза<br>мкМоль/мг белка в мин |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|
| Контроль                         | $0,70 \pm 0,02$       | $21,1 \pm 2,3$                    |
| Облучение <i>in vivo</i> 10 мин  | $0,90 \pm 0,03^*$     | $24,3 \pm 1,9$                    |
| Контроль                         | $0,65 \pm 0,02$       | $20,5 \pm 2,8$                    |
| Облучение <i>in vitro</i> 5 мин  | $0,49 \pm 0,03^*$     | $22,1 \pm 3,1$                    |
| Облучение <i>in vitro</i> 10 мин | $0,57 \pm 0,04$       | $23,2 \pm 2,0$                    |
| Облучение <i>in vitro</i> 15 мин | $0,70 \pm 0,02$       | $24,0 \pm 1,9^*$                  |

\* — достоверные изменения активности по отношению к контролю для уровня значимости  $p \leq 0,05$

Повышение активности каталазы в печени происходило как в условиях облучения *in vivo*, так и при облучении *in vitro* надмембранной фракции. Обнаружена незначительная индукция свободнорадикальных реакций при лазерном воздействии на липосомальные мембраны и лейкоциты [9]. Вероятно, лазерное воздействие, подобно умеренным стресс-воздействиям, вызывая незначительное накопление вторичных продуктов перекисидации липидов, мобилизует эндогенные антиоксидантные системы.

Не углубляясь в тонкие и до настоящего времени спорные первичные механизмы лазерного воздействия на организм, можно констатировать, что в основе первичных эффектов монохроматического видимого и ближнего ИК излучения находится поглощение квантов энергии лазерного света компонентами дыхательной цепи и в частности цитохром-с-оксидазой, находящейся в не полностью окисленном или восстановленном состоянии, а в одной из промежуточных форм. Данный процесс сопровождается ускорением переноса электрона в дыхательной цепи благодаря изменению редокс-свойств её компонентов, локализованный переходящий нагрев поглощающих хромофоров, увеличение концентрации супероксидного аниона вследствие активации дыхательной цепи. Кроме того, поглощение квантов лазерного света способствует возникновению колебательно-возбужденных состояний молекул. Первичное звено механизмов НИЛИ красной и ближней ИК областей спектра запускает по принципу триггерного эффекта комплекс вторичных реакций, в частности, индуцируются

свободнорадикальные реакции, в том числе ПОЛ, необходимые для последовательного обволакивания мембрано-клеточных структур [4]. Необходимо также принять во внимание и факт участия липо- и гидроперекисей в биосинтезе биологически активных соединений, необходимых для репаративных процессов. Умеренная перекисная модификация мембран приводит к изменению ионных потоков через митохондриальную мембрану и, как следствие, изменяется взаимоотношение путей синтеза и дезаминирования глутамата.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о достаточно эффективной способности НИЛП красной ( $\lambda = 632,8$  нм) и ИК ( $\lambda = 877$  нм) областей спектра в диапазоне экспозиций (1–20 минут) и доз (1,14–22,8 Дж/см<sup>2</sup>) воздействовать на обмен ГК в тканях экспериментальных животных.

#### Литература

1. Механизмы биостимуляции низкоинтенсивного лазерного излучения / Под ред. Ляндреса И.Г. Мн.: 1998. 116 с.
2. *Tuner I., Hode I.* Low level laser therapy. Stockholm: Prima Books. 1999. 158 p.
3. *Петров В.И., Пуотровский Л.Б.* Возбуждающие аминокислоты. Волгоград: Офсет. 1997. 165 с.
4. *Кару Т.И.* Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии // Успехи совр. биол. 2001. Т.121, №1. С. 110–120.
5. *Пикунев А.Т., Зырянова Т.Н., Джугурия Н.А.* Активность некоторых ферментов обмена глутаминовой кислоты и цикла Кребса в головном мозге крыс при лазерном облучении // Радиобиология. 1984. Т. 24, № 1. С. 29–34.
6. *Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L.* Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 256–275.
7. *Гаприлов В.Б., Гаприлова А.Р.* Анализ методов определения продуктов перекисного окисления липидов в сыворотке крови по тесту с ТБК // Вопр. мед. химии. 1987. Т. 33, № 1. С. 118–122.
8. *Aebi H.* Catalase in vitro // Methods in Enzymology. N.Y.: Acad. Press. 1984. Vol. 105. P. 121–126.
9. *Клебанов Г.И., Чичук Т.В., Владимиров Ю.А.* Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на пероксидацию мембранных липидов и концентрацию ионов кальция в цитозоле фагоцитов // Биол. мембраны. 2001. Т. 18, № 1. С. 42–50.