

БИОХИМИЯ

УДК 577.152.199 + 615.849.19

Օ. Ա. Մովսեսյան, Ն. Մ. Ալիսյան, Ն. Օ. Մովսեսյան, Գ. Ա. Գեորգյան

Активность нитрергической системы и поглощение D-глюкозы в костном мозге и субпопуляциях лейкоцитов крови крыс, подвергнутых облучению полупроводниковым лазером и красным световым диодом при кластридиальном сепсисе

(Представлено академиком К.Г.Карагезяном 21/І 2009)

Ключевые слова: *Clostridium perfringens*, D-глюкоза, костный мозг, красный световой диод, лейкоциты, полупроводниковый лазер, синтаза оксида азота

В последние годы в возникновении и развитии сепсиса все большую роль приобретают грамположительные микроорганизмы, в числе которых возбудитель газовой гангрены спорообразующий анаэроб *Clostridium perfringens* [1]. Высокая смертность при септическом шоке несмотря на вазопрессорную терапию и лечение антибиотиками обусловлена индукцией чрезмерного защитного и воспалительного ответа [2]. Согласно современным представлениям выброс цитокинов в ответ на инфекцию иммунокомпетентными клетками (ИКК) вызывает гиперпродукцию универсального биомедиатора оксида азота (NO), с последующим развитием септического шока, когда большое количество микробов, циркулирующих в крови, резко активизирует синтез этого газа, вызывающего длительное и сильное расширение мелких кровеносных сосудов и снижение артериального давления, с трудом поддающееся терапевтическому воздействию [3]. Эндогенный синтез NO из аминокислоты L-аргинина осуществляют функционально и фармакологически различающиеся изоформы NO синтазы (NOS): кальций(Ca^{2+})-кальмодулин (CaM)-зависимые "конститутивные" изоформы (cNOS) (нейрональная, nNOS, и эндотелиальная, eNOS) и Ca(II)/CaM-независимая "индуцибельная" (iNOS), эффекторная молекула врожденной иммунной системы, регуляторный компонент антипатогенной и противовоспалительной защиты хозяина [4]. Все

три изоформы обнаружены в ИКК крови и костном мозге и участвуют в реализации их функций, но могут оказывать разное влияние [5]. Так, NO, продуцируемый cNOS, блокирует активирование ядерного транскрипционного фактора (NF- κ B) и тормозит высвобождение провоспалительных медиаторов, в то время как iNOS/NO оказывает противоположное действие [6]. Активирование iNOS и ее компартиментализация в очагах инфекции и экспрессии провоспалительных цитокинов убедительно продемонстрированы на моделях сепсиса животных и у пациентов с сепсисом и септическим шоком [7]. В то же время защитная роль конститутивных форм NOS, а именно: вазодилатация, антиоксидантное действие, ингибирование адгезии тромбоцитов и лейкоцитов к стенкам сосудов и препятствование агрегации тромбоцитов — указывает на позитивную направленность повышенной продукции NO при инфекции и системном воспалительном ответе [4,5]. Необходимость избирательного подхода при ингибировании ферментных систем, генерирующих NO, подтверждается неудачными попытками терапии септического шока неселективными ингибиторами NOS [8]. Изучение механизмов клостридиального сепсиса на уровне изоферментов NOS, а также поиск новых нефармакологических способов избирательного воздействия на них является одним из подходов к решению проблемы грамположительного сепсиса, который гораздо менее изучен по сравнению с грамотрицательным.

По последним данным система NOS/NO опосредует терапевтические эффекты низкоинтенсивного красного лазерного и светодиодного оптического излучения, при котором повышение концентрации внутриклеточного кальция оказывает воздействие на изоформы NOS [9]. Электромагнитное излучение может влиять на мембранную проницаемость через NO и нитрит/нитраты, стабильные продукты его окисления, которые, являясь хаотропными агентами, изменяют свойства клеточных мембран и оказывают воздействие на связывание и поглощение клетками D-глюкозы, высокие концентрации которой в разной степени ингибируют активность изоформ NOS и подавляют их синтез *de novo* [10]. В представленной работе на модели клостридиального сепсиса крыс изучено влияние излучения в красной области спектра полупроводникового лазера и светодиода на активность изоформ NOS и поглощение D-глюкозы в костном мозге (КМ) и иммунокомпетентных клетках крови.

Материалы и методы. Эксперименты проводили на молодых беспородных самцах белых крыс массой 100-150 г, содержащихся в виварии в естественных условиях освещения и при свободном доступе воды и пищи. Модель клостридиального сепсиса получали одноразовой внутрибрюшинной инъекцией 0.25 мл взвеси клеток клинического штамма грамположительной анаэ-

робной спорообразующей бактерии *C. perfringens* (в дозе ЛД₅₀, 10⁶ клеток/мл). Животные были разделены на группы (n = 5/группу): 1) здоровые (контроль); 2) инфицированные *C. perfringens*; 3) инфицированные *C. perfringens* и подвергнутые облучению полупроводниковым лазером (энергия 600 мДж); 4) инфицированные *C. perfringens* и подвергнутые облучению полупроводниковым лазером (энергия 900 мДж); 5) инфицированные *C. perfringens* и подвергнутые облучению красным световым диодом (энергия 900 мДж).

Процедура облучения. Одноразовое облучение проводили полупроводниковым лазером (ППЛ), работающим в непрерывном режиме (длина волны 654 нм) и/или красным светодиодом (КСД). На изолированное и фиксированное животное направлялся пучок с энергией излучения 600 и/или 900 мДж ППЛ и 900 мДж КСД, мощностью 1.5 мВт и длительностью экспозиции 10 мин.

Выделение нейтрофилов и мононуклеаров крови. Кровь собирали в пластиковые пробирки, стабилизировали антикоагулянтом (5% Na₂-EDTA, в соотношении 5:1), смешивали с 6% декстраном, приготовленным на 0.9% NaCl (в соотношении 2:1) и инкубировали при 37°C 1 ч. После седиментации эритроцитов отделяли верхний слой, содержащий лейкоциты, из которого получали субпопуляции лейкоцитов центрифугированием в двухступенчатом градиенте плотности фикол-верографина (1.129 и 1.087 г/см³) при 3000 об/мин 20 мин [11]. Мононуклеары и нейтрофилы получали из верхнего и нижнего интерфазного кольца, соответственно, и перед использованием дважды промывали 20 mM HEPES буфером pH 7.4.

Выделение костного мозга. КМ выделяли из трубчатых костей (бедренной и большой берцовой), гомогенизировали в 20 mM HEPES буфере pH 7.4, содержащем 2 mM дитиотреитола и 3 mM MgCl₂·6H₂O. Гомогенат пропускали через фильтр с диаметром пор 70 мкм и полученную взвесь клеток КМ использовали для исследования. Жизнеспособность форменных элементов крови и популяций клеток КМ составляла >95% при определении окраской трипановым синим ("Chemapol", Чехия). Эффективность разделения клеток крови оценивали окрашиванием по Мей-Грюнвальду – Гимзе.

Определение активности изоформ NOS. Активность NOS определяли по продукции активных форм азота (NO и его стабильных интермедиатов, окислов азота (NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O₄, N₂O₃), нитрозотиолов и нитрозаминов) при долговременной инкубации (24 ч, 37°C) исследуемых образцов в 20 mM HEPES буфере pH 7.4, содержащем 2 mM дитиотреитол, 3 mM MgCl₂·6H₂O. В инкубационную смесь в зависимости от условий опыта вводили 1.15 mM EDTA или 1.73 mM CaCl₂. Общая активность NOS определялась инкубированием проб в присутствии 1.73 mM CaCl₂, активность iNOS – инкубированием

проб в присутствии 1.15 мМ EDTA. В параллельных экспериментах пробы инкубировали в присутствии 5.25 мМ L-аргинина и кофакторов NOS: 0.126 мМ NADPH, 20.07 мкМ (6R)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерин дигидрохлорида, 6.08 мкМ FAD, 5.53 мкМ FMN. Активность cNOS вычислялась по разности между общей активностью NOS и таковой iNOS. Активность NOS выражали в нмоль (NO_2^-) · мг⁻¹ белка · 24 ч⁻¹. Концентрация белка определялась по методу Лоури [12].

Определение активных форм азота. Содержание активных форм азота в супернатантах депротеинизированных проб (осаждение белков осуществляли 0.5 N NaOH и 10% ZnSO₄) определяли реакцией диазотирования (с использованием реактива Грисса – Илосвая) спектрофотометрически при длине волны 546 нм [13].

Радиометрическое определение связывания D-глюкозы. Для изучения процессов спонтанного захвата D-глюкозы исследуемые образцы (200 мкл) нагружали мкКи ¹⁴C[U]-глюкозы (удельная радиоактивность 260 мкКи/ммоль) в 250 мкл 20 мМ HEPES буфера pH 7.4, содержащем 2 мМ дитиотреитол, 3 мМ MgCl₂ · 6H₂O, и инкубировали в течение 30 мин при 37°C. Белки в пробах осаждались трехкратным объёмом 30% ТХУ; свободные лиганды отделяли от связанных пропусканием через фильтры (диаметр пор 0.65 мкм, "Millipore", USA) с двукратной промывкой 96% этанолом. После высушивания фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы, растворяли в 0.5 мл диметилсульфоксида и выдерживали в течение 24 ч при комнатной температуре, затем вводили 10 мл сцинтиллятора Брея (2,6-дифенилоксазол и 1,4-ди-(5-фенил-2-оксазолилбензола) растворенные в пропорции 10:1 в сцинтилляционном толуоле). Специфическое связывание лиганда определялось разностью между общим уровнем радиоактивности и после инкубации образцов с ¹⁴C-D-глюкозой. Радиоактивность определяли методом жидкой сцинтилляционной спектроскопии на спектрометре SL-4221 (Roche Bioelectronique Kontron, Франция) с эффективностью счёта 70% (по ¹⁴C). Поглощение глюкозы пересчитывалось в нмоль ¹⁴C-D-глюкозы · мг⁻¹ белка.

Статистическая обработка результатов. Для выявления степени зависимости отдельных исследуемых показателей применялся корреляционный анализ (коэффициент линейной корреляции Пирсона, *r*). Достоверность различий средних значений параметров и корреляций по группам оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Различия между выборками считали достоверными при *P* < 0.05.

Результаты и обсуждение. В ИКК крови и КМ в условиях *in vitro* в адаптированной нами системе длительного инкубирования биоматериала (см. Материалы и методы) успешно детектируется синтез NO, который

полностью блокируется при введении в состав реакционной среды 2.5 мМ N^G-монометил-L-аргинина, конкурентного неселективного ингибитора изоформ NOS, что подтверждает функционирование метаболического пути L-аргинин NO (данные не указаны).

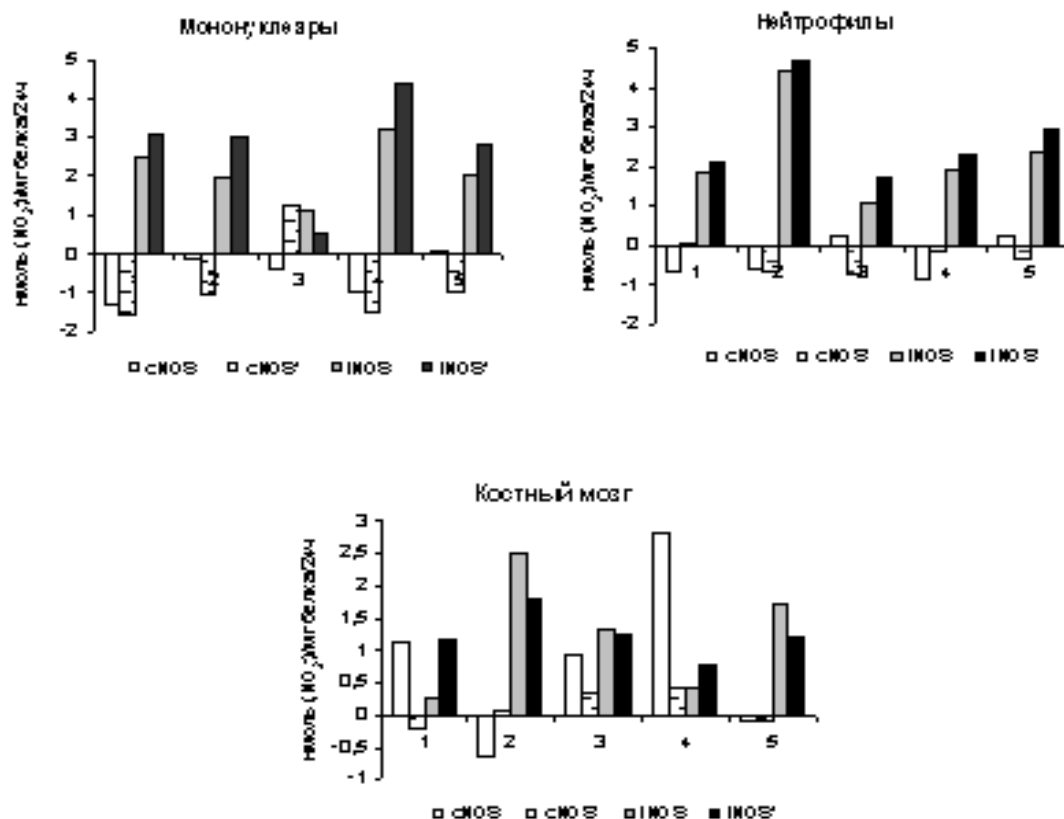


Рис. 1. Активность изоформ NOS в субпопуляциях лейкоцитов крови и костном мозге крыс, инфицированных *C. perfringens* и подвергнутых облучению полупроводниковым лазером и/или красным световым диодом. cNOS' и iNOS' - активность, определяемая в присутствии L-аргинина и кофакторов NOS (см. Материалы и методы). 1 - здоровые крысы (контроль); 2 - крысы, инфицированные *C. perfringens*; 3 - крысы, инфицированные *C. perfringens* и подвергнутые облучению полупроводниковым лазером (энергия 600 мДж); 4 - крысы, инфицированные *C. perfringens* и подвергнутые облучению полупроводниковым лазером (энергия 900 мДж); 5 - крысы, инфицированные *C. perfringens* и подвергнутые облучению красным световым диодом (энергия 900 мДж).

На рис. 1 представлены сдвиги в активности изоформ NOS в мононуклеарах крови и общей фракции при развитии генерализованного воспаления у крыс, инфицированных *C. perfringens* и после облучения ППЛ и/или КСД.

В нейтрофилах и мононуклеарах здоровых крыс обнаруживается только активность iNOS, а в КМ доминирует cNOS, превышая iNOS в 4 раза. Это согласуется с полученными недавно данными о роли конститутивных изоформ

NOS в КМ, где eNOS играет роль в мобилизации прогениторов и стволовых клеток и nNOS действует как паракринный эффектор регуляции гемопоеза [14]. Функциональная роль iNOS/NO в стволовых клетках, возможно, связана с его антиоксидантными свойствами, а также с поддержанием антипролиферативного тона, нацеленного на предотвращение преждевременной гибели при стрессовых воздействиях [15]. В этой связи заслуживают интерес полученные нами данные о том, что при введении в среду длительного инкубирования L-аргинина и кофакторов NOS (см. Материалы и методы) активность iNOS в КМ повышается до уровня cNOS; по-видимому, такой механизм регулирования может действовать *in vivo*. Это важно, поскольку iNOS в отличие от cNOS способна в течение нескольких дней продуцировать NO и поддерживать его высокий уровень, запуская механизмы иммуносупрессии [16].

Отметим, что включение L-аргинина и кофакторов NOS в реакционную смесь помогает точнее оценить активность NOS, поскольку каждый из них вносит свой вклад в каталитическую активность и стабилизацию конформации фермента, тогда как при исчерпывании их пула или субнасыщающих концентрациях (особенно аргинина и тетрагидробиоптерина) все изоформы NOS могут, окисляя NADPH, продуцировать такие агрессивные продукты, как H_2O_2 , O_2^- и нитроксильный радикал NO^- , оказывая повреждающее действие на ткани [17].

У инфицированных крыс активность iNOS КМ возрастает почти в 10 раз с одновременным полным подавлением cNOS; L-аргинин и кофакторы NOS частично повышают активность последней, но она остается почти в 19 раз ниже контрольных значений, а активность iNOS в их присутствии даже несколько снижается. Изменения во влиянии L-аргинина и кофакторов NOS наблюдаются и в ИКК крови: в норме при включении их в инкубационную среду в нейтрофилах выявляется активность cNOS — у инфицированных животных она не обнаруживается, ослабляется и их активирующее воздействие на iNOS нейтрофилов, которая при инфекции возрастает в 2.4 раза. Интересно, что iNOS мононуклеаров инфицированных крыс снижается в 1.3 раза, но L-аргинин и кофакторы NOS восстанавливают ее нормальный уровень. Полученные данные свидетельствуют о метаболических перестройках при кластридиальном сепсисе, затрагивающих в частности аргининметаболизирующие системы крови и КМ.

Активирование iNOS в ИКК крови и КМ при кластридиальном сепсисе приводит к нарушению сбалансированного синтеза NO в сторону его гиперпродукции, а при одновременном активировании продукции активных форм кислорода сопровождается образованием мощного оксиданта перок-

синитрита (OONO^- , ПН), который может инициировать каскад реакций: необратимое ингибирование аконитазы, железо-серных центров I-III комплексов дыхательной цепи, нитрозилирование мембранных тиолов с открытием митохондриальной поры [17]. ПН в отличие от NO активно нитрозилирует липиды, белки, ДНК, оказывая деструктивное воздействие на мембраны и функции клеток [18]. Вдобавок iNOS способна подавлять протекторные механизмы, опосредуемые eNOS в патогенезе сепсиса [19].

При инфекции *C. perfringens* в КМ поглощение D-глюкозы снижается вдвое, в мононуклеарах – в 1.5 раза, а в нейтрофилах возрастает в 1.38 раза (рис. 2).

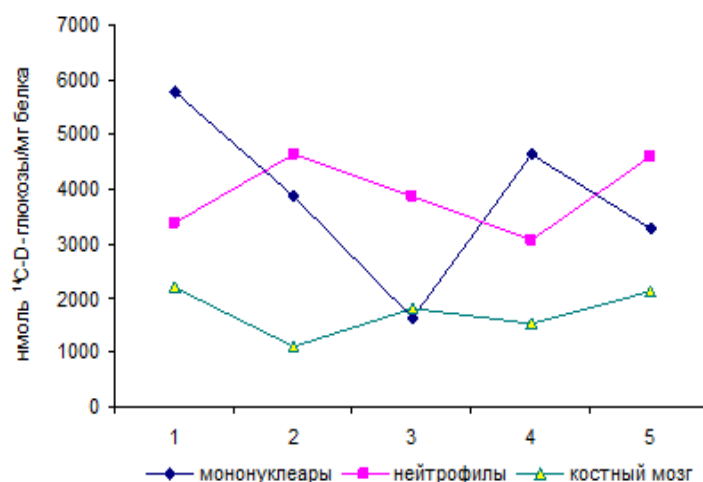


Рис. 2. Поглощение D-глюкозы субпопуляциями лейкоцитов крови и клетками костного мозга крыс, инфицированных *C. perfringens* и подвергнутых облучению полупроводниковым лазером и/или красным световым диодом. 1 - здоровые крысы (контроль); 2 - крысы, инфицированные *C. perfringens*; 3 - крысы, инфицированные *C. perfringens* и подвергнутые облучению полупроводниковым лазером (энергия 600 мДж); 4 - крысы, инфицированные *C. perfringens* и подвергнутые облучению полупроводниковым лазером (энергия 900 мДж); 5 - крысы, инфицированные *C. perfringens* и подвергнутые облучению красным световым диодом (энергия 900 мДж).

Сообщалось, что небольшие дозы лазерного облучения вызывают активирование супероксиддисмутазы, снижающей уровень активных форм кислорода, а повышение дозы уже через сутки после облучения вызывает ингибирование супероксиддисмутазы и накопление ПН, который действует, как антагонист NO, способствуя спазму сосудов и окислительному повреждению тканей [20]. В наших экспериментах одноразовое воздействие электромагнитного излучения ППЛ и КСД через 24 ч также оказывает нормализующее действие на активность изоформ NOS и захват D-глюкозы ИКК крови и КМ (рис. 1, 2). Причем повышение энергии полупроводникового

лазерного облучения с 600 до 900 мДж усиливает эффект ППЛ. В то же время корригирующее влияние КСД с энергией 900 мДж превосходит ППЛ с энергией 600 мДж и уступает при 900 мДж. При этом в мононуклеарах между поглощением D-глюкозы и активностью iNOS наблюдается положительная корреляция ($r = 0.8131$), а для cNOS – отрицательная ($r = -0.6841$), которую усиливают L-аргинин и кофакторы NOS ($r = -0.9092$), весьма незначительно влияя на корреляцию iNOS. В нейтрофилах картина обратная: между поглощением D-глюкозы и активностью iNOS корреляция отрицательная ($r = -0.4858$), а для cNOS – положительная ($r = 0.4931$), и в этом случае L-аргинин и кофакторы NOS меняют значения коэффициента линейной корреляции для cNOS ($r = -0.6604$), практически не влияя на iNOS. Между поглощением D-глюкозы и активностью iNOS костного мозга связь обратная ($r = -0.5447$), что наблюдается и для cNOS ($r = -0.4946$), но только под влиянием L-аргинина и кофакторов NOS. Сложную картину взаимосвязи между изоформами NOS и связыванием D-глюкозы клетками крови и КМ, по-видимому, можно объяснить разнонаправленными сдвигами в активности изоформ NOS и микроокружения, что проявляется *in vitro* в дифференцированном влиянии субстрата и кофакторов NOS. По всей вероятности, электромагнитное излучение оказывает как прямое, так и опосредованное воздействие на эти процессы.

Таким образом, красное излучение полупроводникового лазера и светодиода можно использовать в целях немедикаментозной коррекции иммунного нитрегергического ответа и энергообеспечения ИКК крови и КМ при грам-положительной инфекции. Получены данные о преимуществе лазерного воздействия перед светодиодным, что, по-видимому, связано с такими специфическими свойствами лазерного излучения, как когерентность, поляризуемость и высокая степень монохроматичности, вероятно, влияющими на метаболические процессы в организме.

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА

О. А. Мовсесян, Н. Х. Алчуджян, Н. О. Мовсесян, Г. А. Геворкян

Активность нитрегергической системы и поглощение D-глюкозы в костном мозге и субпопуляциях лейкоцитов крови крыс, подвергнутых облучению полупроводниковым лазером и красным световым диодом при кластридиальном сепсисе

Clostridium perfringens-инфицированных крыс подвергли облучению полупроводниковым лазером ($\lambda = 654 \text{ nm}$) и/или красным световым диодом. Выявлено их

модулирующее влияние на кальций-зависимую — кальций-независимую активность NO-генерирующей энзиматической системы и поглощение D-глюкозы в костном мозге и субпопуляциями лейкоцитов крови (моноклеары и нейтрофилы). Получены данные о преимуществе полупроводникового лазера перед красным светодиодом в отношении корригирующего воздействия на энергетический обмен и нитрергическую систему крови и костного мозга при кластридиальном сепсисе.

Ն. Ա. Մովսեսյան, Ն. Խ. Ալչուջյան, Ն. Ն. Մովսիսյան, Գ. Ա. Գևորգյան

Կիսահաղորդչային լազերի ու կարմիր լուսադիոդի ճառագայթման ազդեցությունը առնետների լեյկոցիտների ենթաբնասակների և ոսկրածուծի նիտրերգիկ համակարգի ակտիվության ու D-գլյուկոզի կլանման վրա կլոստրիդիալ սեպսիսի ժամանակ

Կիսահաղորդչային լազերի և/կամ կարմիր լուսադիոդի ճառագայթումը ընտրողական ազդեցություն է ցուցաբերում D-գլյուկոզի կլանման և ազոտի օքսիդի սինթեզի իզոնների ակտիվության վրա՝ *Clostridium perfringens*-վարակված առնետների արյան լեյկոցիտների ենթաբնասակների և ոսկրածուծի մեջ: Պարզվել է արյան ու ոսկրածուծի նիտրերգիկ համակարգի և էներգետիկ նյութափոխանակության կարգավորման մեջ կիսահաղորդչային լազերի առավելությունը կարմիր լուսադիոդի հանդեպ կլոստրիդիալ սեպսիսի ժամանակ:

H. A. Movsesyan, N. Kh. Alchujyan, N. H. Movsisyan, G. A. Kevorkian

Nitregic System Activity and D-Glucose Uptake of Leucocyte Subpopulations and Bone Marrow of Rats Treated with Half-Conducted Laser and Red Light Diode in Clostridial Sepsis

Rats were infected with *Clostridium perfringens* and treated with half-conducted laser ($\lambda = 654 \text{ nm}$) and/or red light diode. Irradiation caused changes in the activity of calcium-dependent and calcium-independent NO-generating enzymatic system and D-glucose uptake of leucocyte subpopulations (mononuclears and neutrophils). We have suggested the preference of half-conducted laser irradiation upon that of red-light diode in the modulation of nitregic system and energy metabolism during clostridial sepsis.

Литература

1. *Акимкин В.Г., Карпун Н.А., Климова Г.М., Ключев В.М., Тихонов Ю.Г.* - Эпидемиол. инфекц. болезни. 2008. N2. С. 11-16.
2. *Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C.* - Crit. Care Med. 2003. V. 31. N 4. P. 1250-1256.

3. *Thiemerman C.* In: Nitric oxide, Gryglewski R.J., Minuz P., Ed.; IOS Press: Amsterdam. 2001. V. 317. P. 117-125.
4. *Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G.* - Biochem. J. 2001. V. 357. N 3. P. 593-615.
5. *Stefano G.B., Goumon Y., Bilfinger T.M.* - Progress Neurobiol. 2000. V. 60. P. 513-530.
6. *Annane D., Sanquer S., Sebille V., Faye A., Djuranovic D., Raphael J.C., Gajdos P., Bellissant E.* - Lancet. 2000. V. 355. P. 1143-1148.
7. *López A., Lorente J.A., Steingrub J., Bakker J., McLuckie A., Willatts S., Brockway M., Anzueto A., Holzapfel L., Breen D.* - Crit Care Med. 2004. V. 32. P. 21-30.
8. *Клебанов Г.И., Шураева Н.Ю., Чичук Т.В., Сидорина Н.Г.* - Лазерная медицина. 2005. Т. 9, N 1. С. 23-31?
9. *Brovkovych V., Dobrucki L.W., Brovkovich S., Dobrucki I., Do Nascimento C.A., Malinski T. J.* - Physiol. Pharmacol. 1999. V. 50. N 4. P. 575-581.
10. *Фрик Г., Прейснер З.С., Иенсен Г.Л., Бурмейстер Ю.* В кн.: Иммунологические методы. (под ред. Х.Фримеля). М. Мир. 1979.
11. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.* - J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265-275.
12. *Miranda K.M., Espey M.G., Wink D.A.* - Nitric Oxide. 2001. V. 5. P. 62-71.
13. *Krasnov P., Michurina T., Packer M.A., Stasiv Y., Nakaya N., Moore K.A., Drazan K.E., Enikolopov G.* - Mol. Med., Published online 2007 December 8. doi: 10.2119/2007-00011.
14. *Cheng T., Rodrigues N., Shen H.* - Science. 2000. V. 287. P. 1804-1808.
15. *Elgert K.D., Alleva D.G., Mullins D.W.* - J. Leukocyte Biol. 1998. V. 64. P. 275-279.
16. *Gorren A.C.F., Mayer B.* - Curr. Drug Metab. 2002. V. 3. P. 135-157.
17. *Guilivi C.* - Novaris Found Symp. 2007. V. 287. P. 92-100.
18. *Davis K.L., Martin E., Turko I.V., Murad F.* - Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2001. V. 41. P. 203-236.
19. *Bredt D.S.* - J. Cell Sci. 2003. V. 116. P. 9-15.
20. *Клебанов Г.И., Полтанов Е.А., Чичук Т.В., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А.* - Биохимия. 2005. Т. 70. N 12. С. 1623-1630.