

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 616.1/4.001.8+615.478

ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОЛЯРИЗОВАННОГО ПОЛИХРОМАТИЧЕСКОГО НЕКОГЕРЕНТНОГО СВЕТА НА БИОРАДИКАЛЬНЫЕ ПАРАМЕТРЫ ТКАНЕЙ И СЫВОРОТКИ КРОВИ КРЫС**Н.В. Хмиль¹, Т.Н. Овсянникова¹, Н.В. Чайковская², В.Г. Подопрigorova²***1. Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, 61022, Харьков**2. ПНИЛ клинической биофизики и антиоксидантной терапии Смоленской государственной медицинской академии*

E-mail: nat-niig@yandex.ru

Поступила в редакцию 1 июля 2014 года

Принята 8 сентября 2014 года

Исследовано влияние семидневного облучения лабораторных крыс *in vivo* поляризованным полихроматическим некогерентным низкоинтенсивным светом на оксидативно-антиоксидантные параметры сыворотки крови и тканей (кожа, печень, сердце), а также - морфологическую структуру этих тканей. Выявлено развитие системного биорадикального дисбаланса в печени, сердце и, на фоне деструкции базальной мембраны, - в коже.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксидативно-антиоксидантные параметры, поляризованный полихроматический некогерентный низкоинтенсивный свет, хемилюминесценция, церулоплазмин, трансферрин, фототермолизис.

ВПЛИВ ПОЛЯРИЗОВАНОГО ПОЛІХРОМАТИЧНОГО НЕКОГЕРЕНТНОГО СВІТЛА НА БІОРАДИКАЛЬНІ ПАРАМЕТРИ ТКАНИН І СИРОВАТКИ КРОВІ ЩУРІВ**Н.В. Хміль¹, Т.М. Овсянникова¹, Н.В. Чайковська², В.Г. Подопрigorova²***1. Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків**2. ПНДЛ клінічної біофізики й антиоксидантної терапії Смоленської державної медичної академії*

Досліджувався вплив семиденного опромінення лабораторних щурів *in vivo* поляризованим поліхроматичним некогерентним низькоінтенсивним світлом на оксидативно-антиоксидантні параметри сироватки крові та тканин (шкіра, печінка, серце), а також - морфологічну структуру цих тканин. Виявлений розвиток системного біорадикального дисбалансу в печінці, серці та, на фоні деструкції базальної мембрани, - в шкірі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: оксидативно-антиоксидантні параметри, поляризоване поліхроматичне некогерентне низькоінтенсивне світло, хемілюмінісценція, церулоплазмин, трансферрин, фототермолізис.

IMPACT OF POLARIZED POLYCHROMATIC INCOHERENT LIGHT UPON BIORADICAL PARAMETERS OF RAT TISSUES AND BLOOD SERUM**N.V. Khmil¹, T.M. Ovsyannikova¹, N.V. Chaykovskaya², V.G. Podoprigorova²***1. Kharkiv National University V.N. Karazina, Kharkiv**2. Smolensk State Medical Academy, Smolensk, Russia*

The effect of a seven-day exposure of rats *in vivo* of polarized polychromatic noncoherent light (PPL) on oxidative-antioxidant parameters in blood serum and tissues (skin, liver, heart) and morphological structure of these tissues. The development of systemic bioradical imbalance in liver and heart, and also in skin through degradation of the basement membrane was revealed.

KEY WORDS: oxidative-antioxidant parameters, polarized polychromatic incoherent low-energy light, chemiluminescence, ceruloplasmin, transferrin, photothermolysis.

Исследование физических механизмов влияния электромагнитного излучения (ЭМИ) разных диапазонов и волновых характеристик на биологические объекты является не только важной фундаментальной задачей, но востребованной прикладной медицинской. Местом приложения действия разных ЭМИ многие

авторы не без основания считают биологические мембраны [1, 2, 3], а основным механизмом изменений, при их наличии, - свободно-радикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ). Результатом может быть изменение структуры клеток, претерпевающих прямое воздействие ЭМИ. Причем, даже в случае низкоинтенсивного излучения, определенный первоначальный вклад в эти процессы вносят термические эффекты ЭМИ. В тканях, отдаленных от места приложения источника облучения, происходят процессы деградации клеточных структур иного характера, иммуно-метаболического. Однако триггером их является все же повышение температуры, поэтому был предложен термин – фототермолизис – в настоящее время принятый к употреблению в научной литературе [4, 5]. Одной из практических медицинских технологий на базе ЭМИ является его эффективное использование в дерматологии для лечения большинства аспектов поражения кожи без развития побочных эффектов [6, 7]. Считается, что наиболее безопасным из них является полихроматический поляризованный некогерентный свет (ППС) [8, 9, 10]. Однако развитие побочных эффектов фототермолизиса при использовании рекомендованного в клинике режима ППС практически не изучалось. Имеются единичные сведения о генерации окислительного стресса после данного воздействия, что требует дальнейшего изучения.

Цель работы

Изучение воздействия полихроматического поляризованного некогерентного низкоэнергетического света на развитие морфо-биорадикальных изменений в тканях лабораторных животных и сыворотке крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на белых лабораторных крысах, весом 180-250 гр., разделенных на группы: 1 – контрольная № 1 (n=9), 2 – контрольная № 2 (n=5), 3 – основная группа (n=5). Процедура облучения ППС проводилась один раз в сутки на протяжении 7 дней. Источник света с длиной волны от 480 до 3400 нм (степень поляризации 95%) направлялся на предварительно выбритый участок спины площадью 5 см². Расстояние от торца излучателя до поверхности кожи составляла 10 см, время экспозиции 8 мин, плотность потока мощности излучения около 40 мВт/см².

Определение параметров оксидативного стресса проводилось при помощи активированной родамином Ж хемилюминесценции в присутствии ионов Fe²⁺ (для определения уровня перекисей липидов (ПЛ) и антиоксидантной ёмкости (АОЕ)) в сыворотке крови и гомогенатах тканей (кожа, печень, сердце) после облучения ППС [11].

Для математической оценки выраженности биорадикального оксидативно-антиоксидантного дисбаланса использовался коэффициент К, отражающий

отношение средних значений ПЛ (% от нормы) к средним значениям АОЕ (% от нормы). За норму принимаем аналогичные параметры в 1-й контрольной группе (n=9). При отсутствии дисбаланса значение коэффициента К должно равняться единице. Уровень дисбаланса считается умеренным, если значения К находятся в диапазоне 1,1-2,5; значительным – при $K \geq 2,2$ [12].

Изучение параметров внеклеточной антиоксидантной системы первой линии защиты от окислительного стресса сыворотки крови проводилось с использованием метода ЭПР-спектроскопии. Сущность метода заключается в определении парамагнитных свойств, которыми обладают молекулы с неспаренными электронами металлов с переменной валентностью, путем регистрации характерного для них ЭПР-сигнала. В крови регистрируется ряд подобных сигналов в широком диапазоне магнитного поля, наиболее интенсивные из которых сигналы двух сывороточных белков – церулоплазмينا (ЦП) и трансферрина (ТР). Их вклад в антиоксидантные свойства сыворотки крови считается весьма значимым в связи с переносом этими белками металлов с переменной валентностью – Cu и Fe.

ЭПР-спектроскопия активности АОС ЦП/ТР сыворотки проводилась на радиоспектрометре РЭ-1306. Сыворотку для исследования также получали центрифугированием в течение 10 минут при 3000 об/мин 1 мл крови после 30-ти минутного инкубирования в термостате при 37°C. С помощью автоматической пипетки 0,25 мл сыворотки помещалось в стандартную полихлорвиниловую цилиндрическую форму диаметром 4 мм и длиной 2,5 см и вместе с ней опускалось для замораживания в жидкий азот. Замороженный столбик сыворотки выдавливался и переносился для записи спектров ЭПР в специальный сосуд Дьюара, который затем помещался в резонатор ЭПР-спектрометра. Запись кривых проводилась при температуре жидкого азота при частоте клистронного генератора 9,4 Гц, скорости развертки поля 100 эрстэд/мин., постоянной времени 1,0 сек., при амплитуде модуляции 13,5 эрс., СВЧ-мощности 3 децибела, напряженности магнитного поля для определения ЦП – 3210 гаусс, ТР – 1510 гаусс.

Графически на ЭПР-спектре сыворотки крови регистрировались два сигнала: ЦП ($g=2,05$) и ТР ($g=4,3$). Результаты оценивались по величине амплитуды сигналов, которая считается пропорциональной количеству соответствующих парамагнитных центров ЦП и ТР (рис. 1). Содержание металлопротеидов ЦП и ТР выражалось в относительных единицах, получаемых путем определения отношения амплитуд сигналов ЦП и ТР к амплитуде стандартного сигнала 4-ой компоненты двуокиси марганца, умноженной на 100. За норму были приняты аналогичные параметры во 2-й контрольной группе (n=5).

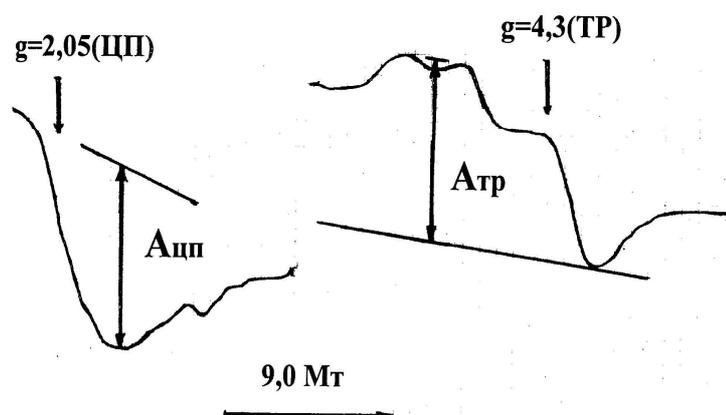


Рис. 1. ЭПР сигналы ЦП и ТР сыворотки крови в норме.

Морфологическое исследование кожи включало исследование целостности базальной мембраны эпидермиса, луковиц корней волос, фрагмента корня волоса выше шейки луковицы и сальных желез с окраской по Гомори [13].

Статистический анализ проводился с использованием программы Microsoft Excel 2003. Используя критерий согласия χ^2 (Пирсона) для проверки гипотезы о нормальности распределения выборок было показано, что для всех выборок их статистическое распределение не является нормальным. Для количественной оценки типичного уровня и вариации изучаемых признаков использовались соответственно медиана (Me), межквартильный интервал (25-й (Lq) и 75-й (Uq) процентиля). Для проверки статистических гипотез об отсутствии значимых различий между статистическими распределениями исследуемых признаков использовали непараметрический критерий Манна-Уитни для сравнения независимых групп [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованиями разных авторов было установлено, что ППС оказывает стимулирующее действие на биологические мембраны, повышает активность клеточных ферментов, улучшает тканевое дыхание, обменно-трофические процессы. Особую ценность представляют данные об универсальных механизмах фотомодифицирующего действия поляризованного полихроматического света на форменные элементы крови, что сопровождается усилением продукции иммуноглобулинов, фагоцитарной активности, восстановлением и стимуляцией антиинфекционной и противовирусной защиты организма [1, 3].

Нами в данной работе показано, что изменение биорадикального баланса под действием ППС тканеспецифично. Результаты измерений уровня ПЛ в сыворотке крови и тканях (кожи, печени, сердца) с помощью активированной

родамином Ж хемилюминесценции в первой контрольной и основной группах представлены на рисунке 2.

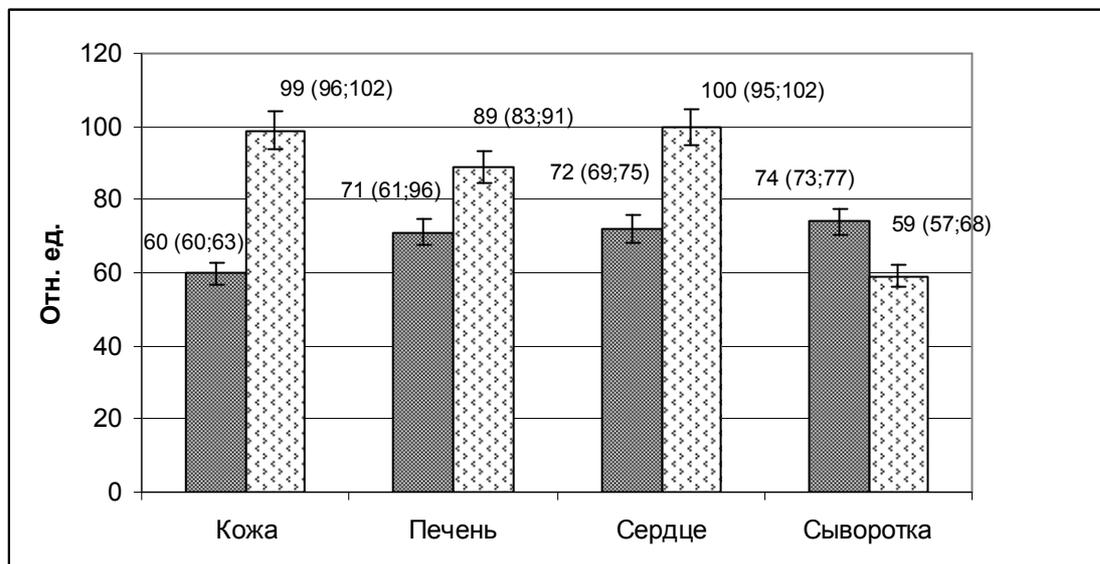


Рис 2. Показатели уровня ПЛ в сыворотке крови и тканях (кожа, печень, сердце).

После стандартного курса облучения ППС в основной группе произошло достоверное увеличение уровня ПЛ во всех тканях (коже, печени, сердце) на 65, 25 и 38 % соответственно по сравнению с контролем и снижение на 20 % уровня ПЛ в сыворотке крови, составившее 59 (57;68) отн. ед. по сравнению с контролем 74 (73;77) отн. ед. ($p < 0,05$). Полученные нами данные свидетельствуют прежде всего об активации свободно-радикальных процессов в печени, сердце и коже крыс. Снижение же уровня ПЛ в сыворотке крови не обязательно показывает уменьшение интенсивности этих процессов, поскольку ГП являются ранними продуктами ПОЛ, быстро переходящими в более поздние – малоновый диальдегид, Шиффовы основания. Их концентрацию в данной работе мы не изучали.

Возможно, установленная нами активация ПОЛ под действием ППС является следствием снижения антиоксидантных свойств исследуемых объектов. Результаты измерений уровня АОЕ в сыворотке крови и тканях (кожи, печени, сердца) с помощью хемилюминесцентного теста в первой контрольной и основной группе представлены на рисунке 3.

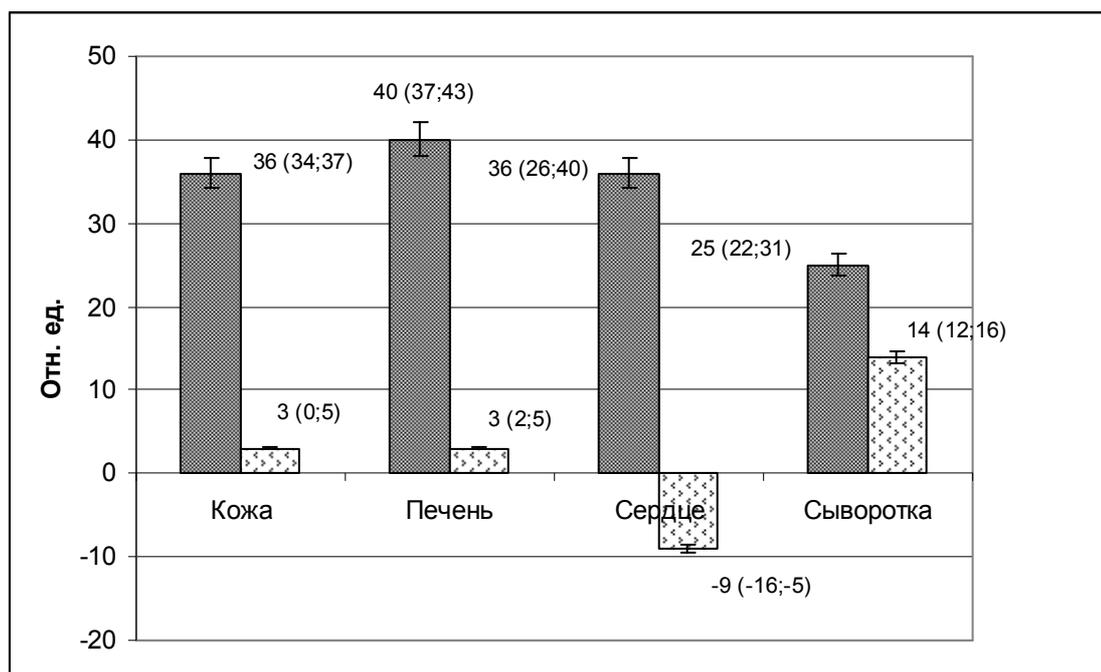


Рис. 3. Показатели уровня АОЕ в сыворотке крови и тканях (кожа, печень, сердце).

Результаты исследования приведенные на рис. 3 свидетельствуют о системном достоверном снижении АОЕ в гомогенатах тканей на 92 % в коже и печени и на 125 % в сердце по сравнению с контролем, а также снижение на 56 % АОЕ в сыворотке крови, составившее 14 (12;16) отн. Ед. по сравнению с контролем 25 (22; 31) отн. ед. ($p < 0,05$).

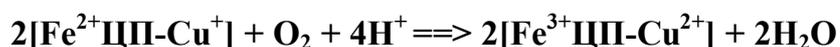
Таким образом, действительно, активация ПОЛ является причиной дисбаланса в про- и антиоксидантных системах, что свидетельствует о развитии окислительного стресса в объектах в изучаемых условиях. С целью обозначения численных величин окислительного стресса и дальнейшей количественной оценки динамики получаемых изменений, нами был предложен показатель - коэффициент К, отражающий отношение средних значений ПЛ (% от нормы) к средним значениям АОЕ (% от нормы) [12]. Расчетные значения коэффициента К, как показателя выраженности биорадикального дисбаланса после облучения ППС, представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Значение коэффициента К в сыворотке крови и тканях (кожа, печень, сердце)

Образцы	Коэффициент К
кожа	19,81
печень	16,71
сердце	163,71
сыворотка	1,42

В соответствии с полученными величинами коэффициента К, ясно видно, что после облучения ППС в коже, печени и сердце выявлен выраженный оксидативно-антиоксидантный дисбаланс (К равен 19,81, 16,71 и 163,71 соответственно), тем не менее, в сыворотке крови он составил всего 1,42, что свидетельствует об умеренном биорадикальном дисбалансе. Определенный вклад в формировании антиоксидантного пула вносят белки ТР и ЦП, депонирующие и транспортирующие в крови ионы меди и железа. Особенно важен для АОЕ ЦП, он способен разрушать свободные радикалы кислорода. Роль же ЦП в транспорте самой меди не очень значительна, поскольку оборот меди в нем медленный (основную роль в транспорте меди играют альбумин и транскупреин). Действуя как ферроксидаза, ЦП выполняет важнейшую роль в регуляции ионного состояния железа - окислении Fe^{2+} в Fe^{3+} :



ЦП синтезируется преимущественно паренхиматозными клетками печени и, в меньшей степени, макрофагами. ТР также синтезируется в печени, но и другие органы способны осуществлять его синтез. ТР является белком, входящим в перечень факторов видового иммунитета. Он участвует в уничтожении антигенов (в том числе – собственных измененных белков) макро и микрофагами. Известно, что увеличение уровня ЦП и снижение ТР сопровождается воспалением. Соотношение показателей этих белков, вероятно, может отражать динамику воспалительного процесса в организме. Результаты измерений уровня ЦП, ТР и активности АОС (ЦП/ТР) сыворотки крови у лабораторных крыс после облучения ППС с помощью ЭПР-спектроскопии представлены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели уровня ТР, ЦП и АОС (ЦП/ТР) в сыворотке крови, усл.ед.

Группы	ЦП	ТР	АОС (ЦП/ТР)
Контрольная 2 (n=5)	81,38 (77,24;82,76)	70,35 (57,93;89,66)	1,14 (0,86;1,25)
Основная группа (n=5)	50,48 (45,95;65,71)	52,38 (35,24;53,33)	1,23 (0,99;1,34)
p	p>0,05	p >0,05	p >0,05

Сравнение уровней ЦП, ТР и активности АОС ЦП/ТР в исследуемой группе показало, что после 7-дневного облучения наблюдалось снижение уровня ЦП на 38 % и уровня ТР на 26 % в основной группе по сравнению с контрольной. Таким образом, именно показатели ЦП вносят вклад в снижение АОЕ, приводящее к активации свободно-радикальных процессов. Тенденция к увеличению АОС ЦП/ТР показывает, что снижение ЦП менее значимо, чем

снижение ТР. Это свидетельствует, возможно, об отвлечении ТР на работу иммунной системы для осуществления термолизиса клеток кожи под действием ППС. Подтверждением данного предположения являются морфологические исследования.

По результатам проведенных морфологических исследований кожи с окраской по Гомори выявлено расслоение базальных мембран эпидермиса у 80 % животных, изменение фрагментов корней волос выше шейки луковицы в 80 % , сальных желез – в 60 % и луковиц корней волос – в 40 %. Полученные результаты свидетельствуют о деструктивном влиянии ППС на структурные компоненты кожи и течении воспалительного процесса умеренной силы в этой ткани. Морфологическое исследование сердца и печени не выявило структурных нарушений в этих органах.

Таким образом, полученные нами данные позволяют сделать следующие выводы.

ВЫВОДЫ

1. Процедуры с использованием ППС вызывают развитие биорадикального дисбаланса в коже, печени и сердце за счет снижения уровня АОЕ. На уровень АОЕ влияет снижение концентрации ЦП в крови. Однако, поскольку структурных изменений в печени и сердце не выявлено, можно считать данные дисбалансы в первые сутки после 7-дневного облучения ППС адаптивной реакцией.
2. Морфологическая деструкция базальной мембраны кожи свидетельствует об эффектах термолизиса в коже экспериментальных животных, вызванных воздействием ППС, сопровождающихся биорадикальным дисбалансом.
3. В сыворотке крови умеренный дисбаланс антиоксидантов первой линии защиты от окислительного стресса поддерживается за счет повышения антиоксидантной активности трансферрина, что, возможно, отчасти компенсирует развитие окислительно-антиоксидантного биорадикального дисбаланса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Zaleskayaa G. Molecular mechanisms of photochemotherapy (Review) / G. Zaleskayaa, V. Ulashchik // Journal of Applied Spectroscopy. – 2009 – V. 76, Issue 1 – P. 44–65.
2. Барабой В. А. Биологическое действие УФ-излучения / В. А. Барабой // Успехи современной биологии. – 1982. – Т. 94, №2. – С. 269–283. /Baraboj V. A. Biologicheskoe dejstvie UF-izlucheniya / V. A. Baraboj // Uspehi sovremennoj biologii. – 1982. – Т. 94, №2. – S. 269–283./
3. Красновский А. А. Механизм образования и роль синглетного кислорода в фотобиологических процессах / А. А. Красновский // Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения. М.: Наука. – 1988. – С. 23–41. /Krasnovskij A. A. Mehanizm obrazovaniya i rol' singletnogo kisloroda v fotobiologicheskikh processah / A. A. Krasnovskij // Molekuljarnye mehanizmy biologicheskogo dejstvija opticheskogo izlucheniya. M.: Nauka. – 1988. – S. 23–41./
4. Morpho-bioradical study of the impact of different modes of nonablative photothermolyzis. Oxidative Stress in Skin Biology and Medicine: 6th International Conference. – Andros, Greece. – 2014. – P. 35.

5. Действие неаблативного фототермолизиса поляризованного полихроматического некогерентного света на оксидантно-антиоксидантные параметры в сыворотке крови и тканях крыс / Н. В. Хмил, Т. Н. Овсянникова, Н. В. Чайковская, В. Г. Подопригорова // Украинский биохим. журнал. – 2014. – Т. 86., №5 (Suppl. 2). – С.146–147. /Dejstvie neablativnogo fototermolizisa poljarizovannogo polihromaticeskogo nekogerentnogo sveta na oksidantno-antioksidantnye parametry v syvorotke krovi i tkanjah krys / N. V. Hmil', T. N. Ovsjannikova, N. V. Chajkovskaja, V. G. Podoprigrorova // Ukrainskij biohim. zhurnal. – 2014. – Т. 86., №5 (Suppl. 2). – С.146–147./
6. Effect of visible light on some cellular and immune parameters / T. Kubasova, M. Horvath, K. Kocsis, M. Fenyö // Immunology and Cell Biology. – 1995. – V. 73. – P. 239–244.
7. Методы фототерапии в лечении и профилактике хронических дерматозов / С. А. Монахов, М. А. Перминова, Р. А. Шаблий Н. Б. Корчажкина, О. Ю. Олисова // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2012. – №4. – С. 33–36. /Metodi phototerapii v lechenii i profilaktike hronicheskikh dermatozov / S. A. Monakhov, M. A. Perminova, R. A. Shabliy, N.B. Korchazhkina // Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoi kul'tury. – 2012. – №4. – С. 33–36./
8. Лечение атопического дерматита у детей поляризованным полихроматическим светом / М. А. Хан, И. И. Балаболкин, Е. А. Цой [и др.] // Педиатрия. – 2000. – №2. – С. 17–20. /Lechenie atopicheskogo dermatita u detej poljarizovannym polihromaticeskim svetom / M. A. Han, I. I. Balabolkin, E. A. Coj [i dr.] // Pediatrija. – 2000. – №2. – С. 17–20./
9. Изменения микроциркуляции при использовании поляризованного полихроматического света в предоперационном периоде при косметологических операциях на лице / И. И. Ишмамеев, Е. И. Дерябин, В. В. Жаров [и др.] // Стоматология. – 2008. – №6. – С. 38–40. /Izmeneniya mikrocirkuljacii pri ispol'zovanii poljarizovannogo polihromaticeskogo sveta v predoperacionnom periode pri kosmetologicheskikh operacijah na lice / I. I. Ishmamet'ev, E. I. Derjabin, V. V. Zharov [i dr.] // Stomatologija. – 2008. – №6. – С. 38–40./
10. Сравнительная оценка ранозаживляющих эффектов при использовании аппаратов "Биоптрон", "Минитаг", "Орион+" и ламп полого катода (экспериментальное исследование) / М. М. Шарипова, С. Н. Воронова, Е. М. Рукин, А. М. Василенко // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. – 2011. – №4. – С. 42–45. /Srvnitel'naja ocenka ranozazhivljajushhix jeffektov pri ispol'zovanii apparatov "Bioptron", "Minitag", "Orion+" i lamp pologo katoda (jeksperimental'noe issledovanie) / M. M. Sharipova, S. N. Voronova, E. M. Rukin, A. M. Vasilenko // Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoi kul'tury. – 2011. – №4. – С. 42–45./
11. Владимиров Ю. А. Оценка окислительной и антирадикальной активности веществ и биологических объектов с помощью железоинициированной хемилюминисценции / Ю. А. Владимиров, М. П. Шерстнев, Т. К. Азимбаев // Биофизика. – 1992. – Вып. 6., № 37. – С. 1041–1047. /Vladimirov Ju. A. Ocenka oksitel'noj i antiradikal'noj aktivnosti veshhestv i biologicheskix ob#ektov s pomoshh'ju zhelezoinicirovannoj hemiljuminiscencii / Ju. A. Vladimirov, M. P. Sherstnev, T. K. Azimbaev // Biofizika. – 1992. – Вып. 6., № 37. – С. 1041–1047./
12. Подопригорова В. Г. Оксидативный стресс и язвенная болезнь / В. Г. Подопригорова. – М.: ОАО "Издательство"Медицина". – 2004. – 176 с. /Podoprigrorova V. G. Oksidativnyj stress i jazvennaja bolezn' / V. G. Podoprigrorova. – М.: ОАО "Izdatel'stvo"Medicina". – 2004. – 176 s./
13. Автандилов Г. Г. Медицинская морфология / Г. Г. Автандилов. – М.: Медицина. – 1990. – 379 с. /Avtandilov G. G. Medicinskaja morfologija / G. G. Avtandilov. – М.: Medicina. – 1990. – 379 s./
14. Медик В. А. Статистика в медицине и биологии (Руководство в 2 т.) / В. А.Медик, М. С. Токмачёв, Б. Б. Фишман. – М.: Медицина, – 2001. – Т. 1. – 412 с. /Medik V. A. Statistika v medicine i biologii (Rukovodstvo v 2 t.) / V. A.Medik, M. S. Tokmachjov, B. B. Fishman. – М.: Medicina, – 2001. – Т. 1. – 412 s./