

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ He-Ne ЛАЗЕРА НА СПЕКТР ЛИПИДОВ И КИНЕТИКУ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ ПРИ ПЕРИТОНИТЕ

В.А. Трофимов, М.М. Миннебаев, А.П. Власов

Кафедра биохимии (зав. — проф. Р.Е. Киселева) Мордовского государственного университета, кафедра патологической физиологии (зав. — проф. М.М. Миннебаев) Казанского государственного медицинского университета, кафедра факультетской хирургии (зав. — проф. А.П. Власов) Мордовского государственного университета

Низкоинтенсивное излучение He-Ne лазера обладает широким спектром биологической активности и находит широкое применение при лечении различных заболеваний в качестве терапевтического биостимулирующего фактора [2, 7]. Однако пути реализации его биологической активности, особенно роль липидов в этих процессах, в достаточной мере не изучены, что во многом ограничивает его применение для целенаправленной коррекции клеточных и органных функций.

Целью настоящей работы был анализ фотоиндуцированных преобразований в липидном компоненте таких хемореактивных структур крови, как тромбоциты. Полученные результаты позволяют оценивать роль биохимических изменений в спектре липидов в процессах восприятия и формирования клеточного ответа при воздействии низкоинтенсивного лазерного излучения и возможность лазерной коррекции патологических процессов в липидном обмене при перитоните.

Перитонит моделировали под наркозом у 30 беспородных собак, которым вводили в брюшную полость каловую взвесь в 0,9% растворе хлорида натрия из расчета 0,3 г/кг массы тела. Тромбоциты венозной крови, взятой в реактивной стадии перитонита и стабилизированной 0,1 М ЭДТА (в соотношении 10:1), получали путем дробного центрифугирования крови, суспендировали в буфере Тироде (рН 7,4) [8]. Липиды экстрагировали смесью хлороформ-метанол (1:2, по объему) [6]. Нейтральные липиды делили на силикагелевых пластинах (ТОО "Хромтех", Россия) в системе растворителей гексан/диэтило-

вый эфир/уксусная кислота (90:10:1, по объему). Фосфолипиды фракционировали методом двумерной хроматографии на пластинах TLC Plates (Sigma-Aldrich) с применением систем растворителей хлороформ/метанол/0,25% аммиак/вода (90:54:5:8, по объему) и хлороформ/метанол/ледяная уксусная кислота/вода (90:40:10:4, по объему). Содержание липидов определяли денситометрическим методом (денситометр Model GS-670, BIO-RAD, США) после обработки хроматограмм 5%-й фосфорномолибденовой кислотой. Для исследования агрегационной активности тромбоциты получали из венозной крови, стабилизированной 3,8% цитратом натрия (9:1, по объему), а обогащенную ими плазму — путем центрифугирования крови при 200 g в течение 10 минут и затем готовили образцы с концентрацией клеток до 200000/мкл. Кинетику агрегации тромбоцитов регистрировали оптическим методом с помощью двулучевого агрегометра THROMLITE 1006 (СП "Био-ХимМак", Москва), используя в качестве индуктора агрегации АДФ в конечной концентрации, равной 20 мкМ. Основными параметрами агрегации выбраны следующие показатели: степень — максимальное относительное изменение светопропускания в результате агрегации и скорость, представляющая тангенс угла наклона указанной касательной, а также время и характер агрегации.

Для облучения использовали He-Ne лазер ЛГ-75 (632,7 нм; 2 мВт) с экспозицией 5 минут (доза — 6 Дж/см²). Исследуемые параметры измеряли через 30 минут после облучения. Данные обрабатывали методом вариационной статис-

Влияние низкоинтенсивного излучения He-Ne лазера на спектр липидов тромбоцитов (в %) в норме и при перитоните

Липиды	Норма		Перитонит	
	до облучения	после облучения	до облучения	после облучения
Холестерин	24,51±0,71	21,65±0,49*	32,25±0,95****	34,60±1,01
Эфиры холестерина	7,00±1,20	9,85±0,60*	11,43±1,81****	10,50±2,51
1,2-диацилглицерин	3,75±0,21	1,44±0,14***	3,83±0,22	4,00±0,18
Триацилглицерин	5,71±0,60	5,45±0,40	6,00±0,66	4,18±0,46*
Свободные жирные кислоты	4,43±0,58	6,88±0,54*	7,38±0,22****	2,42±0,21***
Суммарные фосфолипиды	54,50±2,10	54,70±1,95	38,98±1,11****	44,20±2,23****
Фосфатидилэтаноламин	24,10±1,65	17,80±2,10*	30,06±1,68****	28,08±2,25
Фосфатидилинозит	7,37±0,59	11,28±1,08***	4,25±0,41****	3,03±0,34
Фосфатидилсерин	9,36±0,24	4,52±0,15***	4,88±0,34****	4,90±0,10
Фосфатидилхолин	35,60±1,17	41,03±1,48**	30,56±1,59****	37,83±2,03*
Сфингомиелин	22,46±2,39	21,66±2,40	21,92±1,34	17,89±2,04
Лизофосфатидилхолин	1,14±0,05	3,42±0,14***	7,41±0,69****	8,77±0,21
Фосфатидная кислота	0,50±0,07	1,63±0,06***	—	—

Примечание. * P < 0,05, ** P < 0,01, *** P < 0,001, **** P < 0,001 — различие с нормой.

тики с использованием критерия Стьюдента.

Как показали результаты наших исследований и данные других авторов [2], наиболее выраженная биостимулирующая активность излучения He-Ne лазера характерна для оптического воздействия в течение 5 минут (биологическая доза — 6 Дж/см²). В такой дозе низкоинтенсивное лазерное излучение индуцирует в составе липидов тромбоцитов широкий спектр изменений (см. табл.).

Опосредованное лазерной биостимуляцией усиление обмена липидов проявляется увеличением содержания фосфотидной кислоты (в 3,3 раза), фосфатидилхолина (на 15,3%) и фосфатидилинозита (на 53,1%), фонды которых, как известно, служат в метаболических циклах источниками для образования вторичных мессенджеров [12, 13]. Запуск липидзависимых сигнальных систем при фотостимуляции может стать молекулярной основой для формирования клеточного ответа. В пользу этого также свидетельствует рост в фотомодифицированных тромбоцитах уровня свободных жирных кислот (на 55,3%) и лизофосфатидилхолина (в 3 раза) — продуктов гидролитического расщепления фосфатидилхолина при участии фосфолипазы A₂. Известно, что как лизофосфатидилхолин, так и арахидоновая кислота, преобладающая в пуле сво-

бодных жирных кислот вследствие высокой специфичности фосфолипазы A₂ к арахидонатсодержащим фосфолипидам, являются вторичными мессенджерами, участвующими в передаче сигнала в клетку [13]. Для изменения структурно-функционального состояния биомембран тромбоцитов существенным фактором является уменьшение доли аминокислотсодержащих фосфолипидов фосфатидилэтанолamina (на 26%), фосфатидилсерина (на 51,7%) и холестерина (на 11,7%) — важнейшего регулятора жидкостного состояния биомембран.

Отмеченные изменения в спектре липидов могут лежать в основе модификации функциональной активности тромбоцитов, поскольку они вызывают перераспределение числа аминокислотных групп, изменение заряда, микровязкость и, как следствие, адгезивность [11]. В частности, увеличение концентрации холестерина и рост “жесткости” биомембран являются важнейшими условиями агрегации тромбоцитов [3]. В то же время цвиттерион фосфатидилхолин предотвращает агрегацию [4], поэтому его накопление, наряду с другими фотоиндуцированными сдвигами в липидном компоненте, указывает на понижение агрегационных свойств тромбоцитов.

В норме основные параметры кинетики АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов имеют следующие величины: степень — 33,30±4,76%, максималь-

ная скорость — $1,21 \pm 0,15$ tg/a, время агрегации — $123,6 \pm 17,8$ с. Для фотомодифицированных тромбоцитов характерно уменьшение величины степени агрегации в среднем на 43% ($P < 0,001$), рост скорости на 49% ($P < 0,001$) и сокращение времени агрегации на 10% по отношению к контролю. Низкоинтенсивное лазерное излучение модифицирует физиологическую активность тромбоцитов, ограничивая процесс агрегации. В основе модификации функций тромбоцитов, по-видимому, могут лежать как отмеченные выше фотоиндуцированные качественные и количественные изменения в составе мембранных липидов, так и понижение хемочувствительности тромбоцитов к агрегирующему действию АДФ. При этом увеличение скорости агрегационного процесса, по-видимому, является следствием фотоиндуцированной активации липидзависимых сигнальных систем и образования интермедиатов липидного обмена — вторичных посредников, играющих важную роль в процессе агрегации тромбоцитов.

В реактивной стадии перитонита в липидном спектре тромбоцитов происходят существенные изменения. На фоне понижения содержания суммарных фосфолипидов отмечается рост доли холестерина (на 31,6%) и его эфиров (на 63,3%), а также свободных жирных кислот (на 66,6%). Накопление фосфатидилэтаноламина (на 24,7%) сочетается с понижением уровня фосфотидилинозита (на 42,3%) и фосфатидилсерина (на 47,9%). Уменьшение доли фосфатидилхолина (на 14,2%) сопряжено с существенным увеличением содержания лизофосфолипидов (на 550%).

Динамика содержания различных липидов, в том числе бурный рост содержания свободных жирных кислот и лизофосфатидилхолина, а также уменьшение уровня фосфолипидов, являются отражением высокой активности фосфолипаз и преобладания в модифицированных тромбоцитах гидролитических процессов. Данный комплекс биохимических изменений, в том числе повышение уровня холестерина и фосфатидилэтаноламина, а также понижение доли отрицательно заряженных фосфа-

тидилсерина и фосфатидилинозита, как свидетельствуют данные литературы, среди прочих причин могут лежать в основе роста агрегационной активности тромбоцитов [1, 4, 5].

Действительно, при перитоните агрегационная активность тромбоцитов резко возрастает: степень и максимальная скорость агрегации соответственно повышаются на 66% и 88,4% ($P < 0,001$), время сокращается на 11% ($P < 0,05$); отмечается практически полное отсутствие времени задержки по сравнению с нормой. Очевидно, дисфункции тромбоцитов при перитоните могут быть обусловлены различными причинами. Например, типичны для воспалительного процесса повышение содержания биологически активных соединений (АДФ, ФАТ, серотонина и др.) [10], поступление в кровь активных внутриклеточных протеаз, тромбо-пластических субстанций и активация контактных факторов, которые усиливают агрегацию тромбоцитов [9]. Однако, как было отмечено выше, молекулярной основой гиперфункции тромбоцитов при перитоните могут выступать и соответствующие изменения в спектре мембранных липидов.

При перитоните низкоинтенсивное лазерное излучение стимулирует комплекс качественных и количественных сдвигов в спектре липидов тромбоцитов, включающий уменьшение доли триацилглицеридов (на 30,3%), свободных жирных кислот (на 67,2%), увеличение доли суммарных фосфолипидов (на 13,4%), а также накопление фосфатидилхолина (на 23,8%). Рост доли фосфатидилхолина, важнейшего структурно-функционального компонента биомембран, точнее, восполнение его фонда следует отнести к позитивным фотоиндуцированным изменениям приспособительно-компенсаторного характера. При изучаемой патологии в тромбоцитах лазерное облучение подавляет накопление свободных жирных кислот, обладающих мембранно-деструктивным действием, что может быть следствием как фотомодификации фосфолипазы A_2 и ограничения ее высокой каталитической активности, так и активизации био-

синтетических процессов, приводящих к увеличению содержания суммарных фосфолипидов. В этой связи становится очевидным то, что лазерное облучение способствует понижению высокого уровня функциональной активности тромбоцитов при перитоните. В таких условиях параметры кинетики агрегации фотомодифицированных тромбоцитов при действии 20 мкМ АДФ изменяются следующим образом: величина степени агрегации уменьшается на 55% ($P < 0,001$), скорость практически не изменяется, время увеличивается на 12,6% ($P < 0,05$) относительно исходных параметров.

Таким образом, низкоинтенсивное излучение He-Ne лазера оказывает на обмен липидов в тромбоцитах модифицирующее действие, обнаруживая ряд специфических особенностей в норме и при перитоните. Во-первых, инициирует запуск липидзависимых сигнальных систем, интермедиатами которых являются свободные жирные кислоты, лизофосфатидилхолин, 1,2-диацилглицерин, фосфатидная кислота, фосфатидилинозит. Во-вторых, стимулирует сдвиги в спектре липидов, которые сопряжены с изменениями физико-химического состояния биомембран и, вероятно, носят приспособительный характер. При перитоните инициируемые лазерным излучением изменения в спектре липидов тромбоцитов, по-видимому, носят компенсаторно-приспособительный характер, позволяющий, по крайней мере, частично нивелировать негативные последствия, вызванные накоплением свободных жирных кислот, понижением уровня суммарных фосфолипидов и доли фосфатидилхолина. При перитоните лазерное излучение оказывает на липидный обмен корригирующее действие. Модификация липидного компонента фотомодифицированных тромбоцитов во многом обуславливает низкий уровень их агрегационной активности в норме и при патологии.

1. Андреевко Г.В., Суворова Л.А.//Успехи совр. биол. — 1986. — Вып. 3. — С. 436—448.
2. Брискин Б.С., Полонский А.К. и др.//Клин. мед. — 1996. — № 1. — С. 54—55.
3. Гуревич В.С., Штаталина Л.В. и др.//Биохимия. — 1992. — Вып. 2. — С. 267—274.
4. Зубаиров Д.М.//Соросовский образоват. журн. — 1977. — № 3. — С. 46—52.
5. Ишанходжаев Т.М., Борников В.Т. и др.//Биохимия. — 1990. — Вып. 8. — С. 1507—1512.
6. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. — М., 1975.
7. Козлов В.И., Буйлин В.А., Самойлов Н.Г., Марков И.И. Основы лазерной физио- и рефлексотерапии. — Самара—Киев, 1993.
8. Самаль А.Б., Черенкевич С.Н., Хмара Н.Ф. Агрегация тромбоцитов: методы изучения и механизмы. — Минск, 1990.
9. Чаленко В.В.//Вестн. хир. — 1990. — № 8. — С. 41—45.
10. Bazzoni G., Dejana E., Del Maschio A.//Haematologia. — 1991. — Vol. 76. — P. 491—499.
11. Boesze-Battaglia K., Schimmell R.J.//Biophys. J. — 1994. — Vol. 66. — P. 60.
12. Nishizuka Y.//Science. — 1992. — Vol. 258. — P. 607—614.
13. Nozawa Y., Nakachima S., Nagata K.//Biochim. Biophys. Acta. — 1991. — Vol. 1082. — P. 219—238.

Поступила 14.05.98.

INFLUENCE OF THE LOW-INTENSITY He-Ne LASER RADIATION ON LIPID SPECTRUM AND THROMBOCYTE AGGREGATION KINETICS IN PERITONITIS

V.A. Trofimov, M.M. Minnebaev, A.P. Vlasov

S u m m a r y

Low-intensity He-Ne laser radiation has a modifying effect on lipid exchange in thrombocytes, firstly it initiates the start of lipid-dependent signal systems, the intermediates of which are free fatty acids, lisophosphatidylcholin, 1,2-diacylglycerol, phosphatidic acid, phosphatidylinositol, secondly, it stimulates metabolic changes in lipid spectrum, which are attended by the changes of physicochemical states of biomembranes and are of adaptational nature in normal state and compensate-adaptational nature in peritonitis. Laser radiation has a correcting effect on lipid exchange. The lipid component modification of photomodified thrombocytes provokes to a considerable extent the low level of their aggregational activity in normal state and in peritonitis.