

ФОТОМОДИФИКАЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗЫ НИЗКОИНТЕНСИВНЫМ СВЕТОМ НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ РАЗЛИЧНЫМИ СТРЕСС-ФАКТОРАМИ

© 2017 г. А.П. Баврина, В.А. Монич, С.Л. Малиновская

Нижегородская государственная медицинская академия МЗ РФ,
603005, Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, 10/1

E-mail: annabavr@rambler.ru

Поступила в редакцию 14.09.16 г.

После доработки 15.03.17 г.

Представлены результаты исследования ферментативной активности глутатион-S-трансферазы в сыворотке крови крыс при воздействии низкоинтенсивным красным светом на фоне альтерации различными физическими факторами (гамма-излучением, лазерным излучением красного и инфракрасного диапазона высокой мощности) и наложением асфиксии. Показана схожая динамика угнетения активности фермента под действием всех вышеперечисленных стресс-факторов и его реактивация после воздействия низкоинтенсивным красным светом. На основе проведенных исследований сделан вывод о возможности фотомодификации фермента глутатион-S-трансферазы.

Ключевые слова: глутатион-S-трансфераза, красный свет, высокоинтенсивное лазерное излучение, гамма-излучение, асфиксия.

Известно, что одним из ключевых механизмов фотобиологического действия низкоинтенсивного света является фотомодификация активности ферментов, в том числе антиоксидантных, и фотодиссоциация нитрозильных комплексов [1,2], что приводит к снижению содержания продуктов свободнорадикального окисления в исследуемых тканях [3]. Вместе с тем исследована роль не всех звеньев ферментативной регуляции окислительных процессов в развитии каскада фотохимических процессов. Интерес представляет изучение возможности модификации активности фермента глутатион-S-трансферазы (GST), которая обнаружена практически во всех животных клетках и катализирует большое количество реакций, а также является одним из распространенных ферментов, использующихся для оценки активности антиоксидантной системы организма. Наиболее универсальная и важная сфера активности GST – двойная роль в защите от оксидативного стресса: восстановление активных форм кислорода (кроме H_2O_2), органических полиненасыщенных жирных кислот, фосфолипидов, белков, нуклеотидов и нуклеиновых кислот и конъюгирование с восстановленным глутатионом вторичных ме-

таболитов окислительного стресса – альдегидов, хинонов, эпоксидов [4].

Целью исследования было изучение влияния низкоинтенсивного широкополосного света красного диапазона на активность фермента GST после альтерации крыс различными физическими факторами (гамма-излучением, лазерным излучением красного и инфракрасного диапазона высокой мощности) и наложением асфиксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на самцах беспородных белых крыс массой 180–250 г и возрастом три–четыре месяца. Для модификации активности GST использовали следующие факторы:

- низкоинтенсивное широкополосное излучение красного диапазона;
- гамма-излучение;
- высокоинтенсивное лазерное излучение красного и инфракрасного диапазонов;
- наложение асфиксии.

В каждом эксперименте был использован один из перечисленных стресс-факторов с последующим воздействием низкоинтенсивным широкополосным красным светом и выделены

Сокращение: GST – глутатион-S-трансфераза.

три группы животных, содержащихся в одинаковых условиях:

– контрольная (подвергалась воздействию стресс-фактора);

– опытная (подвергалась воздействию стресс-фактора с последующим действием широкополосного красного света);

– интактная (не подвергалась воздействию ни стресс-фактора, ни широкополосного красного света; животных фиксировали и наркотизировали по схеме контрольной и опытной групп).

В настоящее время известна биологическая особенность живых объектов, заключающаяся в отсутствии заметных сдвигов биохимических и физиологических показателей при воздействии на них низкоинтенсивным светом видимого и ближнего инфракрасного диапазонов [5]. При этом данная адаптационная возможность к действию света нетепловых интенсивностей наблюдалась только у патологически неизмененных биологических объектов. В связи с вышесказанным мы отдельно не выделяли группу животных, подвергавшихся влиянию только низкоинтенсивного широкополосного красного света.

Моделирование развития радиационного поражения сердца проводили путем локального облучения проекционной области сердца крыс на установке «Луч-1» (энергия гамма-квантов, получаемых при распаде кобальта 60, имела два пика – 1,17 и 1,33 МэВ). Доза облучения составила 9 Гр. Световое облучение широкополосным красным светом области сердца проводили в течение 20 мин ежедневно в течение четырех суток. Интенсивность света в зоне светового пятна была равна 5 мВт/см². В эксперименте использовали широкополосный свет сверхяркого светодиода с максимумом спектрального диапазона 630 нм и шириной на полувысоте 20 нм. При прохождении через грудину интенсивность света снижалась на 20%. В данном эксперименте забор биоматериала (сыворотки крови) проводили на четвертые сутки.

Эксперименты по влиянию широкополосного красного света после альтерации мышечной ткани крыс высокоинтенсивным лазерным излучением осуществляли с помощью высокоинтенсивных лазеров красного (длина волны 671 нм) и инфракрасного (длина волны 980 нм) диапазонов. Мощность обоих лазеров составляла 50 мВт. Облучению лазерным светом высокой мощности подвергали внутреннюю поверхность бедра крыс, зона облучения была разделена на девять полей площадью 1 мм²

каждое, время экспозиции каждого поля составляло 5 мин, интенсивность излучения лазера в месте светового пятна составляла 0,5 Вт/см². Опытная группа получала три ежедневных сеанса облучения широкополосным красным светом, параметры которого соответствовали таковым в предыдущих экспериментах. Забор биоматериала (сыворотки крови) проводили на третьи сутки.

Моделирование асфиксии проводили с помощью мягкой конусообразной запаянной трубки, диаметр которой соответствовал диаметру трахеи крыс. Трубку вставляли через ротовое отверстие и перекрывали поступление воздуха через трахею и носоглотку в течение двух минут. Облучение области сердца и легких широкополосным красным светом с интенсивностью 5 мВт/см² осуществляли через трахею с помощью полимерного световода (ширина спектра на полувысоте 70 нм, длина волны в пике спектра 640 нм) в течение 10 мин. Забор биоматериала (сыворотки крови) проводили через час после наложения асфиксии. Во всех экспериментах полученную у животных кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин для получения сыворотки крови.

Анализ активности GST проводили по скорости образования глутатион-S-конъюгатов между восстановленным глутатионом и 1-хлор-2,4-динитробензолом [6]. Водный раствор образующегося продукта имеет максимум поглощения при 340 нм. В 10 мм кювету с опытной пробой вносили 1,2 мл 2 мМ раствора восстановленного глутатиона и 0,1 мл сыворотки крови. Реакцию инициировали внесением в обе кюветы по 1,2 мл 2 мМ 1-хлор-2,4-нитробензола. Оптическую плотность опытной пробы измеряли сразу и через 3 мин против контроля, в который вместо сыворотки крови вносили 0,1 мл H₂O. Активность фермента выражали в моль/(л·мин), полученные результаты для интактной группы соответствуют литературным данным [7,8].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакетов программ Microsoft Excel и SPSS Statistics Version 21. Достоверность показателей в группах оценивали по критерию Стьюдента. Соответствие опытных данных нормальному распределению проверяли по критерию Шапиро–Уилка, для определения принадлежности данных всех анализируемых групп одному закону распределения использовали критерий Колмогорова–Смирнова.

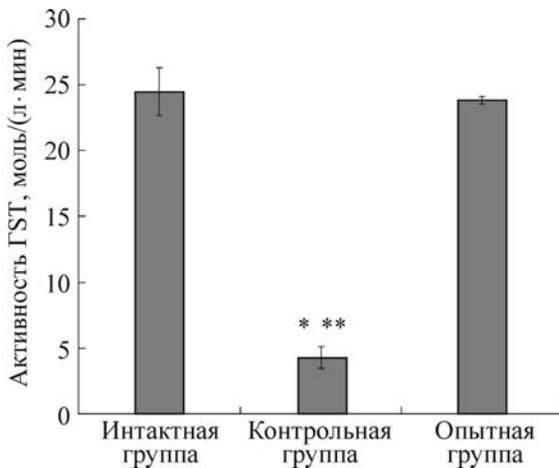


Рис. 1. Активность GST в сыворотке крови крыс при последовательном облучении области сердца гамма-излучением и широкополосным красным светом; * – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) между контрольной и интактной группами, ** – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) между контрольной и опытной группами.

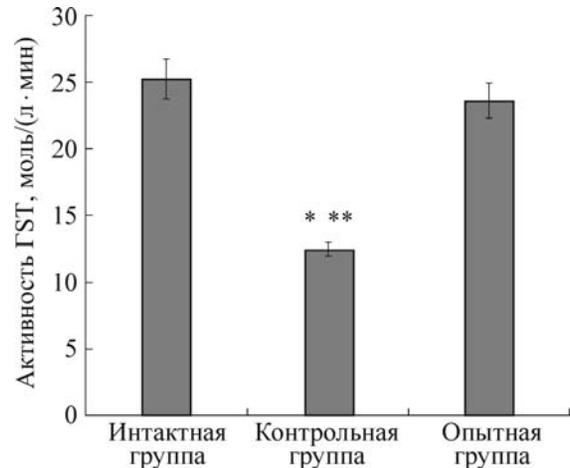


Рис. 2. Активность GST в сыворотке крови крыс при последовательном наложении асфиксии и воздействии широкополосным красным светом; * – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) в сравнении с интактной группой, ** – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) между контрольной и опытной группами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В эксперименте с использованием в качестве стресс-фактора гамма-излучения обнаружено статистически значимое снижение активности фермента GST в сыворотке крови контрольной группы животных (рис. 1). Этот эффект связан с действием ионизирующей радиации, затрагивающим все системы организма, в том числе, приводящим к угнетению антиоксидантной системы. В сыворотке крови животных опытной группы наблюдалось увеличение активности фермента GST в 5,6 раза по сравнению с данными для контрольной группы. Кроме того, из рис. 1 видно, что различия между данными для интактной и опытной групп отсутствуют, что свидетельствует о возможности коррекции активности GST с помощью экспонирования проекционной области сердца низкоинтенсивным красным светом.

В серии опытов с применением в качестве стресс-фактора красного и инфракрасного ла-

зерного излучения также было обнаружено статистически значимое снижение активности фермента GST в сыворотке крови лабораторных животных контрольной группы (таблица). Кроме того, в ответ на воздействие широкополосным красным светом (опытная группа) наблюдалась реактивация этого фермента до уровня интактной группы. Качественно эффекты фотомодификации были подобными при использовании в качестве стресс-фактора лазерного света красного и инфракрасного диапазонов.

В эксперименте с последовательным наложением асфиксии на крыс и освещением широкополосным красным светом изменение активности фермента GST имело схожую динамику. В контрольной группе был обеспечен спад активности GST и фотореактивация этого фермента в опытной группе до уровня, соответствующего интактной (рис. 2). Следует отметить, что отличия между данными для интактной и контрольной, контрольной и опытной групп были статистически значимыми.

Активность GST (моль/(л·мин)) в сыворотке крови крыс при последовательном облучении внутренней поверхности бедра высокоинтенсивным лазерным излучением и широкополосным красным светом

Спектр излучения лазера высокой интенсивности	Интактная группа животных	Контрольная группа животных	Опытная группа животных
Красный	24,4 ± 3,6	15,5 ± 2,9* **	24,1 ± 5,0
Инфракрасный	24,4 ± 3,6	17,8 ± 1,99* **	21,6 ± 4,7

Примечание. * – Статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) между интактной и контрольной группами, ** – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) между контрольной и опытной группами.

Наблюдавшаяся в данной работе фотореактивация фермента GST может быть обусловлена несколькими процессами. Во-первых, возможна фотомодификация биополимеров путем светового воздействия на их слабые электронно-конформационные связи [9]. Во-вторых, в экспериментах *in vivo* модификация активности ферментов может быть обусловлена и вызванными светом изменениями рН жидких сред организма [10], при этом известно, что глутатионтрансферазная активность увеличивается при повышении рН среды [11]. В рамках данного исследования важным является факт, что GST активируется кальцием [4], а при фотоиндуцированной реактивации цитохром *c* оксидазы увеличивается его транспорт [12].

ВЫВОДЫ

1. Воздействие низкоинтенсивным широкополосным красным светом на проекционную область сердца и скелетную мышцу крысы после локального воздействия на эти области ионизирующей радиацией или лазерным светом высокой интенсивности, либо после наложения на крысу асфиксии приводит к увеличению ферментативной активности GST в сыворотке крови крыс.

2. Фермент GST является одним из ключевых компонентов отклика биологических тканей на низкоинтенсивное световое воздействие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Y. A. Vladimirov, A. N. Osipov, and G. I. Klebanov, *Biochemistry* **69** (1), 81 (2004).
2. T. Karu, *J. Photochem. Photobiol. B* **49**, 1 (1999).
3. А. П. Баврина, С. Л. Малиновская, В. С. Ермолаев и В. А. Монич, *Современные технологии в медицине* **2**, 32 (2014).
4. В. И. Кулинский и Л. С. Колесниченко, *Биомед. химия* **55** (3), 255 (2009).
5. С. В. Москвин, Д. Ю. Ключников, Е. В. Антипов и др., *Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. культуры* **6** (91), 40 (2014).
6. А. И. Карпищенко, *Медицинские лабораторные технологии* (Интермедика, СПб., 2002).
7. М. В. Ведунова, Е. А. Блесткина и К. Н. Контрщикова, *Вестн. Нижегородского ун-та им. Н. И. Лобачевского*, № 3, 107 (2009).
8. М. В. Ведунова, Е. А. Блесткина и К. Н. Контрщикова, *Вестн. Нижегородского ун-та им. Н. И. Лобачевского*, № 4, 92 (2008).
9. Н. Ф. Гамалея, в сб. *Лазеры в клинической медицине* (Медицина, М., 1981), сс. 35–85.
10. Т. А. Джибладзе, *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии* **2** (2), 48 (2003).
11. А. Хамдаллах и В. В. Давыдов, *Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского* **27** (66), 3 (2014).
12. Т. В. Мачнева, Е.А. Буравлев, Н. Н. Булгакова и др., *Биофизика* **56** (4), 705 (2011).

Photomodification of Glutathione-S-Transferase Activity by Low-Intensity Light against the Impact of Various Stress Factors

A.P. Bavrina, V.A. Monich, and S.L. Malinovskaya

Nizhny Novgorod State Medical Academy, pl. Minina i Pozharskogo 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

Results of the study of the enzymatic activity of glutathione-S-transferase in blood serum of rats after exposure to low-intensity red light against various physical factors (gamma radiation, red and infrared high power laser radiation) and superimpose of asphyxia have been presented. Similar dynamics of suppression of enzyme activity under the influence of all these stressors and enzyme reactivation after exposure to low-intensity red light have been shown. Based on these studies the conclusion on the possibility of photomodification of glutathione-S-transferase was made.

Keywords: glutathione-S-transferase, red light, high-level laser radiation, gamma radiation, asphyxia