

**Теоретическая и профилактическая медицина**

УДК 577.152.199+615.849.19

**Региональное влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нитрергическую систему мозга****О.А. Мовсисян, Н.Х. Алчуджян, Н.О. Мовсисян,  
Г.Г. Минасян, Р.Л. Айрапетян, Г.А. Геворкян***Институт биохимии им. Г.Х. Бунятына НАН РА  
0014, Ереван, ул. П.Севака, 5/1*

*Ключевые слова:* He-Ne лазер, аргинин, мозг, синтаза оксида азота, цитруллин

Низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) способствует улучшению микроциркуляции, нейропротекции, антипатогенной защиты и успешно применяется во всех областях медицинской практики — кардиологии, неврологии, психоэндокринологии и т.д. [5, 14]. Накоплены данные, свидетельствующие, что ферментативная система синтеза универсального биомедиатора, оксида азота (NO), опосредует терапевтические эффекты НИЛИ [1, 19]. В органах и тканях функционируют разные изоформы NO синтазы (NOS), из них наиболее изучены и известны: Ca<sup>2+</sup>-кальмодулин (CaM)-зависимые “конститутивные” NOS (cNOS) (нейрональная и эндотелиальная, pNOS и eNOS, соответственно), участвующие в регуляции центральной и вегетативной нервной систем, а также сердечно-сосудистой, дыхательной, и прочих систем организма, и Ca<sup>2+</sup>-CaM-независимая “индуцибельная” NOS (iNOS), эффектор иммунного и воспалительного ответа, осуществляющая антипатогенную и противоопухолевую защиту [10, 11]. Отличия в регуляции и функциях изоформ NOS проявляются при их вовлечении в патогенез широкого спектра заболеваний, включая инфекционные, онкологические, нейродегенеративные, психические, аутоиммунные и т.д., что может быть использовано для избирательной фармакокоррекции в практической медицине [15, 24]. Однако, как выяснилось, подобные препараты часто оказывают побочные нежелательные эффекты, исключающие их внедрение в клиническую практику [26]. Так, мультицентровое исследование (117 центров из 26 стран; 1997-1998 гг) влияния неселективного ингибитора NOS, 546C88 (N<sup>G</sup>-мометил-L-аргинина, L-NMMA) показало повышенную смертность пациентов с септическим шоком, получавших L-NMMA (309 из 522 больных); по сравнению с

группой, получавшей плацебо, в связи с чем было принято решение о нежелательности дальнейшей разработки данного препарата [22]. Поиск новых нефармакологических способов воздействия на изоферменты NOS, включая электромагнитное излучение, является одним из подходов к решению проблемы, и в этом направлении уже ведутся исследования. Недавно было показано, что НИЛИ оказывает ингибирующее воздействие разной степени на активность различных изоферментов NOS в коре головного мозга крыс при экспериментальном инсульте [18]. В представленной работе изучено влияние облучения He-Ne лазером на активность изоформ NOS и уровень метаболитов NO синтазной реакции в разных регионах мозга крыс.

## Материал и методы

Эксперименты проводили на беспородных молодых самцах белых крыс массой 100-150г, содержащихся в виварии в естественных условиях освещения и свободного доступа к воде и пище. Животные были разделены на контрольную и опытные группы ( $n=5$ /группу) в зависимости от параметров облучения He-Ne лазером.

*Процедура облучения.* Одноразовое облучение проводили гелий-неоновым лазером ЛГН-111 ( $\lambda=632,86$  нм). Тело животного фиксировалось и в область экспонируемого участка (спина) направлялся пучок излучения со средней мощностью 1,5 мВт, диаметром – 0,03 см и 1,3 см, разной энергией – 135 мДж и 900 мДж, в зависимости от длительности экспозиции (1,5 и 10 мин). В качестве контроля служили необлученные животные, содержащиеся в тех же условиях.

*Выделение структур мозга.* Через 24 ч после облучения животных декапитировали, извлекали мозг и на льду выделяли кору больших полушарий, гиппокамп, полосатое тело (стриатум) и гипоталамус. Структуры мозга гомогенизировали в течение 2 мин в 10 объемах 20 мМ HEPES буфера (pH=7,4), содержащего 2мМ дитиотреитол и 3 мМ  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ . В гомогенатах определяли активность изоформ NOS и содержание субстрата и продуктов реакции NOS.

*Определение активности изоформ NOS.* Активность NOS определяли по продукции активных форм азота (АФА) при долговременной инкубации (20 ч, 37°C) гомогенатов исследуемых структур мозга в 20 мМ HEPES буфере pH 7,4, содержащем 2мМ дитиотреитол, 3 мМ  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ . В инкубационную смесь, в зависимости от условий опыта, вводили 1,15 мМ EDTA или 1,73 мМ  $CaCl_2$ . Общая активность NOS определялась при инкубации проб в присутствии 1,73 мМ  $CaCl_2$ , активность iNOS – в присутствии 1,15 мМ EDTA; активность cNOS вычислялась по разности активностей общей NOS и iNOS. Концентрацию белка оценивали по методу Лоури [20]. Активность NOS выражали в нмоль ( $NO_2^-$ )  $\cdot$  мг<sup>-1</sup> белка  $\cdot$  20 ч<sup>-1</sup>.

*Определение активных форм азота.* Содержание АФА, то есть NO и его стабильных интермедиатов, окислов азота ( $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$ ), нитрозотиолов, нитрозаминов, определяли на основе неспецифической реакции диазотирования с использованием реактива Грисса-Илосвая в супернатантах депротеинизированных проб (осаждение белков осуществляли 0,5N NaOH и 10%  $\text{ZnSO}_4$ ) спектрофотометрически при длине волны 546 нм [27].

*Определение L-аргинина и L-цитруллина.* Содержание L-аргинина определяли методом [9] и L-цитруллина, используя набор Био-Ла-тест (La Chema, Чехия).

*Статистическая обработка результатов.* Достоверность различий средних значений параметров и корреляций (коэффициент линейной корреляции по Пирсону, r) по группам оценивали по t-критерию Стьюдента. В качестве критерия достоверности принимали  $P < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Известно, что НИЛИ оказывает терапевтическое воздействие через потенцирование антибактериального, детоксикационного и иммуностимулирующего эффектов, которые проявляются в определенном диапазоне мощности, частоты и экспозиции [2]. При этом местные эффекты НИЛИ являются частью генерализованной ответной реакции на это неионизирующее излучение и подчиняются тем же закономерностям, и доза определяет результат – стимуляцию жизнедеятельности или угнетение биологической системы [3]. Изучение зависимости биологического действия НИЛИ от параметров излучения также важно для правильной интерпретации экспериментальных результатов [21]. Исходя из вышеизложенного, активность различных изоформ NOS в регионах мозга крыс исследовали при варьировании энергии и интенсивности (разный диаметр пучка) гелий-неонового лазерного излучения (рис. 1). Изучение картины распределения активности изоформ NOS в структурах мозга осуществляли на основе методики длительного инкубирования гомогенатов. При этом у контрольных крыс наряду с cNOS детектировалась конститутивно функционирующая iNOS, что совпадает с последними сообщениями других авторов [13, 32]. Ведущая роль в продукции NO отводится iNOS астроцитам – их число в 10-100 раз превосходит, в зависимости от области мозга, количество нейронов, которые воздействуют на нейрональную сеть, участвуя в сложной поведенческой реакции на стресс [13, 17]. Следует отметить, что iNOS в отличие от cNOS способна продуцировать NO довольно длительное время (несколько суток), поэтому она существенно влияет на аккумуляцию NO, который, запуская экспрессию цитопротекторов, гемоксигеназы-1 и белка теплового шока HSP70,

повышает резистентность клеток, в том числе в разных регионах мозга [28, 29]. Так, нейроны, содержащие NO-синтазу, проявляют устойчивость к разнообразным патологическим воздействиям [8]. В свете современных представлений, NO-ергическая система является наследственным адаптогенным стресс-лимитирующим фактором, и депонирование NO – это мощный протекторный механизм от стресса и стресс-индуцированных болезней [7].

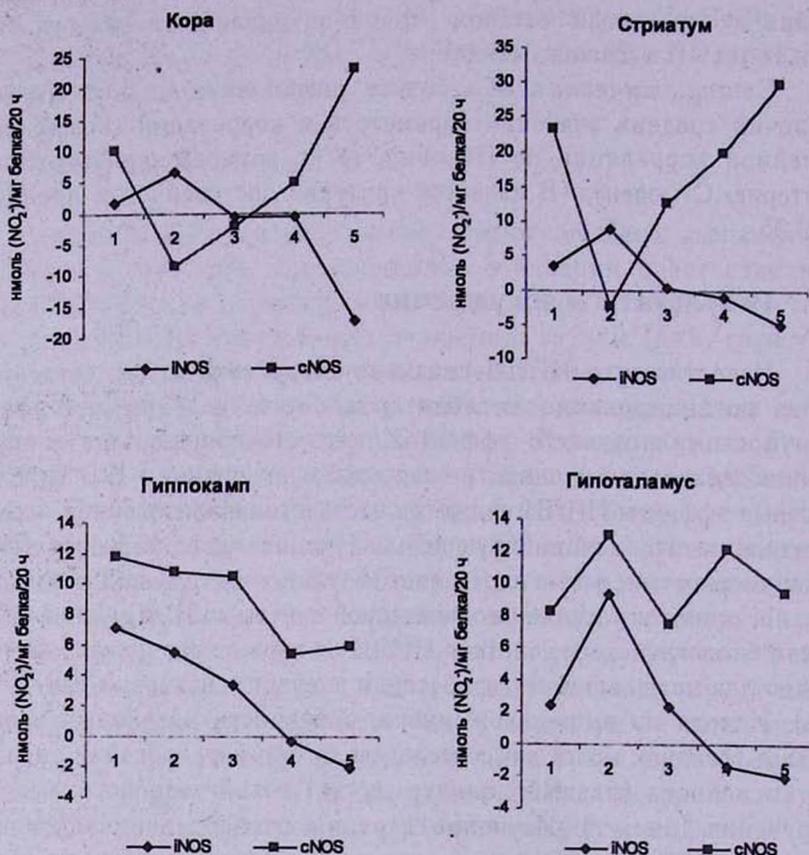


Рис. 1. Влияние энергии и диаметра пучка гелий-неонового лазерного излучения на активность изоформ NOS в структурах мозга. 1 – контроль; 2 – 135 мДж/0,03 см; 3 – 900 мДж/0,03 см; 4 – 135 мДж/1,3 см; 5 – 900 мДж/1,3 см

У контрольных животных распределение активности iNOS было следующим: гиппокамп – 7,08, стриатум – 3,56, гипоталамус – 2,45 и кора – 1,76  $\text{nmol}(\text{NO}_2^-) \cdot \text{mg}^{-1} \text{ белка} \cdot 20 \text{ ч}^{-1}$ . В то же время активность cNOS доминировала во всех структурах и убывала по ряду: стриатум > гиппокамп > кора > гипоталамус, составляя 23,38; 11,75; 10,07 и 8,28  $\text{nmol}(\text{NO}_2^-) \cdot \text{mg}^{-1} \text{ белка} \cdot 20 \text{ ч}^{-1}$  соответственно. Базальный уровень

NO и его стабильных интермедиатов (АФА) в гомогенатах структур мозга положительно коррелировал с активностью iNOS, и cNOS ( $r=0,9265; 0,8606$  соответственно,  $p < 0,001$ ). Высокая активность исследуемых изоформ NOS и содержание АФА обнаруживались в стриатуме и гиппокампе, где система NOS/NO, участвуя в длительной синаптической потенциации, обеспечивает пластичность межнейронных связей, лежащих в основе обучения и памяти [23]. В стриатуме нитрергическая система принимает участие в контроле моторных функций, координации движений, а в гипоталамусе – в регуляции эмоционального поведения (страх, агрессия): pNOS-делетированные мыши агрессивны и чрезмерно сексуальны [цит. по 6].

При параметрах облучения 135 мДж/0,03см (энергия/диаметр пучка) в коре, стриатуме и гиппокампе активность cNOS подавлялась с одновременным повышением в гипоталамусе, в то же время активность iNOS возрастала в коре, стриатуме и гипоталамусе, с небольшим снижением в гиппокампе. Повышение энергии (900мДж/0,03см) или снижение интенсивности (135мДж/1,3см) облучения подавляло iNOS во всех изучаемых структурах и снижало активность cNOS в гиппокампе и гипоталамусе, но уменьшало ее снижение в коре и стриатуме. При 900 мДж/1,3см во всех исследуемых структурах мозга полностью подавлялась активность iNOS и повышалась cNOS. Таким образом, в зависимости от энергии и интенсивности гелий-неонового лазерного излучения, в структурах мозга при подавлении кальцийзависимой активности NOS наблюдалось повышение кальцийнезависимой активности NOS и наоборот, что свидетельствует о наличии взаиморегулируемых механизмов эндогенной генерации NO в этих регионах головного мозга и открывает новые возможности лазерной терапии в целях избирательного воздействия на изоформы NOS. Это приобретает особое значение, поскольку нарушения в функционировании нитрергической системы, когда компенсаторные функции NO перекрываются дезадаптивными, часто связываются со сверхэкспрессией в мозге iNOS и гиперпродукцией NO, участвующих в развитии таких нейродегенеративных заболеваний, как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Гантингтона и пр. [15, 16, 25, 30].

При облучении He-Ne лазером изменялось содержание субстрата реакции NOS аргинина и продуктов, АФА и цитруллина (рис. 2). При этом уровни АФА и цитруллина, коррелировали в коре, стриатуме, гиппокампе и гипоталамусе ( $r = 0,6346; 0,8487; 0,5027; 0,3779$  соответственно,  $p < 0,001$ ), подтверждая вклад метаболического пути аргинин NO в пул этих соединений. В то же время в гиппокампе и особенно в гипоталамусе коэффициент корреляции был ниже. По-видимому, в этих регионах при облучении повышается активность ферментов цикла цитруллин NO: аргининосукцинат синтазы и аргининсукцинатлиазы, которые обеспечивают синтез аргинина из

цитруллин и автономное снабжение субстратом NOS, и представлены практически во всех органах, мозге в том числе [31]. Корреляция между уровнем АФА и аргинином в коре, стриатуме, гиппокампе и гипоталамусе ( $r = 0,7746; 0,9471; 0,3222; 0,7751$  соответственно,  $p < 0,001$ ) указывает на вероятность такого сценария в гипоталамусе, но не в гиппокампе, в котором, по-видимому, под влиянием НИЛИ активируются другие пути метаболизирования аргинина, что еще предстоит выяснить.

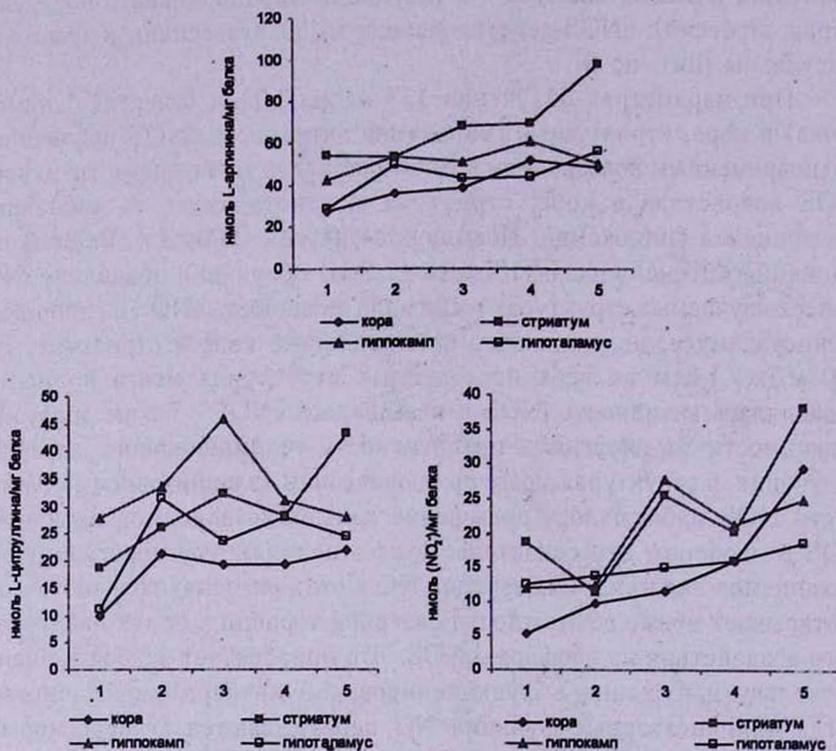


Рис. 2. Дозозависимое влияние гелий-неонового лазерного облучения на содержание метаболитов реакции NOS в разных регионах мозга. 1 – контроль; 2 – 135 мДж/0,03 см; 3 – 900 мДж/0,03 см; 4 – 135 мДж/1,3 см; 5 – 900 мДж/1,3 см

Следует отметить, что при определенных параметрах облучения, несмотря на снижение общей активности NOS в структурах мозга, возрастание энергии излучения и/или снижение его интенсивности сопровождалось повышением уровня АФА в них. Подобное явление скорее всего связано со стимулированием активности супероксиддисмутазы (СОД) применяемыми дозами гелий-неонового лазерного облучения, как это было продемонстрировано на макрофагах крыс [4].

Снижение ферментом содержания супероксид радикала, активно взаимодействующего с NO, будет повышать уровень последнего и его стабильных интермедиатов [12], неадекватно отражая изменения в активности NOS, в отличие от цитруллина.

Таким образом, нами получены данные о региональных различиях во влиянии гелий-неонового лазерного облучения на кальцийрегулируемую и кальцийнезависимую ферментативные системы генерации NO мозга крыс и возможности селективного воздействия на них в зависимости от энергии и интенсивности излучения. Полученные результаты указывают на новые возможности, открывающиеся перед низкоинтенсивной лазерной терапией, а также на необходимость учитывать влияние разных параметров НИЛИ на изоформы NOS на экспериментальных моделях животных.

*Поступила 16.04.08*

### **Ցածր ինտենսիվության լազերային ճառագայթման ռեգիոնալ ազդեցությունը գլխուղեղի նիտրերգիկ համակարգի վրա**

Հ.Ա. Մովսեսյան, Ն.Խ. Ալչուջյան, Ն.Հ. Մովսիսյան,  
Գ.Գ. Մինասյան, Հ.Լ. Հայրապետյան, Գ.Ա. Գևորգյան

He-Ne ( $\lambda=632,8$  նմ) լազերի ճառագայթումը ընտրողական ազդեցություն է ցուցաբերում առնետի գլխուղեղի կալցիում-կախյալ ու կալցիում-նչկախյալ ազոտի օքսիդի սինթազի իզոմերի ակտիվության վրա, որը կախված է գլխուղեղի ռեգիոնից, ճառագայթման էներգիայից և ինտենսիվությունից:

Այսպիսով, գլխուղեղի նիտրերգիկ համակարգի կարգավորումը կարող է իրականացվել ցածր ինտենսիվության լազերային ճառագայթմամբ:

### **Regional effect of low-level laser irradiation on brain nitreergic system**

H. A. Movsesyan, N. Kh. Alchujyan, N. H. Movsisyan, G. G. Minasyan,  
H. L. Hayrapetyan, G. A. Kevorkian

Helium-neon ( $\lambda=632,8$  nm) laser irradiation caused regional changes in the activity of calcium-dependent and calcium-independent NO-generating rat brain enzymatic system, which were selectively regulated depending on the energy and intensities of the radiation. The data obtained suggest new opportunities for low-level laser therapy in the modulation of brain nitreergic system.

## Литература

1. Владимиров Ю.А., Клебанов Г.И., Борисенко Г.Г., Осипов А.Н. Молекулярно-клеточные механизмы влияния низкоинтенсивного лазерного излучения. Биопластика, 2004, т. 49, 2, с. 339-350.
2. Камалян Н.С. Биопластические основы механизма действия низкоинтенсивного лазерного излучения. Вестник МАНЭБ, 2002, т. 7, 6 (54), с. 64-69.
3. Кару Т.И. Клеточные механизмы низкоинтенсивной лазерной терапии. Лазер и здоровье – 99. Материалы меж. конгр., М., 1999, с. 447-448.
4. Клебанов Г.И., Полтанов Е.А., Чичук Т.В., Осипов А.Н., Владимиров Ю.А. Изменение активности супероксиддисмутазы и содержания пероксинитрита в перитонеальных макрофагах подвергнутых облучению He-Ne лазером. Биохимия, 2005, т. 70, 12, с. 1623-1630.
5. Москвитин С.В., Буйлин В.А. Низкоинтенсивная лазерная терапия. М., 2000.
6. Недоспасов А.А. Биогенный NO в конкурентных отношениях. Биохимия, 1998, т. 63, 7, с. 881-904.
7. Пшенникова М.Г. Врожденная эффективность стресс-лимитирующих систем, как фактора резистентности к стресс-индуцированным болезням. Усп. физиол. наук, 2003, т. 34, 3, с. 55-67.
8. Сосунов А.А. Оксид азота как межклеточный посредник. Сорос. образ. журн., 2000, 10, с. 105-110.
9. Akamatsu S., Watanabe T.J. Arginine determination in tissues. J. Biochem., 1961, v. 77, p. 484-486.
10. Alderton W.K., Cooper C.E., Knowles R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem. J., 2001, v. 357, 3, p. 593-615.
11. Bredt D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. Free Radic. Res., 1999, v. 31, 6, p. 577-596.
12. Bruckdorfer R. The basics about nitric oxide. Mol. Aspects Med., 2005, v. 26, p. 3-31.
13. Buskila Y., Abu-Ghanem Y., Levi Y., Moran A., Grauer E., Amitai Y. Enhanced astrocytic nitric oxide production and neuronal modification in the neocortex of a NOS2 mutant mouse. PLoS one, 2007, v. 2, 9, p. 843-855.
14. Dougherty T.J., Comer C.J., Henderson B.W. Photodynamic therapy. J. Nation. Cancer Inst., 1998, v. 90, p. 889-905.
15. Esh T., Stefano G.B., Fricchione G.L., Benson H. Stress-related diseases – a potential role for nitric oxide. Med. Sci. Monit., 2002, v. 8, 6, p. 103-118.
16. Farrer M.J. Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. Nat. Rev. Genet., 2006, v. 7, p. 306-318.
17. Gensert J.M., Ratan R.R. The metabolic coupling of arginine metabolism to nitric oxide generation by astrocytes. Antioxid. Redox. Signal., 2006, v. 8, 5-6, p. 919-928.
18. Leung M.C., Lo S.C., Siu F.K., So K.F. Treatment of experimentally induced transient cerebral ischemia with low energy laser inhibits nitric oxide synthase activity and up-regulates the expression of transforming growth factor-beta 1. Lasers Surg. Med., 2002, v. 31, 4, p. 283-288.
19. Lindgard A., Hulten L.M., Svensson L., Soussi B. Irradiation at 634 nm releases nitric oxide from human monocytes. Lasers Med. Sci., 2007, v. 22, 1, p. 30-36.
20. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, v. 193, p. 265-275.
21. Nicola J.H., Nicola E.M. Wavelength, frequency, and color: absolute or relative concepts? J. Clin. Laser Med. Surg., 2002, v. 20, No 6, p. 307-311.
22. SCRIP, 1998, 2330, p. 21.
23. Shimizu E., Tang Y.P., Rampon C., Tsien J.Z. NMDA receptor-dependent synaptic reinforcement as a crucial process for memory consolidation. Science, 2000, v. 290, 5494, p. 1170-1174.
24. Southan G.J., Szabo C. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. Biochem. Pharmacol., 1996, v. 51, 4, p. 383-394.

25. *Tabner B.J., Turnbull S., El-Agnaf O., Allsop D.* Production of reactive oxygen species from aggregating proteins implicated in Alzheimer's disease, Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2001, v. 1, p. 507-517.
26. *Thiemerman C.* Nitric oxide and circulatory shock: an update. In: *Nitric oxide.* /Gryglewski R.J., Minuz P., Ed./; IOS Press: Amsterdam, 2001, v. 317, p. 117-125.
27. *Tracey W.R., Linden J., Peach M.J., Johns R.A.* Comparison of spectrophotometric and biological assays for nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor: non-specificity of the diazotization reaction for NO and failure to detect EDRF. *J. Farm. Exp. Ther.*, 1989, v. 252, 3, p. 922-928.
28. *Vina J., Borras C., Gomez-Cabrera M.C., Orr W.C.* Part of the series: from dietary antioxidants to regulators in cellular signaling and gene expression. Role of reactive oxygen species and (phyto)estrogens in the modulation of adaptive response to stress. *Free Radic. Res.*, 2006, v. 40, p. 111-119.
29. *Vodovoz Y., Kwon N.S., Pospichil M., Manning J., Paik J., Nathan C.* Inducible nitric oxide synthase. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Immunol.*, 1994, v. 152, p. 4110-4118.
30. *Wallace M. N., Geddes J. G., Farquhar D. A., Masson M. R.* Nitric oxide synthase in reactive astrocytes adjacent to beta-amyloid plaques. *Exp. Neurol.*, 1997, v. 144, p. 266-272.
31. *Wu G., Morris S.M.* Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.*, 1998, v. 336, p. 1-17.
32. *Zarazua S., Perez-Severiano F., Delgado J.M., Martinez L.M.* Decreased nitric oxide production in the rat brain after chronic arsenic exposure. *Neurochem. Res.*, 2006, v. 31, 8, p. 1069-1078.