

УДК 57.013:612.1

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ЛАЗЕРНОЙ КОРРЕКЦИИ СРЕССОВЫХ СОСТОЯНИЙ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Дерюгина А.В. 1 – д.б.н., доцент, заведующий кафедрой физиологии и анатомии, Иващенко М.Н. 2 – к.б.н., доцент кафедры физиологии и биохимии животных, Ярыгина Д.А. 1 – бакалавр кафедры физиологии и анатомии, Таламанова М.Н. 1 – к.б.н., доцент кафедры физиологии и анатомии, Гущин В.А. 2 – аспирант кафедры физиологии и биохимии животных, Юропова В.В. 2 – аспирант кафедры физиологии и биохимии животных, Самоделкин А.Г. 2 – д.б.н., профессор, заведующий кафедрой физиологии и биохимии животных

1- Институт биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», 2- ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия» Министерства сельского хозяйства РФ.

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение, эритроциты, крупный рогатый скот, технологический стресс, адреналин, кортизол, пропранолол. **Key words:** low-intensity laser radiation, erythrocytes, cattle, technological stress, adrenaline, cortisol, propranolol.



РЕФЕРАТ

Низкоинтенсивное лазерное излучение оказывает интегрированное влияние на функционирование всех систем организма, нормализуя их работу при патологии. Однако до сих пор не разработана общая теория физиотерапии. Очевидно, что поиск акцептора лазерного излучения является наиболее важным в решении проблемы действия низкоинтенсивного лазерного излучения. Известно, что низкоинтенсивное лазерное излучение может оказывать свое воздействие на организм через активацию стресс-реализующих систем. В связи с этим, цель работы – исследование механизмов действия низкоинтенсивного лазерного излучения на эритроциты крови крупного рогатого скота в состоянии физиологической нормы и при технологическом стрессе. В экспериментах *in vitro* исследовалось действие низкоинтенсивного лазерного излучения с длиной волны 830 нм, суммарной мощностью 90 мВт на эритроциты предварительно инкубированные с адреналином, кортизолом и блокатором β -адренорецепторов – пропранололом. Облучали эритроциты непрерывно автономным лазерным душем «МарсИК» в течение 15 минут.

Во всех группах клеток определяли концентрацию АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) неэнзиматическим методом.

Выявлено, что действие низкоинтенсивного лазерного излучения на эритроциты животных, не подвергшихся стрессу, при инкубации их с адреналином снижало концентрацию АТФ, преинкубация клеток с кортизолом, пропранололом вызывало, напротив, увеличение концентрации АТФ относительно контрольных клеток.

Действие низкоинтенсивного лазерного излучения на эритроциты животных, находящихся после воздействия стресса также вызывало разнонаправленное действие на уровень АТФ. Инкубация эритроцитов с адреналином и пропранололом привела к увеличению концентрации АТФ при действии низкоинтенсивного лазерного излучения, инкубация эритроцитов с кортизолом незначительно снижала концентрацию АТФ.

При действии низкоинтенсивного лазерного излучения на эритроциты животных, не подвергшиеся стрессу, наблюдалось снижение содержания 2,3-дифосфоглицерата после преинкубации с исследуемыми модификаторами.

Таким образом, низкоинтенсивное лазерное излучение может выполнять роль модулятора, обеспечивающего гомеостаз клеток в зависимости от функционального состояния организма, что необходимо учитывать при разработке технологии терапевтического действия низкоинтенсивного лазерного излучения.

ВВЕДЕНИЕ

Биомеханизм лазерной терапии весьма сложен и до конца не изучен. Воздействие на живой организм низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ) с лечебной целью относится к методам физической терапии [1]. Низкоинтенсивное лазерное излучение оказывает интегрированное влияние на функционирование всех систем организма, нормализуя их работу при патологии [2, 3, 4]. Действие НИЛИ опосредовано многочисленными процессами, связанными с поглощением фотонов молекулами хромофоров, регулированием активных форм кислорода, активацией редокс-зависимой сигнализации, влиянием на белок-липидную структуру мембранны [5, 6]. Однако до сих пор еще не разработана общая теория физиотерапии. Очевидно, что поиск акцептора лазерного излучения является наиболее важным в решении проблемы действия НИЛИ. Ранее нами было показано, что НИЛИ может оказывать свое воздействие на организм через активацию стресс-реализующих систем [7]. При этом для правильной трактовки возможных механизмов действия НИЛИ необходимо проведение анализа в экспериментах *in vitro* с учетом динамики протекающих физиологических процессов, поскольку в разные фазы стресса состояние клеток изменяется.

В связи с вышеизложенным, цель работы - исследование механизмов действия НИЛИ на эритроциты крови крупного рогатого скота, находящихся в состоянии физиологической нормы и при технологическом стрессе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены *in vitro*. Объектом исследований была 40% стабилизированная эритроцитарная масса крови высокоудойных коров, находящихся

под воздействием технологического стресса. Контролем служили эритроциты нестressedированных животных.

Осуществлялось действие НИЛИ на эритроциты предварительно инкубированные с адреналином (1-10-9г/мл), кортизолом (5-10-7г/мл), блокатором β -адренорецепторов - пропранололом.

Облучали эритроциты автономным лазерным душем «МарсИК» (НПО "Петролазер", Санкт-Петербург), с длиной волны 830 нм, суммарной мощностью 90 мВт. Эритроцитарную массу помещали в чашки Петри диаметром 3 см, на расстоянии 1 см от поверхности клеточных мембран и подвергали облучению НИЛИ, в течение 15 минут непрерывно воздействия.

Во всех группах клеток определяли концентрацию АТФ и 2,3-дифосфоглицерата (2,3-ДФГ) неэнзиматическим методом, определяя неорганический фосфор в гидролизатах эритроцитов. Определение неорганического фосфора проводили фотоэлектрокалориметрически [8].

Полученные результаты обрабатывали с помощью пакетов прикладных программ BIOSTAT и Microsoft Excel. Достоверность различий средних определяли по *t*-критерию Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование действия НИЛИ на эритроциты с модифицированной структурой показало, что концентрация АТФ в эритроцитах коров, не подвергшихся стрессу, при предварительной инкубации с адреналином снижалась на 85%, тогда как инкубация эритроцитов с кортизолом и пропранололом вызывала, напротив, увеличение концентрации на 44% и 64% соответственно, относительно значений интактных клеток (табл. 1). Содержание 2,3-ДФГ в эритроцитах животных, не

подвергшихся технологическому стрессу, снижалось во всех сериях, но наиболее значимо при инкубации клеток с кортизолом (на 66%).

Действие НИЛИ на эритроциты коров, подвергшихся стрессу также вызывало разнонаправленное действие на уровень АТФ. Инкубация эритроцитов с адреналином и пропранололом привела к увеличению концентрации АТФ на 167% и 300% соответственно, при инкубации эритроцитов с кортизолом отмечено незначительное снижение концентрации АТФ (табл. 2).

Преинкубация эритроцитов с адреналином и кортизолом определила рост концентрации 2,3-ДФГ при действии НИЛИ на 20% и 10% соответственно.

Анализ полученных результатов свидетельствует, что действие НИЛИ определяется различным функциональным состоянием организма. Известно, что при стрессе происходит последовательная активация стресс-реализующих систем: симпто-адреналовой и гипофизарно-надпочечниковой с увеличением концентрации адреналина и кортизола в периферической крови и последовательным их действием на клетки [7].

Первично на эритроциты оказывают воздействие катехоламины, через β -адренорецепторы вызывая активацию аденилатциклазы, увеличение цАМФ, активацию протеинкиназы А и увеличение кальциевого тока, что приводит к интенсификации метаболических процессов и росту АТФ [9].

В условиях повышенных концентраций АТФ действие НИЛИ вызывает снижение метаболизма, что, вероятно, связано с адаптационным механизмом ограничения реакций гликолиза, поскольку на фоне метаболического ацидоза может происходить нарушение структуры и функций биологических мембран. Подтверждением данного положения являются данные, полученные при действии НИЛИ на эритроциты преинкубированные с адреналином. Отметим, что в ряде исследований выявлено, что НИЛИ вызывает снижение выработки АТФ, что рассмат-

ривается как механизм противоболевого действия НИЛИ [10].

В процессе развития стресс-реакции катехоламины, активируя выброс АКТГ, стимулируют нарастание в крови уровня гормонов коры надпочечников. Содержание в крови кортизола при стрессе возрастает через 30 мин и достигает максимума через 2 часа [11]. Кортизол обладает антиоксидантным действием, выступает в качестве энергосберегающего фактора [12]. Вероятно, на фоне снижения концентрации АТФ в клетках НИЛИ вызывает некоторое повышение данного метаболита, что проявляется при действии НИЛИ на эритроциты, предварительно инкубированные с кортизолом.

Следует отметить, что если происходит развитие хронической стрессовой реакции, сопровождающейся повторяющимся воздействием адреналина на клетки, то развивается энергодефицит и в этой ситуации действие НИЛИ, вероятно также, вызывает повышением активности гликолиза, что выражается ростом содержания АТФ и 2,3-ДФГ в эритроцитах животных, подвергшихся стрессу и преинкубированных адреналином. В частности, отмечено, что НИЛИ в зависимости от внутриклеточной среды может модулировать активность фосфофруктокиназы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы – ключевых ферментов гликолиза [13].

Интересно, что блокада β -адренорецепторов эритроцитов при действии НИЛИ на эритроциты как животных, подвергшихся стрессу и на эритроциты животных, находящихся в состоянии физиологической нормы, определила повышение содержания АТФ в клетках. В передаче сигналов для выделения АТФ клетками используются гетеротримерные белки Gi, стимуляция которых приводит к активации аденилатциклазы и освобождению АТФ из эритроцитов [14]. При блокаде β -адренорецепторов, вероятно, может произойти нарушение работы G-белков и дополнительный синтез АТФ при действии НИЛИ, возможно, корректирует выделение АТФ.

Таблица 1

Концентрация 2,3-ДФГ (мкмоль/л) и АТФ (мкмоль/л) в эритроцитах коров с модифицированной структурой, не подвергшихся технологическому стрессу при действии НИЛИ

Модификаторы	Содержание 2,3-ДФГ	Содержание АТФ
ИНТАКТНЫЕ	69,60±2,57	3,11±0,54
Кортизол	24,56±1,16*	4,49±0,31*
Адреналин	50,59±3,06*	0,42±0,16*
Пропранолол	30,23±2,24*	5,15±0,66*

Примечание: * - статистически значимые различия ($p<0.05$) по отношению к интактной группе.

Таблица 2

Концентрация 2,3-ДФГ (мкмоль/л) и АТФ (мкмоль/л) в эритроцитах коров с модифицированной структурой, подвергшихся технологическому стрессу при действии НИЛИ

Модификаторы	Содержание 2,3-ДФГ	Содержание АТФ
ИНТАКТНЫЕ	47,91±4,53	3,31±0,45
Кортизол	56,04±5,58*	2,16±0,34*
Адреналин	52,30±3,16*	8,35±1,09*
Пропранолол	43,33±3,32	12,97±1,02*

Примечание: * - статистически значимые различия ($p<0.05$) по отношению к интактной группе.

Таким образом, НИЛИ, по всей видимости, может выполнять роль модулятора, обеспечивающего гомеостаз клеток в зависимости от функционального состояния организма, что необходимо учитывать при разработке технологии терапевтического действия НИЛИ.

Physiological mechanisms of laser correction of stress states in cattle. A.V. Deryugina¹, M.N. Ivashchenko², D.A. Yarygina¹, M.N. Talamanova¹, V.V. Uriupova², V.A. Gushchin², A.G. Samodelkin², 1-Institute of Biology and Biomedicine, National Research Nizhny Novgorod State University named after N.I. Lobachevsky, 2- FSBEI of HE "Nizhny Novgorod State Agricultural Academy" of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation.

ABSTRACT

Low-intensity laser radiation has an integrated effect on the functioning of all body systems, normalizing their work in pathology. However, a General theory of physiotherapy has not yet been developed. It is obvious that the search for the acceptor of laser radiation is the most important in solving the problem of the action of low-intensity laser radiation. It is known that low-intensity laser radiation can have its effect on the body through the activation of stress-implementing systems. In this regard, the aim of the work is to study the mechanisms of action of low-intensity laser radiation on red blood cells of cattle in the state of physiological norm and under technological stress. In vitro experiments investigated the

effect of low-intensity laser radiation with a wavelength of 830 nm, a total power of 90 mW on erythrocytes pre-incubated with adrenaline, cortisol and β -adrenoceptor blocker-propranolol. Irradiated red blood cells continuously Autonomous laser shower "marsik" for 15 minutes.

The concentration of ATP and 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) was determined in all groups of cells by non-enzymatic method. It was revealed that the effect of low-intensity laser radiation on the erythrocytes of animals not subjected to stress during incubation with adrenaline reduced the concentration of ATP, preincubation of cells with cortisol, propranolol caused, on the contrary, an increase in the concentration of ATP relative to the control cells. The effect of low-intensity laser radiation on the erythrocytes of animals after exposure to stress also caused a multidirectional effect on the level of ATP. Incubation of erythrocytes with adrenaline and propranolol led to an increase in the concentration of ATP under the action of low-intensity laser radiation, incubation of erythrocytes with cortisol slightly reduced the concentration of ATP. Under the action of low-intensity laser radiation on erythrocytes of animals not subjected to stress, there was a decrease in the content of 2,3-diphosphoglycerate after preincubation with the studied modifiers.

Thus, low-intensity laser radiation can act as a modulator that provides homeostasis of cells depending on the functional state of the organism, which must be taken into account when developing a technology of therapeutic action of low-intensity laser radiation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Илларионов В.Е. Основы лазерной терапии. М, 1992. 128с.
2. Бабаев, А.В. Влияние внутривенного низкоинтенсивного лазерного облучения крови на клинические и лабораторные показатели гепатоцеллюлярной недостаточности / А.В. Бабаев, Д.Е. Гоголев, О.В. Рейнер, И.М. Корочкин, А.В. Фандеев, В.Ю. Пивоваров, Ю.Н. Федулаев, К.М. Драчан // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. - Том 153. - № 5. - С. 717-720.
3. Бычковских, В.А. Сравнительная морфология очагов лазерного воздействия в паренхиматозных органах / В.А. Бычковских, И.Я. Бондаревский, Л.В. Астахова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. - Том 153. - № 5. - С.739-741.
4. Deryugina, A.V. The use of low intensity laser therapy for the reduction of technology stress of cows /A.V. Deryugina, A.G. Samodelkin, M.N. Ivashchenko, P.S. Ignat'yev, M.V. Zolotova // AER-Advances in Engineering Research. - V. 151. <https://www.atlantis-press.com/proceedings/agrosmart-18/55908798>.
5. Залесский, В.Н. 50 ЛЕТ Лазерной медицине (обзор литературы и собственных исследований) / В.Н. Залесский, Г.Э. Тимен // "Журнал НАМН України". – 2016. Т. 22. - № 1. — С. 9-20.
6. Дерюгина, А.В. Возможности интерференционной микроскопии в изучении прижизненного состояния эритроцитов при воздействии на них низкоинтенсивным лазером для коррекции стресса // А.В. Дерюгина, М.Н. Иващенко, П.С. Игнатьев, М.Н. Таламанова, А.Г. Самоделкин Современные технологии в медицине. - 2018. - Т. 10. - №4. - С. 78-83.
7. Deryugina, A.V. Stress-Related Effects of Low-Intensity Laser Irradiation / A. V. Deryugina, M.N. Ivashchenko, P.S. Ignat'yev, T.I. Soloveva, E.V. Arkhipova, M. S. Lodyanoy// International Journal of Biomedicine. 2019. - № 9(2). – Р. 163-167.
8. Бояринов, Г.А. Фармакологическая коррекция микроциркуляции у крыс, перенесших черепно-мозговую травму / Г.А. Бояринов, А.В. Дерюгина, Е.И. Яковleva, Р.Р. Зайцев, А.В. Шумилова, М.Л. Бугрова, Л.В. Бояринова, Е.С. Филиппенко, О.Д. Соловьева// Цитология. - 2016. - Том 58. - №8. - С. 610-617.
9. Богословская, С.Л. АТФ-азная активность и уровень ионов в сердечной ткани при экспериментальном адреналовом повреждении и проведении клеточной трансплантации / С.Л. Богословская, С.Н. Клинова, С.С. Голубев // Сибир. мед. Журнал. - 2011. - №6. - С.102-105.
10. Chow R.T. 830 nm laser irradiation in

duces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: implications for the analgesic effects of 830 nm laser. *J Peripher Nerv Syst.* 2007. - № 12(1). P. 28–39.

11. Элиава, М.И. Активность гипоталамо-гипофизарно-адренокортиkalной системы и цикл бодрствование - сон при остром системном воспалении у крыс / М.И. Элиава, В.В. Гриневич, Г.А. Оганесян // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2003. - Т.136. - №8. - С.128-131.

12. Флеров, М.А. Свободнорадикальное окисление липидов в гипоталамусе крыс при стрессе после введения кортизола / М.А. Флеров, А.В. Вьюшина // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* - 2011. - Т.97. - №9. - С.898-902.

Gang-Yue Luo The effects of low-intensity He-Ne laser irradiation on erythrocyte metabolism. *Lasers in Medical Science.* – 2015. - V.30. - №9.- P. 2313–2318.

14. Sprague, R. Expression of the heterotrimeric G protein Gi and ATP release are impaired in erythrocytes of humans with diabetes mellitus // *Adv Exp Med Biol.* – 2006. – Vol. 588. – P. 207–216.

«Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-016-00195».

ИНФОРМАЦИЯ

По заявкам ветспециалистов, граждан, юридических лиц проводим консультации, семинары по организационно-правовым вопросам, касающихся содержательного и текстуального анализа нормативных правовых актов по ветеринарии, практики их использования в отношении планирования, организации, проведения, ветеринарных мероприятий при заразных и незаразных болезнях животных и птиц.

Консультации и семинары могут быть проведены на базе Санкт-Петербургской академии ветеринарной медицины или с выездом специалистов в любой субъект России.

Тел/факс (812) 365-69-35,
Моб. тел.: 8(911) 176-81-53, 8(911) 913-85-49,
e-mail: 3656935@gmail.com