

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА МИОКАРД ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ИШЕМИИ

УДК 615.849.11:616.127.001.57

Поступила 30.05.2014 г.

© С.Л. Малиновская, д.б.н., профессор кафедры медицинской физики и информатики;
А.П. Баврина, к.б.н., доцент кафедры медицинской физики и информатики;
Т.И. Соловьева, к.б.н., старший научный сотрудник ЦНИЛ;
М.В. Рахчеева, научный сотрудник отдела электронной микроскопии ЦНИЛ;
Е.И. Яковлева, к.б.н., старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии ЦНИЛ;
В.А. Мониц, д.б.н., профессор, зав. кафедрой медицинской физики и информатики

Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1

Цель исследования — изучение особенностей модификации уровня перекисного окисления липидов и микроструктуры миокарда сердца крыс низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ) на основе сравнения с эффектами, обусловленными широкополосным красным светом (ШКС).

Материалы и методы. Исследования проводили на самцах беспородных белых крыс массой 250–280 г. Экспериментальные животные (91 крыса) были разделены на две опытные и две контрольные группы: 1-я контрольная группа (n=23) — ложное облучение без ишемии, 2-я контрольная группа (n=22) — ишемия + ложное облучение, 1-я опытная группа (n=21) — воздействие НИЛИ и 2-я опытная группа (n=25) — облучение ШКС. Моделирование ишемии сердца осуществляли путем окклюзии левой коронарной артерии крыс *in situ* в течение 5 мин. Световое облучение в опытных группах начинали сразу после снятия лигатуры и продолжали 10 мин. Источниками света являлись гелиево-неоновый лазер ЛГ-13 (Россия) и люминесцентный оптоволоконный аппарат собственной разработки.

Результаты и обсуждение. Облучение миокарда как лазерным, так и широкополосным светом снижало уровень продуктов перекисного окисления в тканях миокарда. Исключение составили триеновые конъюгаты в группе, обработанной лазерным светом. Более эффективное снижение уровня первичных продуктов ПОЛ выявлено в группе, облученной ШКС.

Электронно-микроскопическое исследование миокарда животных показало, что при облучении НИЛИ в большинстве случаев кардиомиоциты были в сокращенном состоянии с участками пересокращения, выявлены дилатация саркомеров, гипертрофированные формы митохондрий, их набухание, саркоплазматический ретикулум был расширен, содержание цитогранул незначительно. В то же время при воздействии ШКС в кардиомиоцитах саркоплазма не имела признаков просветления, митохондрии были слабо набухшие с сохраненными кристами, был хорошо выражен комплекс Гольджи. В саркоплазме выявлено цитогранул больше, чем в контрольной группе с ишемией и ложным облучением, и гораздо больше, чем в группе, экспонированной НИЛИ. Ядра с диспергированным хроматином содержали 1–2 ядрышка.

Заключение. Изучение субклеточной структуры кардиомиоцитов после оксидативного стресса, вызванного наложением ишемии и последующим возобновлением перфузии, выявило адаптивные изменения лишь в образцах, экспонированных ШКС (активация ядер — зухроматин, наличие ядрышек, сохранность структуры митохондрий и значительное содержание цитогранул).

Разница изменений в микроструктуре клеток мышцы сердца двух опытных групп наглядно свидетельствует об отличии процессов фотобиомодификации, вызываемых лазерным излучением по сравнению с широкополосным светом (одинаковой интенсивности в зоне светового пятна, со спектральным максимумом, близким к линии лазерного излучения).

Полученные данные позволяют говорить о возможности применения в клинической практике технологии облучения сердца низкоинтенсивным ШКС для восстановления сократительной активности миокарда после ишемии и последующей реперфузии: его использование способно сгладить последствия оксидативного стресса в тканях мышцы сердца и улучшить характеристики гемодинамики коронарной системы.

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение; широкополосный красный свет; миокард.

English

Biologic Effect of Low-Intensity Electromagnetic Radiation on Myocardium in Experimental Ischemia

S.L. Malinovskaya, DSc, Professor, Department of Medical Physics and Informatics;
A.P. Bavrina, PhD, Associate Professor, Department of Medical Physics and Informatics;

Для контактов: Мониц Виктор Анатольевич, e-mail: vam@gma.nnov.ru

T.I. Solovyova, PhD, Senior Researcher, Central Scientific Research Laboratory;
M.V. Rakhcheyeva, Researcher, Electron Microscopy Unit, Central Scientific Research Laboratory;
E.I. Yakovleva, PhD, Senior Researcher, Electron Microscopy Unit,
 Central Scientific Research Laboratory;
V.A. Monich, DSc, Professor, Head of the Department of Medical Physics and Informatics

Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005,
 Russian Federation

The aim of the investigation was to study modification of lipid peroxidation level and myocardium microstructure in rats exposed to low-intensity laser radiation (LILR) as compared to the effects caused by broadband red light (BBRL).

Materials and Methods. The research was performed on 91 white outbred male rats weighing 250 to 280 g. The experimental animals were divided in two test groups and two control ones: control group 1 (n=23) spurious irradiation without ischemia; control group 2 (n=22) ischemia + spurious irradiation; test group 1 (n=21), ischemia + exposure to LILR; and test group 2 (n=25), ischemia + exposure to BBRL. Cardiac ischemia was modelled by blocking the rats' left coronary artery *in situ* for 5 min. In the test groups light irradiation was performed during 10 min immediately after the ligature removal. Helium neon laser LG-13 and self-developed luminescent fiber optic apparatus were used as light sources.

Results and Discussion. Exposure of myocardium both to laser radiation and broadband light decreased the peroxidation level in the myocardium tissues. The exceptions were observed in content of trienoic conjugates in the group exposed to laser light. A more effective decrease in the level of primary peroxidation products was found in the group irradiated by BBRL.

Electron microscopic study of the myocardium tissues microstructure demonstrated a reduced condition of cardiomyocytes exposed to LILR; presence of sarcomeres dilatation, hypertrophic mitochondria and their swelling; dialation of sarcoplasmic reticulum; insignificant quantity of granule cells. At the same time, in the samples exposed to BBRL we observed no signs of sarcoplasm clearing; mitochondria were slightly swollen with preserved cristae, Golgi complex was well-marked; granule cells content in the sarcoplasm was greater than in the control group with ischemia and spurious irradiation and much greater than in the group exposed to LILR. The dispersed chromatin nuclei contained 1 or 2 nucleoli.

Conclusion. The study of cardiomyocyte subcellular structure after oxidative stress induced by ischemia and consequent reperfusion revealed adaptive changes only in the species exposed to BBRL (nuclei activation: euchromatin, nucleoli availability, mitochondria structure preservation and significant content of granule cells).

The observed difference in the microstructure of the heart muscle cells in two test groups clearly demonstrates the dissimilarity in photobiomodification processes caused by laser radiation as compared to broadband red light (of the similar intensity in the light spot zone and the spectral maximum near the laser radiation line).

The resulting data enable us to speak about the possibility of using low-intensity BBRL irradiation of the heart as an effective method for recovery of the heart muscle after oxidative stress caused by ischemia and reperfusion and restoration of the hemodynamic characteristics of the coronary system.

Key words: low-intensity laser radiation; broadband red light; myocardium.

Сравнение эффектов, вызванных низкоинтенсивным лазерным излучением (НИЛИ) и широкополосным красным светом (ШКС), на основе такой хорошо документированной методики, как анализ микрофотографий, позволяет ответить на один из принципиальных для фотобиологии и лазерной медицины вопросов о значимости свойств когерентности и монохроматичности излучения для формирования отклика живых тканей на нетепловое световое воздействие.

Работа направлена на создание технологии регенерации тканей мышцы сердца после оксидативного стресса, вызванного ишемией и реперфузией миокарда.

Цель исследования — изучение особенностей модификации уровня перекисного окисления липидов и микроструктуры миокарда открытого сердца крыс, вызванных лазерным излучением на основе сравнения с эффектами, обусловленными широкополосным красным светом.

Материалы и методы. Моделирование ишемии сердца осуществляли путем окклюзии левой коронарной артерии крыс *in situ* в течение 5 мин. После трахеотомии и торакотомии животное подключали к аппарату искусственной вентиляции легких. Под левым ушком

сердца накладывали лигатуру на левую ветвь венечной артерии. В результате развивалась острая ишемия миокарда.

Световое облучение НИЛИ или ШКС области синусного узла открытого сердца начинали сразу после снятия лигатуры и продолжали 10 мин. Источниками света являлись гелиево-неоновый лазер ЛГ-13 (Россия) и люминесцентный оптоволоконный аппарат собственной разработки [1]. Длина волны в максимуме спектра люминесцентного излучения составляла 640 нм, ширина спектра излучения — 70 нм. Диаметр светового пятна — 3 мм. Интенсивность излучения в зоне засветки — 5 мВт/см².

Уровень процессов перекисного окисления липидов оценивали по содержанию в тканях миокарда молекулярных продуктов перекисаации: диеновых конъюгатов (ДК), триеновых конъюгатов (ТК) и малонового диальдегида (МДА) [2]. Состояние ферментативной антиоксидантной защиты клеток определяли по активности супероксиддисмутазы (СОД) [3].

Для электронно-микроскопического исследования образцы ткани брали из левого желудочка в области сосочковых мышц. Методика приготовления образцов соответствовала описанной ранее [2]. Просмотр выпол-

няли на электронном микроскопе Morgagni 268D (FEI, США). Морфометрические измерения осуществляли с помощью программы AnalySIS.

Исследования проводили на самцах беспородных белых крыс массой 250–280 г, которые содержались на стандартном рационе вивария. При этом неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Исследование одобрено Этическим комитетом НижГМА.

Экспериментальные животные (91 крыса) были разделены на две опытные и две контрольные группы: 1-я контрольная группа (n=23) — ложное облучение без ишемии, 2-я контрольная группа (n=22) — ишемия + ложное облучение, 1-я опытная группа (n=21) — воздействие НИЛИ и 2-я опытная группа (n=25) — облучение ШКС. Достоверность различий между характеристиками изучаемых групп животных определяли с использованием t-критерия Стьюдента. При множественных сравнениях вводили поправку Бонферрони [4].

Результаты и обсуждение. Облучение как лазерным, так и широкополосным светом снижало уровень продуктов перекисного окисления в тканях миокарда (табл. 1). Исключение составили ТК в группе, экспонированной лазерным светом.

По отношению к образцам 2-й контрольной группы снижение уровня первичных продуктов ПОЛ в группе, подвергшейся воздействию ШКС, составило 26%, а в группе, экспонированной лазерным излучением, — 16%.

Снижение уровня молекулярных продуктов ПОЛ может быть обусловлено фотохимическими процессами, связанными с изменением активности СОД и других ферментов, имеющих полосы поглощения в диапазонах красного и ближнего инфракрасного света. СОД является одним из важных компонентов ферментативного звена системы антиперекисной защиты клеток и имеет полосу поглощения в диапазоне красного света

[5]. Полученные в данной работе результаты показали, что ШКС повышает активность СОД в тканях миокарда, тогда как лазерное излучение вызывает противоположный эффект (см. табл. 1).

Согласно данным электронно-микроскопического исследования миокарда животных, в образцах 2-й контрольной группы кардиомиоциты (КМЦ) находились в состоянии сокращения, отдельные участки — пересокращения, а также дилатации в субсарколеммальной области. В КМЦ наблюдалось умеренное расширение саркоплазматического ретикулума (СПР) (табл. 2), наличие в просветах хлопьевидного осmioфильного материала (см. рисунок, б). Ядра большей частью были без ядрышек, имели небольшие инвагинации и маргинацию хроматина. В ряде КМЦ ядра локализовались в субсарколеммальной зоне. Сарколемма была набухшей, с очагами деструкции. Отмечалась гиперплазия митохондрий, их набухание, просветление матрикса, деструкция и дезориентация крист. Участи митохондрий выявлена альтерация наружной мембраны. В саркоплазме обнаружены липидные включения, вторичные лизосомы, немногочисленные цитогранулы.

В образцах, облученных НИЛИ, в большинстве случаев КМЦ были в сокращенном состоянии, с участками пересокращения. В некоторых наблюдениях выявлена дилатация саркомеров. Выраженная гетерогенность митохондрий проявлялась в наличии как обычных, так и гипертрофированных их форм (см. рисунок, в). Отмечалось набухание митохондрий, просветление матрикса, фрагментация крист. Ядра — с незначительным просветлением нуклеоплазмы и маргинацией хроматина. В некоторых КМЦ ядра находились на периферии клетки, СПР расширен.

В саркоплазме наблюдались участки просветления, в отдельных случаях обнаружены диффузный внутриклеточный отек, липидные включения, первичные и вторичные лизосомы. Содержание цитогранул было незначительным.

В образцах 2-й опытной группы (облучение ШКС) саркоплазма КМЦ не имела признаков просветления, митохондрии были слабо набухшие с сохраненными

Таблица 1

Активность СОД, содержание диеновых и триеновых конъюгатов, малонового диальдегида в миокарде крыс в контрольных и опытных группах после моделирования ишемии и 10 мин реперфузии

Условия опыта	Активность СОД, ед. акт./г тк.·мин	ДК, опт. пл./мг общ. липид.	ТК, опт. пл./мг общ. липид.	МДА, опт. пл./мг общ. липид.
1-я контрольная группа (ложное облучение без ишемии)	21,86±0,71	0,49±0,05	0,19±0,03	2,40±0,12
2-я контрольная группа (ишемия + ложное облучение)	16,75±0,93	0,58±0,08	0,18±0,03	3,09±0,13
1-я опытная группа (облучение миокарда НИЛИ)	13,06±0,81*	0,49±0,04	0,21±0,03	2,43±0,09
2-я опытная группа (облучение миокарда ШКС)	18,96±0,62*	0,43±0,02*	0,17±0,02	2,67±0,20*

* — статистическая значимость разницы значений со 2-й контрольной группой; p≤0,05.

Таблица 2

Морфометрические показатели миокарда белых крыс в постшемическом периоде

Условия опыта	Длина саркомера, мкм	Площадь митохондрий, мкм ²	Площадь СПР, мкм ²
1-я контрольная группа (ложное облучение без ишемии)	1,68±0,08	0,49±0,06	0,02±0,003
2-я контрольная группа (ишемия + ложное облучение)	1,64±0,08	0,59±0,03 ⁺	0,05±0,01 ⁺
1-я опытная группа (облучение миокарда НИЛИ)	1,54±0,05 ⁺	0,82±0,03 ^{**}	0,13±0,04 ^{**}
2-я опытная группа (облучение миокарда ШКС)	1,55±0,05 ⁺	0,63±0,02 ⁺	0,06±0,01 ⁺

* — статистическая значимость разницы значений со 2-й контрольной группой; $p \leq 0,05$; ⁺ — с группой интактных животных; $p = 0,05$.

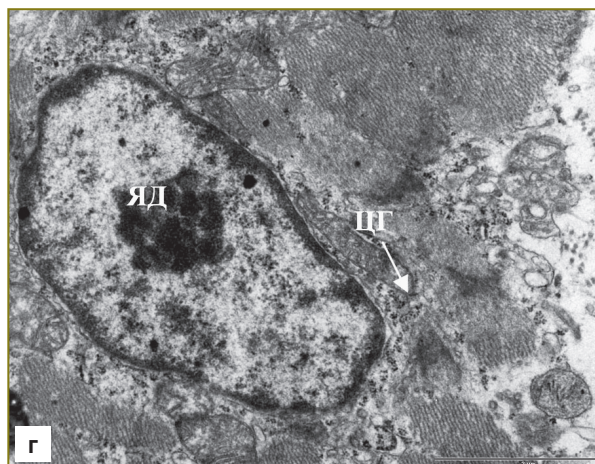
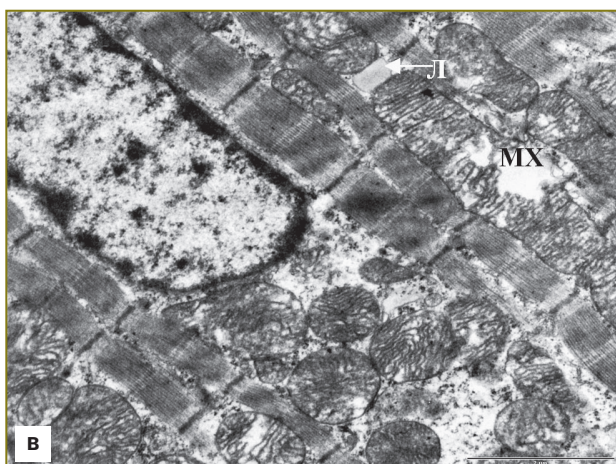
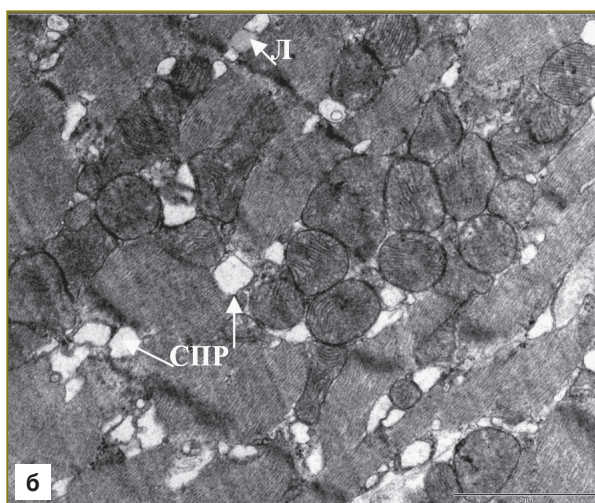
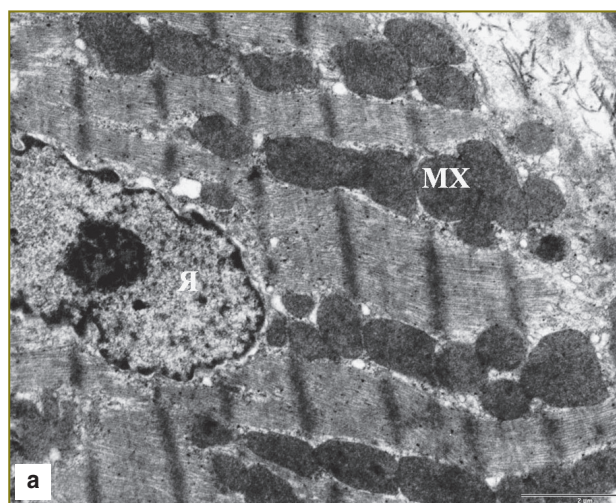
кристами. Комплекс Гольджи хорошо выражен, в отдельных случаях — гипертрофирован. В саркоплазме выявлено больше цитогранул, чем во 2-й контрольной

и в 1-й опытной группах (см. рисунок, г). Ядра с диспергированным хроматином содержали 1–2 ядрышка.

Изучение субклеточной структуры КМЦ после оксидативного стресса, вызванного наложением ишемии и последующим возобновлением перфузии, выявило адаптивные изменения лишь в образцах, экспонированных ШКС (активация ядер — эухроматин, наличие ядрышек, сохранность структуры митохондрий и значительное содержание цитогранул).

Отличия в микроструктуре клеток сердечной мышцы в двух опытных группах наглядно свидетельствуют об особенностях процессов фотобимодификации, вызываемых лазерным излучением и широкополосным светом (одинаковой интенсивности

и в 1-й опытной группах (см. рисунок, г). Ядра с диспергированным хроматином содержали 1–2 ядрышка.



Ультраструктура кардиомиоцитов белых крыс: а — после ложного облучения без ишемии, $\times 8900$; б — после ложного облучения с ишемией, $\times 11\ 000$; в — после воздействия НИЛИ, $\times 11\ 000$; г — после воздействия ШКС, $\times 14\ 000$. Здесь: Я — ядро, МХ — митохондрия, Л — липидная капля, СПР — саркоплазматический ретикулум, ЯД — ядрышко, ЦГ — цитогранулы

в зоне светового пятна, со спектральным максимумом, близким к линии лазерного излучения). Эти особенности можно связать с несколькими факторами. Во-первых, полученные в нашей работе результаты свидетельствуют о разнонаправленных эффектах фотохимического действия НИЛИ и ШКС на активность СОД. Можно предположить также наличие разницы в световом воздействии НИЛИ и ШКС на другой сложный белок, обладающий несколькими хромоформными центрами — цитохром С-оксидазу. Роль данного фермента как первичного молекулярного акцептора света давно дискутируется в литературе [6]. Если последующие эксперименты подтвердят это предположение, то особенности биологических эффектов, вызываемых НИЛИ, найдут вполне значимый комментарий. Второй возможный фактор, обуславливающий эти особенности, — когерентность НИЛИ [7, 8]. Лазерный свет интерферирует на биологических неоднородностях, вызывает в зонах максимумов переоблучение живых тканей с последующими локальными изменениями микроструктуры КМЦ, отмеченными выше.

Еще одним фактором, объясняющим особенности фотобиомодификации, вызываемой НИЛИ по сравнению с ШКС, может служить фотохимическое действие инфракрасного света на комплекс цитохром С-оксидаза–оксид азота [9]. Высвобождение окиси азота оказывает сосудорасширяющее действие, которое способно инициировать цепочку процессов восстановления микроциркуляции, снижение уровня перекисного окисления липидов в тканях миокарда и восстановление микроструктуры КМЦ. В данном случае значимой особенностью НИЛИ является узость спектра ($\lambda=632,8$ нм), тогда как ШКС имеет диапазон, охватывающий красный и ближний инфракрасный свет. Низкоинтенсивный видимый свет является значимым физическим агентом, инициирующим каскады процессов фотобиомодификации.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения в клинической практике технологии облучения сердца низкоинтенсивным широкополосным светом для восстановления сократительной активности миокарда после ишемии и последующей реперфузии (вызванной, например, стентированием).

Использование ШКС способно сгладить последствия окислительного стресса в тканях мышцы сердца, улучшить характеристики гемодинамики коронарной системы и в конечном итоге ускорить выздоровление после острого нарушения кровоснабжения миокарда.

Финансирование исследования и конфликт интересов. Исследование финансировалось Нижегородской государственной медицинской академией. Конфликты интересов, связанные с данным исследованием, отсутствуют.

Литература

1. Мониц В.А., Мониц Е.А., Голиков В.М. Патент РФ 25007201. 1994.
2. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З.,

Бондарь И.А., Труфакин В.А. Окислительный стресс: патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА; 2008; 284 с.

3. Nishicimi M., Appaji Rao A., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 146(2): 849–854, [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x\(72\)80218-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x(72)80218-3).

4. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М: Практика; 1999; 459 с.

5. Vladimirov Yu.A., Osipov A.N., Klebanov G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Moscow)* 2004; 69(1): 81–90, <http://dx.doi.org/10.1023/b:biry.0000016356.93968.7e>.

6. Кару Т.И. Универсальный клеточный механизм лазерной биостимуляции: фотоактивация фермента дыхательной цепи цитохром–с-оксидазы. В кн.: *Современные лазерно-информационные и лазерные технологии*. Под ред. Панченко В.Я., Голубева В.С. М: Интерконтакт наука; 2005; с. 131–143.

7. Баврина А.П., Мониц В.А., Малиновская С.Л., Ермолаев В.С., Дружинин Е.А., Кузнецов С.С. Коррекция последствий облучения ионизирующей радиацией путем воздействия низкоинтенсивным светом. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2013; 156(11): 608–610.

8. Баврина А.П., Мониц В.А., Малиновская С.Л., Яковлева Е.И., Бугрова М.Л., Лазукин В.Ф. Способ коррекции последствий радиационно-индуцированной болезни сердца при помощи низкоинтенсивного электромагнитного излучения в эксперименте. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины* 2015; 159(1): 115–119.

9. Zhang R., Mio Y., Pratt P.F., Lohr N., Wartier D.C., Whelan H.T., et al. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2009 Jan; 46(1): 4–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.09.707>.

References

1. Monich V.A., Monich E.A., Golikov V.M. Patent RF 25007201. 1994.

2. Men'shchikova E.B., Zenkov N.K., Lankin V.Z., Bondar' I.A., Trufakin V.A. *Okislitel'nyy stress: patologicheskie sostoyaniya i zabolevaniya* [Oxidative Stress: Pathoses and Diseases]. Novosibirsk: ARTA; 2008; 284 p.

3. Nishicimi M., Appaji Rao A., Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 146(2): 849–854, [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x\(72\)80218-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x(72)80218-3).

4. Glants S. *Mediko-biologicheskaya statistika* [Biomedical statistics]. Moscow: Praktika; 1999; 459 p.

5. Vladimirov Yu.A., Osipov A.N., Klebanov G.I. Photobiological principles of therapeutic applications of laser radiation. *Biochemistry (Moscow)* 2004; 69(1): 81–90, <http://dx.doi.org/10.1023/b:biry.0000016356.93968.7e>.

6. Karu T.Y. Universal'nyy kletochnyy mekhanizm lazernoy biostimulyatsii: fotoaktivatsiya fermenta dykhatel'noy tsepi tsitokhrom–s-oksiday. V kn.: *Sovremennyye lazerno-informatsionnyye i lazernyye tekhnologii* [Universal cellular mechanism of laser biostimulation: photoactivation of respiratory chain enzyme cytochrome-c-oxidase]. In: *Modern*

laser and information technologies]. Pod red. Panchenko V.Ya., Golubeva V.S. [Panchenko V.Ya., Golubev V.S. (editors)]. Moscow: Interkontakt nauka; 2005; p. 131–143.

7. Bavrina A.P., Monich V.A., Malinovskaya S.L., Ermolaev V.S., Druzhinin E.A., Kuznetsov S.S. Correction of ionizing irradiation consequences with low-intensity light. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* 2013; 156(11): 608–610.

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

Yakovleva E.I., Bugrova M.L., Lazukin V.F. Correction method for radiation-induced heart disease consequences by low-intensity electromagnetic radiation in experiment. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* 2015; 159(1): 115–119.

9. Zhang R., Mio Y., Pratt P.F., Lohr N., Warltier D.C., Whelan H.T., et al. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol* 2009 Jan; 46(1): 4–14, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.09.707>.