

На правах рукописи

ЛАЗУКИН Валерий Фёдорович

**СВЕТОВАЯ МОДУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ
СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ СИСТЕМЫ КРЫС
ПРИ ЕЁ АЛЬТЕРАЦИИ**

03.00.13 - физиология

03.00.04 – биохимия

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Нижний Новгород

2006

Работа выполнена в Нижегородском государственном университете им. Н.И. Лобачевского и в Нижегородской государственной медицинской академии

Научные руководители:

Доктор биологических наук, профессор **Крылов Василий Николаевич**

Доктор биологических наук, профессор **Монич Виктор Анатольевич**

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук, профессор **Моничев Александр Яковлевич**

Доктор медицинских наук, профессор **Гречко Владимир Николаевич**

Ведущая организация:

Татарский государственный гуманитарно-педагогический университет

Защита состоится «16» ноября 2006 г. в 15 часов

на заседании диссертационного совета Д212.166.15 при Нижегородском Государственном университете им. Н.И. Лобачевского по адресу: 603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ННГУ им. Н.И. Лобачевского

Автореферат разослан «15» октября 2006 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
к.б.н., доц.



Корягин А.С.

Список сокращений

АД – артериальное давление

ДК – диеновые конъюгаты

ИВЛ – искусственная вентиляция легких

НИЛИ – низкоинтенсивное излучение лазера

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ППМ – плотность потока мощности

ПХПСС - приведенный химический потенциал стандартного состояния

СВЧ – сверхвысокие частоты

СОД – супероксиддисмутаза

ТК – триеновые конъюгаты

ЧСС – частота сердечных сокращений

ШКС – широкополосный красный свет

ЭМ – электронная микроскопия

ЭМИ – электромагнитное излучение

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Электромагнитные поля низкой интенсивности как светового, так СВЧ- и других диапазонов способны существенно влиять на функциональное состояние живых клеток, тканей и на организм в целом (Григорьев и др., 1999). Тем не менее, вопросы о механизмах воздействия электромагнитных излучениях низкой интенсивности на органы и системы организма животных являются актуальными до сих пор (Vladimirov, a.o., 2004; Клебанов и др., 2006).

Известно влияние светового облучения на процессы восстановления функционального состояния сердечно-сосудистой системы животных при альтерации, вызванной ишемией. Так в опытах по облучению прекардиальной области грудной клетки крыс была показана эффективность воздействия светом лазера и светодиодов на размер экспериментального инфаркта миокарда и на параметры цельной крови животных (Гацура и др., 2004). В связи с этим, большую актуальность приобретают исследования эффектов прямого светового воздействия на миокард. В опытах на открытом сердце обеспечиваются условия для моделирования ишемии миокарда и подведения света к сердечной мышце с помощью оптоволокну.

Ещё одним шагом в этом направлении является изучение реакции сердечно-сосудистой системы крыс на экстракорпоральное облучение крови низкоинтенсивным светом после клинической смерти, вызванной острой кровопотерей и последующей реинфузии облученной крови. Эффекты воздействия света на клетки крови описаны в литературе (Скобелкин О.К., Брехов Е.И., 1985, Карандашев В.И., 1996, Спасов А.А. с соавт. 1998). Вместе с тем, остаются не изученными механизмы реакции сердечно-сосудистой системы и целостного организма на электромагнитную стимуляцию крови.

Механизмы воздействия низкоинтенсивного света на живые клетки часто связывают с фотохимической модификацией молекул – акцепторов энергии ЭМИ (Владимиров и др., 1994). Экспериментально доказанными фактами являются реактивация красным светом супероксиддисмутазы (СОД), инактивированной в щелочной среде (Горбатенкова и др., 1988). Возможной альтернативой данного представления является диссипация энергии света в воде и последующие эффекты, обусловленные локальными нагревами среды. Подобный подход к объяснению фотобиологических эффектов называют неспецифическим, энергетическим (Гамалея и др., 1986, Воронина и др., 1992). Акцептором электромагнитной энергии может являться связанная вода, входящая в состав гидратных оболочек простых ионов. Однако, вопрос о том, способен ли видимый свет повлиять на структуру ионов в водной среде остаётся открытым. Кроме того, отсутствуют данные об энергетической структуре гидратных оболочек простых ионов. Таким образом, для исследования механизмов световой стимуляции живых тканей необходимо провести оценку энергии связи ионов с диполями воды и сравнить фотобиологические эффекты, вызываемые ЭМИ различных длин волн, в том числе радиоволнового (СВЧ) диапазона. Учитывая сложность интерпретации данных, получаемых на уровне организма, для исследования механизмов биологического действия СВЧ часто используются штаммы кишечных бактерий (Vaishnavi S., a.o., 1998, Fiksdal L., a.o., 1999).

Работа выполнялась в соответствии с планом НИР кафедры физиологии и биохимии человека и животных ННГУ, планом НИР кафедры медицинской физики и информатики НижГМА, в рамках отраслевой темы научных исследований Минсоцздрава России «Разработка физико-химических основ патогенеза и новых средств профилактики и лечения заболеваний человека», № 029/020/00/.

Цель и задачи исследований

Целью работы явилось изучение влияния светового воздействия на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы крыс при альтерации, вызванной ишемией миокарда и кровопотерей, а также проверка гипотезы о неспецифическом, тепловом механизме, воздействия электромагнитного излучения на живые клетки.

В задачи работы входило:

1. Исследование функциональной активности сердца крыс после тотальной ишемии миокарда и облучения открытого сердца светом лазера (НИЛИ) и широкополосным красным светом (ШКС).
2. Изучение микроструктурных изменений в кардиомиоцитах, облученных НИЛИ и ШКС.
3. Изучение активности супероксиддисмутазы и содержания диеновых и триеновых конъюгатов в тканях миокарда после ишемии и воздействия НИЛИ и ШКС.

4. Изучение динамики изменения ЧСС, АД, количества эритроцитов и содержания гемоглобина у крыс после острой кровопотери и клинической смерти, в период реанимации, при облучении реинфузируемой крови ШКС и НИЛИ.

5. Построение математической модели и расчет энергетических характеристик гидратных оболочек простых ионов.

6. Сравнение эффектов, вызываемых облучением широкополосным светом, светом лазера и СВЧ-излучением микробных популяций и анализ механизмов воздействия низкоинтенсивным ЭМИ на живые клетки на основе модели связанной воды в гидратных оболочках ионов.

Научная новизна

Впервые изучены эффекты воздействия широкополосного света на миокард в опытах на открытом сердце крыс. Обнаружены различия в эффектах действия лазерного и широкополосного света на миокард открытого сердца крыс после ишемии. Проведённые исследования позволили обнаружить уменьшение времени восстановления сердечной деятельности, в опытах по моделированию ишемии миокарда крыс, наблюдавшееся в результате облучения открытого сердца широкополосным красным светом и светом лазера. Впервые обнаружены морфологические различия в структурных модификациях миокарда, облученного широкополосным светом и светом лазера. В опытах по реанимации крыс после клинической смерти, обусловленной массивной кровопотерей, впервые получен эффект ускорения восстановления дыхания животных в результате облучения реинфузируемой крови широкополосным красным светом и светом лазера.

Впервые построена математическая модель структуры гидратных оболочек простых ионов, позволяющая теоретически обосновать существование ранее не описанного в литературе механизма воздействия ЭМИ на живые объекты. Полученные в рамках этой модели расчетные данные подтверждены в сравнительных экспериментах по оценке влияния низкоинтенсивного СВЧ-излучения и ЭМИ светового диапазона на выживаемость бактерий *E.coli*. При проверке двух альтернативных гипотез об а) специфическом и б) неспецифическом механизмах действия света на живые объекты, показано, что более правомерной является гипотеза о специфическом механизме такого воздействия.

Научно-практическая значимость

Проведённые исследования вскрывают механизмы эффектов, вызываемых воздействием низкоинтенсивного света на миокард крыс при ишемии. Полученные результаты могут использоваться для разработки новых терапевтических методов лечения последствий ишемии миокарда. Предлагаемый в работе метод обработки крови низкоинтенсивными ЭМИ показывает перспективность использования широкополосного света в качестве физического агента, модифицирующего кровь перед процедурой реинфузии в реаниматологии.

Результаты расчетов, полученные в рамках модели гидратных оболочек простых ионов, расширяют теоретические представления о механизмах действия света на живые клетки и могут использоваться для разработки новых методов оценки влияния ЭМИ различных диапазонов на организм человека.

Основные положения, выносимые на защиту:

Облучение открытого сердца крыс широкополосным красным светом, после ишемии миокарда, способствует выживаемости животных и уменьшению гипоксических нарушений (функциональных, морфологических и биохимических) в миокарде, что уменьшает интервал времени между возобновлением коронарного кровотока и восстановлением сердечной деятельности.

Предварительное облучение реинфузируемой крови, как НИЛИ, так и ШКС, способствует более эффективной реанимации при острой массивной кровопотере у крыс, перенесших 10-минутную клиническую смерть.

На основе построенной математической модели, описывающей энергетическую структуру гидратных оболочек простых ионов, предложен еще один возможный механизм фотобиологических эффектов, обусловленный модификацией активности гидратированных ионов вследствие резонансного поглощения ЭМИ СВЧ и красного света.

Механизм воздействия света на живые ткани имеет не тепловую, а фотохимическую природу, обусловленную поглощением фотонов молекулами, имеющими спектральные линии поглощения в области, соответствующей спектру светового излучения.

Апробация работы

Основные положения диссертации доложены и обсуждены на 5-ой международной конференции «Solubility Phenomena» (Москва, 1992), на "XVIII съезде физиологического общества им. И.П. Павлова" (Казань, 2001), на 1-ой национальной конференции «Информационно Вычислительные Технологии в решении фундаментальных проблем и прикладных задач химии, биологии, фармацевтики» (Обнинск, 2002)., на 3-ей национальной конференции «Информационно Вычислительные Технологии в решении фундаментальных проблем и прикладных задач химии, биологии, фармацевтики» (Обнинск, 2005)., на расширенном заседании кафедры физиологии и биохимии человека и животных ННГУ (2005).

По материалам диссертации опубликовано 7 работ.

Структура и объём диссертации

Материалы диссертации изложены на 121 страницах машинописного текста, иллюстрированы 21 таблицами и 25 рисунками. Работа состоит из введения, обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, глав результатов исследования, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, содержащего 181 источника, из них 49 на иностранных языках.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты были выполнены на 90 беспородных белых крысах обоего пола, массой 250–480 граммов, а также на микроорганизмах в форме штаммов кишечных бактерий. Распределение методов и материалов исследований по этапам приведено в таблице 1.

Таблица 1

Объекты и их распределение по этапам исследований

№ п/п	Этапы исследований	Экспериментальные методы	Количество исследованных объектов
1	Исследование функционального состояния сердечно-сосудистой системы крыс после ишемии и облучения открытого сердца НИЛИ и ШКС.	Анализ ЭКГ (с помощью компьютерной программы «Полиспектр»), определение активности СОД, определение уровня ДК и ТК, ЭМ.	10 контрольных, 20 опытных крыс
2	Исследование функционального состояния сердечно-сосудистой системы крыс и системы крови после клинической смерти и облучения крови НИЛИ и ШКС.	Анализ ЭКГ, внешнего дыхания, АД; определение количества эритроцитов, гемоглобина, осмотической резистентности эритроцитов	30 контрольных, 30 опытных крыс
3	Построение математической модели гидратных оболочек ионов	Математическое моделирование	10 видов гидратированных ионов
4	Проверка модели; исследование действия НИЛИ, ШКС и СВЧ-излучения на микробные популяции	Фотоколориметрия, подсчёт числа колоний образующих единиц	Колонии штаммов бактерий E.coli C600

На первом этапе работы было проведено изучение функционального состояния сердечно-сосудистой системы животных после ишемии миокарда и облучения низкоинтенсивным красным светом, в опытах на открытом сердце. Животных наркотизировали раствором нембутала в дозе 50 мг/кг внутримышечно. Моделирование ишемии осуществлялось путём окклюзии левой коронарной артерии. После трахеотомии животное подключали к аппарату искусственной вентиляции лёгких (ИВЛ). Окклюзия осуществлялась в течение 5 минут. В результате развивалась острая ишемия. Свет от лазера (НИЛИ) и от люминесцентного источника широкополосного красного света (ШКС) подводился к области синусного узла с помощью полимерного световода диаметром 0,3 мм, с апертурным углом 15°. Диаметр светового пятна составлял 3 мм. Интенсивность излучения в зоне засветки составляла 5 мВт/см². В контрольной группе осуществлялось ложное облучение миокарда. В каждой группе регистрировалась смертность в период проведения опыта, о которой судили по отсутствию самостоятельного дыхания и по электрокардиограмме. Регистрация ЭКГ осуществлялась с помощью кардиографа «Полиграф», подключенного в линию с ЭВМ. Запись ЭКГ осуществлялась с момента вскрытия грудной клетки и до появления признаков удовлетворительного восстановления функции сердечной мышцы.

На втором этапе исследований определялось влияние НИЛИ и ШКС на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы крыс и на систему крови после клинической смерти. Клиническую смерть продолжительностью 10 минут вызывали свободным кровопусканием из общей сонной артерии. Для предупреждения свертывания крови, через катетер, в общую сонную артерию, вводили раствор гепарина в дозе 500 ед/кг. По окончании 10 минут клинической смерти (отсчет времени от последнего агонального вдоха) начинали реанимационные мероприятия. Реинфузию крови производили внутриартериально через катетер. Одновременно с этим подключали аппарат ИВЛ. При необходимости проводили закрытый массаж сердца. Экспериментальные животные были разделены на 4 группы по 15 животных. Аутокровь первой опытной группы подвергали воздействию НИЛИ. На аутокровь второй опытной группы воздействовали ШКС. Облучение проводили в течение 10 минут. Животным 3 и 4 групп реинфузия аутокрови производилась без ее облучения.

Регистрацию изучаемых параметров (внешнее дыхание, ЭКГ и АД) проводили до клинической смерти и в постреанимационный период. В опытах фиксировался момент наступления первого самостоятельного вдоха во время реанимации. В каждой группе регистрировалась смертность в период проведения опыта, о наступлении которой судили по отсутствию самостоятельного дыхания. На сороковой минуте реанимации, определялись также общее количество эритроцитов, осмотическая резистентность эритроцитов и количество гемоглобина. Анализ исследуемых параметров проводили до кровопускания, на 1-ой и 40-ой минутах после начала реанимации.

Морфологический анализ структурных изменений клеток, обусловленных световым воздействием, проводился с помощью электронного микроскопа. Образцы ткани правого предсердия, из зоны, облученной светом, фиксировали в 2,5% растворе глутароальдегида в течение 60 мин, постфиксацию проводили в 1% растворе четырехоксида осмия на том же буфере в течение 2 часов. После обезвоживания тканей спиртами возрастающей концентрации, ткани заливали в эпоксидные смолы - смесь аралдита и эпона 812. Ультратонкие срезы готовили на ультратоме Ultracut, контрастировали по Рейнольдсу. Просмотр проводили на электронном микроскопе 100БР.

Уровень процессов перекисного окисления липидов оценивался по содержанию в тканях миокарда молекулярных продуктов перекисаации: диеновых и триеновых конъюгатов (Ланкин В.З., Герасимова В.Н., Касаткин Л.Б., 1979, Fletcher D.L., 1983). Состояние антиоксидантной защиты клеток определялось по активности ферментов СОД (Nishicimi M., 1972).

Источниками лазерного света являлись гелий-неоновый лазер ЛГ-13 и люминесцентный оптоволоконный аппарат, разработанный в Нижегородской государственной медицинской академии (Монич В.А., и др., 1992, 1994). Длина волны в максимуме спектра люминесцентного излучения составляла 640 нм, ширина спектра излучения 70 нм.

В качестве источника лазерного излучения применялся аппарат терапевтического действия «Успех». Аппарат низкоинтенсивного лазерного излучения ближней ИК-области спектра работает в импульсном аperiодическом режиме («белый шум»), частота следования импульсов—428 Гц, интенсивность излучения 5 мВт/см².

На третьем этапе работы, с целью поиска механизма взаимодействия электромагнитного излучения с биологическими клетками, была построена математическая модель и проведены опыты по проверке модели. Методика проверки состояла в сравнительном анализе энергии квантов электромагнитного излучения, способных оказывать влияние на энергетическое состояние связанной воды гидратных оболочек ионов и энергий фотонов, используемых в эксперименте по воздействию видимым светом двух различных диапазонов и СВЧ-излучением на микробные популяции. В экспериментах использовали штаммы бактерий *E.coli* С600. Облучение культуры проводилось при следующих условиях: несущая частота 9,372 ГГц, плотность потока мощности от 3,4 до 27,2 мВт/см², экспозиция 60 минут. Облучение образцов электромагнитными полями проводилось в кюветах (из фторопласта), помещённых в волноводную ячейку сечением 35×15 мм. Производилось воздействие непрерывным (НМ) и амплитудно-импульсно-модулированным полями (АИМ) с длительностью сигнала 5 мкс, частотой модуляции 9 кГц и с пилообразной формой модуляции.

Действие тепла в диапазоне от 37° до 40°С определялось в кювете, помещённой в термостат. Эффект воздействия видимым светом определялся в тех же условиях, при температуре 37°С.

В экспериментах регистрировали следующие величины:

- общее количество бактерий в суспензии, по калибровочной кривой, на основе измерения оптической плотности культуры на ФЭК – 56 М (светофильтр $\lambda_{\max} = 540$ нм);
- количество жизнеспособных бактерий, способных формировать колонии на стандартной среде Эндо.

Выживаемость популяций клеток к действующему фактору определялась по формуле N/N_c , где N – количество жизнеспособных клеток, или инфекционных единиц в культуре после повышения температуры среды, в течение 10 минут, при воздействии СВЧ-излучением, или при облучении образца светом в течение 10 минут, N_c – количество жизнеспособных клеток, или инфекционных единиц в культуре при начальной температуре в опытах по СВЧ-воздействию (при ложном облучении в опытах с воздействием видимым светом). Оценка влияния ШКС и НИЛИ на рост популяций клеток *E.coli* С600 проводилась также путем подсчета колоний образующих единиц.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием программы «Stadia». Достоверность различий между значениями показателей сравниваемых групп определяли с использованием t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние низкоинтенсивного красного света на восстановление функциональной активности сердца крыс после ишемии миокарда

На первом этапе исследований была изучена ритмическая активность сердца и выживаемость крыс после 5-и минутной ишемии миокарда в зависимости от вида светового воздействия. Опыты показали высокую летальность животных в контрольной и облучавшейся НИЛИ группах. Было установлено, что к 10-й минуте реперфузии миокарда регистрировалась остановка сердца у всех животных контрольной группы и у менее половины крыс, облученных НИЛИ (таблица 2).

Таблица 2

Влияние НИЛИ и ШКС на выживаемость крыс после тотальной ишемии миокарда

Исход опыта (%)	Летальный исход	Выживших к 10-мин реперфузии
Условия опыта -		
КОНТРОЛЬ	100%	0%
НИЛИ	63%	37%
ШКС	11%	89%

Следует отметить, что у выживших животных опытной группы наблюдался выраженный брадикардический эффект, снижение амплитуды зубца R и увеличение зубца T, свидетельствующие об ухудшении функциональной активности сердца.

В отличие от описанных групп, в опытах с применением ШКС, к 10-й минуте эксперимента, выжило около 90% животных. У этих крыс ритмическая активность сердца восстанавливалась сразу после начала реперфузии и сохранялась до конца эксперимента (таблица 3). Параметры зубцов и интервалов ЭКГ не отличались от исходных уже к 10-й мин опыта. Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях ишемии миокарда, вызванной окклюзией коронарной артерии, облучение синусного узла сердца крыс ШКС, оказывает больший реанимирующий эффект, чем воздействие НИЛИ.

В целях изучения этого эффекта на клеточном уровне нами были проведены электронно-микроскопические исследования изменения ультраструктуры миокарда, обусловленные воздействием НИЛИ и ШКС. Было установлено, что в образцах, облученных светом лазера, наблюдается сужение просветов сосудов миокарда, тогда как после воздействия широкополосным красным светом просветы капилляров расширены и свободны, что благоприятствует улучшению кровотока и дальнейшей нормализации функционального состояния миокарда.

Таблица 3

Динамика восстановления ЧСС крыс в период реперфузии

Условие опыта	ЧСС уд/мин				
	Перед моделированием ишемии	5 минута ишемии	3 минута реперфузии	5 минута реперфузии	10 минута реперфузии
НИЛИ	263.2±5.4	246.7±15.6	256.0±23.8	275.0±16.5	154.3±47.2*
ШКС	285.8±11.4	269.5±11.7	249.7±21.1	256.3±12.6	262.3±13.7

* - $p < 0.05$ по отношению к исходному уровню

При анализе структуры кардиомиоцитов было установлено, что в образцах, подвергшихся воздействию излучением лазера, обнаружены гиперплазия митохондрий и их полиморфизм, в большинстве случаев размеры митохондрий были небольшими, миофибриллы неравномерно сокращены. В сарколемме встречались единичные вакуоли. Ядра кардиомиоцитов, большей частью, были без ядрышек, либо ядрышки были приближены к кариолемме, однако сохранялось небольшое просветление и набухание кариоплазмы; ядерный хроматин находился в маргинальном гетерогенном состоянии. Просветы сосудов сужены, отмечалась сильная степень набухания эндотелия и увеличение количества пиноцитозных

пузырьков в цитоплазме эндотелия, что свидетельствует об увеличении обмена веществ. Межклеточного отека не наблюдалось.

При облучении миокарда люминесцентным красным светом отмечалось значительное увеличение количества митохондрий и их гетерогенность. Митохондрии, в большинстве случаев, были плотные с гранулированным матриксом и сохраненной структурой крист, миофибриллы равномерно сокращены. Ядра кардиомиоцитов находились в активном состоянии: кариоплазма без признаков просветления, с эухроматином. Большинство ядер были с ядрышками, в некоторых находились по два ядрышка. Просветы капилляров расширены, свободны. Эндотелий обычного вида, местами везикулярный. Межклеточного отека также не наблюдалось.

В целом, общая ответная реакция клеток на воздействие широкополосным красным светом оказывается более мягкой в отношении их микроструктурных изменений по сравнению с таковой при действии лазерного излучения. Это означает, что свет данного типа способен оказывать главным образом энергетическую подпитку для внутренних физико- и биохимических процессов, что благоприятствует нормализации микроструктуры и функциональной активности миокарда.

Установленный в рассмотренной выше серии опытов терапевтический эффект действия НИЛИ и ШКС на миокард, может быть обусловлен фотомодификацией активности антиоксидантных ферментов, имеющих полосы поглощения в диапазоне красного света с последующей нормализацией свободно радикальных процессов в постишемическом миокарде. В работе (Горбатенкова Е.А., и др, 1988) экспериментально установлено, что воздействие излучением He-Ne лазера на инактивированный в кислой среде (рН=6,2) фермент СОД, приводит к восстановлению его активности. Исходя из этого, можно предположить, что подобные реакции способны вызывать и ШКС. Поэтому следующим этапом исследования стало изучение изменения активности СОД и содержания продуктов ПОЛ в постишемическом миокарде.

Было показано, что в период ишемии миокарда в гомогенате происходило накопление продуктов перекисного окисления липидов – диеновых и триеновых конъюгатов. В контрольных образцах наблюдалось дальнейшее увеличение их содержания и в ходе 10 минутной реперфузии. Облучение миокарда широкополосным светом и светом лазера приводило к снижению уровня перекисного окисления липидов по сравнению с контрольными образцами и повышению активности СОД (таблица 4).

Таким образом, проведенные опыты показали способность красного света восстанавливать функциональную активность открытого сердца после ишемии, способствовать увеличению процента выживаемости крыс после операции и моделирования ишемии миокарда. Данные процессы обусловлены, по-видимому, фотохимическими процессами, связанными с фотоактивацией ферментов (СОД и каталазы) и регуляцией процессов перекисного окисления липидов в тканях сердечной мышцы.

Таблица 4

Активность СОД, содержание диеновых и триеновых конъюгатов в миокарде крыс при воздействии в реперфузионном периоде низкоинтенсивным красным светом

Условия опыта	Период исследования	Активность СОД (у. е./мг тк.)	ДК (опт.пл/мг ОЛ г тк.)	ТК (опт.пл/мг ОЛ г тк.)
Контроль	До ишемии	30.0±2,3	0.20±0.05	0.15±0.06
	5 мин ишемии	15.2±3.7*	0.42±0.09*	0.26±0.05*
	10мин реперфузии	9.1±1.6*	0.66±0.11*	0.32±0.04*
ШКС	10мин реперфузии	37.3±3.3*	0.36±0.04*	0.17±0.03
НИЛИ	10мин реперфузии	20.7±2.6*	0.29±0.05	0.17±0.03

* - $p < 0,05$ по отношению к исходному уровню в контроле

Реанимация крыс при облучении крови лазерным и широкополосным светом

При моделировании клинической смерти у животных отмечалась типичная картина геморрагического шока: вслед за падением АД наблюдалось уменьшение частоты сердечного ритма, а также уменьшение амплитуды ЭКГ и реограммы, которые проявлялись сразу после кровопотери. После последнего агонального вдоха, в период клинической смерти, перед реанимационными мероприятиями регистрировалась лишь ЭКГ, характеризующаяся увеличением интервалов следования пиков и снижением амплитуды зубцов ЭКГ до изолинии.

Таблица 5

Динамика изменения ЧСС крыс (уд/мин) в период реанимации

Условие опыта	ЧСС до кровопотери (уд/мин)	ЧСС при реанимации (мин), уд/мин				
		10	20	30	40	
НИЛИ	Конт-роль	349.0±27.0	209.0±15.1*	258.0±14.4*	275.0±16.5*	286.0±16.7*
	Опыт	325.0±17.0	232.0±16.3*	249.0±7.9*	253.0±9.7*	267.0±11.4*
ШКС	Конт-роль	331.1±17.0	198.4±18.2*	192.1±18.4*	209.9±14.4*	211.0±20.3*
	Опыт	380.6±21.0	229.0±13.4*	233.1±14.1*	247.9±15.6*	260.4±18.8*

* – $p < 0.05$ по отношению к исходному уровню

При проведении реанимационных мероприятий было установлено, что полного восстановления функций кровообращения и дыхания не происходило как в контроле, так и опыте. Тем не менее, после 40 минутного периода наблюдения оставались живыми в большинстве опытов только крысы, кровь которых перед реинфузией подвергалась воздействию ЭМИ - в группе «НИЛИ»: опыт – 73%, контроль – 55%, в группе «ШКС»: опыт - 67%, контроль – 47% выживших животных. Вместе с тем прослеживались определенные различия в степени и скорости приближения параметров вегетативных функций к уровню, регистрируемому до клинической смерти. Менее всего изменялась ритмическая функция сердца, динамика восстановления которой была одинаковой во всех исследуемых группах (таблица 5).

В отличие от ритма сердцебиений, более значимые изменения и различия между контролем и опытом были выявлены при регистрации артериального кровяного давления (АД). Как видно из таблицы 6, его восстановление происходило более значимо, по сравнению с контролем, при воздействии на реинфузируемую кровь НИЛИ и ШКС. Из полученных результатов также следует, что воздействие НИЛИ оказалось более эффективным, чем ШКС. Было установлено, что в этой группе АД у животных восстанавливалось практически до исходного уровня уже на 20-й мин реанимации.

Таблица 6

Динамика изменения АД крыс (мм рт. ст.) в период реанимации

Условие опыта		До кровопотери, мм рт.ст	В период реанимации (мин), мм рт.ст.			
			10	20	30	40
НИЛИ	Конт- роль	132.0±8,6	101.0±12.5*	103.0±10.1*	99.0±8.2*	94.0±7.7*
	Опыт	129.0±8.6	114.0±11.8	130.0±6.6	123.0±6.9	123.0±7.0
ШКС	Конт- роль	123.0±3.6	66.0±6.7*	93.5±7.6*	93.0±6.7*	94.5±6.77*
	Опыт	126.5±5.8	101.0±10.9	111.5±5.5	110.0±4.9	112.5±4.8

* – $p < 0.05$ по отношению к исходному уровню

Наблюдаемое восстановление вегетативных параметров системы кровообращения у животных опытных групп связано с тем, что НИЛИ и ШКС, в отличие от контроля, улучшают физико-химические характеристики реинфузируемой крысам крови (эритроцитов и плазмы), что приводит к повышению её биологической активности. Известно, что при воздействии на кровь низкоинтенсивных излучений сохраняется пространственная структура клеточных элементов крови (Кожура и др., 2002), снижается уровень продуктов ПОЛ эритроцитов (Спасов и др., 1998). Снижается вязкость крови, что, в свою очередь, вызывает повышение объема магистрального кровотока и улучшает реологические свойства крови (Карандашев и др., 1996).

Доказательством высказанному положению является большая сохранность эритроцитов после их обработки исследуемыми ЭМИ перед реинфузией. Как следует из таблицы 7, на 40-й мин опыта количество эритроцитов в опытных группах не отличалось от исходного уровня до кровопотери, тогда как в обеих контрольных группах их количество уменьшалось.

Таблица 7

Динамика изменения количества эритроцитов в период реанимации

Условие опыта		Количество до кровопотери, млн/мкл	Количество после кровопотери, млн/мкл	
			1 мин	40 мин
НИЛИ	Конт-роль	6.02±0.16	5.20±0.30*	4.09±0.08*
	Опыт	5.73±0.06	5.40±0.16	5.35±0.16*
ШКС	Конт-роль	8.25±0.21	7.56±0.36	7.85±0.16
	Опыт	8.05±0.15	7.62±0.27	8.26±0.33

* – $p < 0.05$ по отношению к исходному уровню

Подобные закономерности, характеризующие целостность клеток, были показаны и при измерении содержания в эритроцитах гемоглобина (таблица 8). Вместе с тем, следует отметить, что по этому показателю эффективность ШКС оказалась выше, чем действие НИЛИ.

Таблица 8

Динамика изменения содержания гемоглобина в период реанимации

Условие опыта		До кровопотери, г/л	После кровопотери, г/л	
			1 мин	40 мин
НИЛИ	Конт-роль	121.0±7.0	118.2±4.3	89.9±3.3*
	Опыт	121.8±2.3	117.3±5.0	93.3±3.9*
ШКС	Конт-роль	121.2±8.0	115.7±2.3	111.4±5.5
	Опыт	127.5±5.5	122.9±3.0	128.9±4.0

* – $p < 0.05$ по отношению к исходному уровню

С восстановлением функций системы крови и кровообращения при реанимации крыс происходит восстановление и вегетативной функции – дыхания, что определялось меньшим латентным периодом появления первого самостоятельного вдоха у животных опытных групп. В этих группах первый самостоятельный вдох регистрировался через 12 (НИЛИ) и 12,5 (ШКС) минут после начала реанимации, тогда как животные контрольных групп начинали самостоятельно дышать, через 18,5 и 14,3 минуты

соответственно. Рано появившееся самостоятельное дыхание способствует более полному восстановлению остальных физиологических функций и оказывается эффективным фактором для обеспечения устойчивости сосудистого тонуса, о чем свидетельствует более высокий процент выживаемости животных в опытных группах.

Таким образом, предварительное облучение реинфузируемой крови как НИЛИ, так и ШКС, способствует более эффективной реанимации при острой массивной кровопотере у крыс, перенесших 10-минутную клиническую смерть. При этом НИЛИ оказало большее влияние на восстановление АД, а ШКС – на содержание гемоглобина крови животных.

Модель гидратных оболочек простых ионов

Механизмы наблюдаемых в экспериментах на крысах эффектов светового воздействия на миокард и на систему крови могут быть обусловлены резонансным поглощением световой энергии молекулами-акцепторами. Вместе с тем, возможен и альтернативный подход к объяснению этих эффектов. Он основан на гипотезе о том, что первичной мишенью для фотонов являются молекулы воды. Эту гипотезу можно проверить, сравнивая результаты опытов по облучению живых объектов светом и СВЧ-излучением. Хорошо известно, что СВЧ – излучение поглощается водной средой, возбуждая вращательные уровни энергии дипольных молекул воды. Поэтому опыты с данным физическим агентом могут служить тестовыми для оценки результатов воздействия электромагнитным излучением других диапазонов на клеточном уровне. Если и свет, и СВЧ-излучение могли бы модифицировать гидратные оболочки простых ионов в цитоплазме, то тем самым эти факторы могли бы повлиять на ионную проницаемость биологических мембран, на потенциал покоя клеток и, в конечном итоге, на функциональное состояние облучаемого объекта.

Для проверки гипотезы о воздействии электромагнитного излучения на дипольные молекулы воды, связанные с ионами, была разработана математическая модель структуры гидратных оболочек и получены оценки энергии связи диполей, принадлежащих трём ближайшим к иону оболочкам (таблица 9). Полученные в рамках построенной модели результаты расчетов, позволили установить диапазоны частот ЭМИ, способные воздействовать на эти компоненты химических процессов при условии резонансного поглощения ими энергии излучения.

Результаты расчётов показывают, что фотоны СВЧ могут быть поглощены вращательными уровнями диполей связанной воды, с изменением энергетического состояния второй и третьей гидратных оболочек хлора и фтора. В то же время, энергия фотонов видимого света оказывается в несколько раз большей, чем энергия связи диполей первой оболочки и на несколько порядков выше, чем энергии связи второй и третьей

оболочек. Поэтому энергия ЭМИ светового диапазона не может непосредственно поглощаться этими элементами структурами оболочек.

Таблица 9

Энергии связей гидратных оболочек ионов

	ΔE, электрон-вольт (эВ)			ΔE, кДж/моль	
	1-я	2-я	3-я	2-я	3-я
	ΔE(1)	ΔE(2)	ΔE(3)	ΔE(2)	ΔE(3)
Li⁺	5.208	3.3×10 ⁻³	2.0×10 ⁻⁶	0.323	2.1×10 ⁻⁴
Na⁺	4.198	0.097	2.3×10 ⁻³	9.39	0.217
K⁺	3.335	0.151	6.8×10 ⁻³	14.53	0.656
Rb⁺	3.252	0.128	5.1×10 ⁻³	12.38	0.489
F⁻	5.199	5.6×10 ⁻³	5.9×10 ⁻⁶	0.54	5.7×10 ⁻⁴
Cl⁻	3.760	8.0×10 ⁻⁴	2.0×10 ⁻⁷	0.083	1.9×10 ⁻⁵
Br⁻	3.070	0.062	1.2×10 ⁻³	5.94	0.119

Эти данные были использованы для проверки гипотез о неспецифическом и специфическом, то есть фотохимическом, механизмах воздействия ЭМИ на биообъекты. С этой целью были проведены сравнительные эксперименты по воздействию ЭМИ СВЧ и светового диапазонов на колонии бактерий *Esherichia Coli*.

Воздействие широкополосного света, света лазера и СВЧ-излучения на выживаемость бактерий

Учитывая технические сложности обеспечения СВЧ-воздействия на сердце крыс, в эксперименте, в качестве объекта воздействия были выбраны бактерии *Esherichia Coli*, наиболее часто используемые в опытах по изучению биологических эффектов СВЧ. Было проведено изучение дозовой зависимости гибели клеток и изменения титра инфекционных единиц в культуре в условиях действия ЭМИ СВЧ - диапазона. В таблице 10 представлены результаты, показывающие выживаемость культур клеток в зависимости от величины плотности потока мощности излучения (ППМ).

Полученные результаты показывают, что СВЧ воздействие влияет на выживаемость бактерий. Это свидетельствует в пользу предположения о воде, как о первичной мишени биологического действия СВЧ – излучения низких интенсивностей и о модификации активности гидратированных ионов, вызываемой электромагнитными полями. Действительно, именно возбуждение вращательных уровней диполей воды и последующая тепловая релаксация этой энергии является основным фактором воздействия СВЧ-излучения на воду. Если данное предположение верно, то световое воздействие низкой интенсивности, не способное изменить температуру объекта, не должно существенно повлиять на микробные популяции. С

целью проверки этой гипотезы осуществлялось облучение культур клеток видимым светом двух различных диапазонов.

Таблица 10

Выживаемость (относительная доля) клеток *E.coli* С 600 в МПБ при воздействии электромагнитных полей СВЧ-диапазона и нагрева

ППМ мВт/см ²	ΔТ град	Выживаемость	
		СВЧ	Нагрев
3.4	0.34	0.92 ±0.08	0.75±0.10
6.8	0.68	0.84 ±0.13	0.51±0.48
10.2	1.02	0.68 ±0.12	0.27±0.30
13.6	1.36	0.44 ±0.07	0.18±0.15
17.0	1.70	0.19 ±0.09	0.083±0.08
20.4	2.04	0.058±0.03	0.02±0.01
23.8	2.38	0.059±0.04	0.04±0.08
27.2	2.72	0.041±0.025	0.025±0.01

Результаты опытов по воздействию на образцы красным и зелёным светом, красным светом гелий-неонового лазера и СВЧ - излучением представлены в таблице 11.

Таблица 11

Влияние широкополосного света и лазерного излучения на количество колонийобразующих единиц

Время воздействия	Контроль	Красный свет	Зеленый свет	Лазер	СВЧ
10 минут	335± 49	447± 58	317± 43	487± 55	231± 35
20 минут	406± 49	453± 54	402± 43	389± 51	155± 29*
40 минут	335± 45	467± 52	384± 53	251± 56*	128± 32*

* р< 0.05 по отношению к исходному уровню

Сравнительная оценка действия лазерного излучения и, широкополосного красного света показывает наличие дозозависимого эффекта светового воздействия. Приведенные в таблице 11 данные свидетельствуют о том, что зеленый свет не оказывает воздействия, приводящего к статистически достоверным изменениям числа колоний-образующих единиц при трёх различных дозах облучения. Люминесцентный красный свет и свет лазера оказывают стимулирующее воздействие, приводящее к статистически значимому увеличению числа колоний-образующих единиц. СВЧ-излучение, в отличие от светового, вызывает угнетающее воздействие, приводящее к статистически значимому уменьшению числа колоний-образующих единиц. Данный факт свидетельствует в пользу предположения об альтернативном, по отношению к СВЧ, механизме воздействия светового излучения.

Учитывая данные этого эксперимента, а также обоснованный теоретическими расчетами факт того, что гидратные оболочки ионов не могут являться первичными мишенями для света, неспецифический, тепловой механизм воздействия света на живые ткани следует отвергнуть в пользу фотохимического, обусловленного поглощением фотонов молекулами, имеющими спектральные линии поглощения, в диапазоне используемого в опыте электромагнитного излучения. Примером этого может быть поглощение красного света молекулами СОД, в результате которого происходит модификация их активности.

ВЫВОДЫ

1. Облучение открытого сердца крыс широкополосным красным светом, после ишемии миокарда, увеличивает выживаемость животных и уменьшает интервал времени между возобновлением коронарного кровотока и восстановлением сердечной деятельности.
2. Широкополосный свет оказывает более эффективное, по сравнению с лазерным излучением, действие на сердечно-сосудистую систему крыс в опытах по моделированию ишемии миокарда на открытом сердце.
3. Лазерное и широкополосное излучения модифицируют ультраструктуру миокарда, причём лазерный свет приводит к сужению просветов капилляров коронарной системы, уменьшению числа и изменению формы митохондрий, ядер и ядрышек кардиомиоцитов.
4. Облучение миокарда лазерным и широкополосным красным светом увеличивает ферментативную активность СОД и снижает содержание продуктов перекисного окисления липидов в тканях мышцы сердца.
5. Облучение реинфузируемой крови крыс красным светом как НИЛИ, так и ШКС, способствует более эффективной реанимации после клинической смерти, приводя к более полному восстановлению АД, ритмической активности сердца и нормализации функции дыхания животных по сравнению с контролем. При этом ШКС в большей степени, чем НИЛИ, способствует восстановлению количества гемоглобина и эритроцитов в крови опытных животных.
6. Излучение гелий-неонового лазера и красное люминесцентное излучение слабо положительно влияют на выживаемость микробных популяций *Escherichia coli*, тогда, как низкоинтенсивное СВЧ-излучение значительно снижает величину этого параметра. Зеленый свет в этих опытах практически не оказывает никакого влияния.
7. Наблюдаемые закономерности эффектов облучения бактерий ЭМИ СВЧ диапазона могут быть следствием поглощения энергии этого излучения молекулами воды гидратных оболочек простых ионов и позволяют отвергнуть гипотезу о неспецифическом, тепловом действии красного света на живые клетки.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Лазукин В.Ф., Балабанов В.В. К вопросу об определении термодинамической работы процессов разделения смесей. //Высокоочищенные вещества, 1989, №4, с. 43-46.
2. Zotrin A.D., Lazukin V.F., Stepanov V.M. Low solubility estimation method for the system with hydrogen bonds. //Pos. Repr. in V-th International symposium on Solubility Phenomena, Moscow, Russia, July 8-10, 1992, p. 63.
3. Малиновская С.Л., Арефьев А. Б., Лазукин В.Ф. Эффекты воздействия электромагнитных излучений на функциональное состояние живых клеток. //Тезисы докладов "XVIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова", Казань, 2001 г.
4. Мониц В.А., Лазукин В.Ф. Использование ИВТ в термодинамике водных растворов солей Na и K. //Тезисы Первой национальной конференции «Информационно Вычислительные Технологии в решении фундаментальных проблем и прикладных задач химии, биологии, фармацевтики». Обнинск, 2002 г., с.72-73.
5. Малиновская С.Л., Мониц В.А., Крылов В.И., Лазукин В.Ф. Исследование действия лазерного излучения и широкополосного красного света на функциональное состояние сердца после ишемии. //Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. Выпуск 1 (6). Электромагнитные поля и излучения в биологии и медицине. Н.Новгород: Изд-во ННГУ, 2003. - с. 96 - 98.
6. Мониц В.А., Лазукин В.Ф. Расчет среднеионных коэффициентов активности в гидратной модели растворов сильных электролитов. //Тезисы Третьей национальной конференции «Информационно Вычислительные Технологии в решении фундаментальных проблем и прикладных задач химии, биологии, фармацевтики». Обнинск, 2005.
7. Крылов В.И., Малиновская С.Л., Мониц В.А., Лазукин В.Ф. Сравнительный анализ эффективности лазерного излучения и красного света при реанимации крыс. //Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. Серия Биология. Выпуск 1 (11). Н.Новгород: Изд-во ННГУ, 2006. – С. 184-187.