

УДК 615.849.19:616.001.41

DOI: 10.37895/2071-8004-2020-24-2-3-90-94

ВЛИЯНИЕ ЛАЗЕРНОГО ИНФРАКРАСНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА НЕКОТОРЫЕ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕГЕНЕРИРУЮЩЕЙ СКЕЛЕТНОЙ МЫШЦЫ В ВОЗРАСТНОМ АСПЕКТЕ

Р.В. Галлямутдинов¹, Л.В. Астахова¹, Е.С. Головнева^{1,2}, О.Ю. Серышева²

¹ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», г. Челябинск, Россия

²ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет Минздрава России», г. Челябинск, Россия

Резюме

Лазерное воздействие может стимулировать пролиферацию клеток и восстановление различных тканей после повреждения. Остается неизученным возрастной аспект влияния лазера на регенерацию мышц, в частности, реакция миосателлитов и зрелых миоцитов. Целью исследования являлось изучение влияния лазерного излучения на площадь ядер и количество миосателлитов, а также площадь ядер миоцитов на модели посттравматической регенерации скелетной мышцы у животных разных возрастных групп. *Материал и методы.* Эксперимент проведен на 32 беспородных крысах, разделенных на 2 группы: юных (3 месяца) и старых (30 месяцев). Сформированные хирургические повреждения икроножной мышцы на левой конечности были опытными, где осуществлялось лазерное воздействие (1060 нм, мощность – 2,0 Вт, непрерывный режим, 60 с, однократно), повреждения на правой конечности служили динамическим контролем. Выведение животных из эксперимента проводили на сроках 7 и 14 суток. Образцы тканей фиксировали в формалине, готовили гистологические срезы, окрашивали гематоксилин-эозином и пикрофуксином по Ван-Гизон, проводили морфометрический анализ цифрового изображения объектов. *Результаты.* Установлено, что после лазерного воздействия на мышцу достоверно увеличивается площадь ядер и количество миосателлитов по сравнению с контрольной группой вне зависимости от возраста животного. Реакция на лазер со стороны ядер миоцитов проявляется в обеих возрастных группах, но достоверно выше у юных животных. *Заключение.* Полученные результаты подтверждают возможности лазерного излучения активировать регенерацию мышц независимо от возраста животного.

Ключевые слова: лазер, механическое повреждение, скелетная мышечная ткань, миосателлиты, миоциты.

Для цитирования: Галлямутдинов Р.В., Астахова Л.В., Головнева Е.С., Серышева О.Ю. Влияние лазерного инфракрасного излучения на некоторые морфофункциональные показатели регенерирующей скелетной мышцы в возрастном аспекте // Лазерная медицина. – 2020. – Т. 24. – № 2–3. – С. 90–94.

Контакты: Галлямутдинов Р.В., e-mail: rkenpachi@bk.ru

EFFECTS OF INFRARED LASER RADIATION ON QUALITATIVE AND QUANTITATIVE INDICES OF A REGENERATING SKELETAL MUSCLE IN THE AGE ASPECT

Gallyamutdinov R.V.¹, Astakhova L.V.¹, Golovneva E.S.^{1,2}, Serysheva O.U.²

¹Multidisciplinary Center of Laser Medicine, Chelyabinsk, Russia

²South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

Abstract

Laser light can stimulate cell proliferation and restoration of various tissues after injury. The age aspect of laser irradiation effects at muscle regeneration, in particular the response of myosatellitocytes and myocytes, remains unexplored. The purpose of the research was to study the effect of laser light at the area of nuclei and the number of myosatellitocytes, as well as the area of myocyte nuclei in a model of post-traumatic regeneration of skeletal muscle in animals of different age groups. *Material and methods.* 32 laboratory mongrel rats, divided into 2 groups – young (3 months) and old (30 months) – were taken into the experiment. The formed surgical injuries at the caviar muscle on the left limb were experimental; they were irradiated with laser light (1060 nm, power 2.0 W, continuous mode, exposure 60 s, one time); injuries on the right limb were dynamic control. The animals were removed from the experiment on days 7 and 14. Tissue samples were fixed in formalin, histological sections were prepared, hematoxylin-eosin and Van Gizon picrofuxin were stained, and a digital image of objects was morphometrically analyzed. *Results.* It was found that after laser irradiation of the muscle, the area of nuclei and the number of myosatellites increase significantly compared to the control group, regardless of animal's age. The response to myocyte nuclei to laser light was seen in both age groups, but it was significantly higher in younger animals. The obtained results demonstrate that laser radiation has the potential to activate muscle regeneration regardless of animal's age.

Key words: laser therapy, physical trauma, skeletal muscle, satellite cells, myocytes.

For citations: Gallyamutdinov R.V., Astakhova L.V., Golovneva E.S., Serysheva O.U. Effects of infrared laser radiation on qualitative and quantitative indices of a regenerating skeletal muscle in the age aspect. *Lazernaya medicina.* 2020; 24 (2–3): 90–94. [In Russ.]

Contacts: Gallyamutdinov R.V., e-mail: rkenpachi@bk.ru

ВВЕДЕНИЕ

Способность мышечной ткани к регенерации после повреждения обусловлена несколькими взаимосвязанными процессами – пролиферацией малодифференцированных клеток – миосателлитоцитов, гипертрофией оставшихся жизнеспособных мышечных волокон, фиброзом и неангиогенезом [1–3].

Активация миосателлитных клеток сопровождается изменением их ультраструктуры, в частности, увеличивается размер ядра, объем цитоплазмы, увеличивается численность митохондрий, рибосом. Далее миосателлитоциты мигрируют в очаг повреждения и претерпевают трансформацию в миобласты с последующим слиянием между собой, а также с жизнеспособными, но поврежденными мышечными волокнами [1, 2]. По данным литературы известно, что существуют возрастные особенности регенерации: у молодых животных сателлитных клеток больше, пролиферация происходит интенсивно, у старых особей мышцы восстанавливаются медленно и функционально неполноценно [2]. Низкоинтенсивное лазерное воздействие может стимулировать репаративные процессы в тканях, рост новых сосудов и пролиферацию клеток, в том числе и малодифференцированных [4], однако влияние лазерной терапии на регенерацию скелетных мышц в возрастном аспекте остается неизученным.

Целью исследования являлось изучение влияния лазерного излучения ближнего инфракрасного спектра на количество и площадь ядер миосателлитоцитов, а также площадь ядер миоцитов на модели посттравматической регенерации скелетной мышцы у крыс разных возрастных групп.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент был проведен на 32 беспородных крысах. Условия содержания животных и приемы работы с ними соответствовали международным и российским этическим принципам и нормам биоэтики (Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации, 1964; Европейская конвенция по биоэтике, 1996; Основы законодательства РФ // Ведомости съезда народных депутатов РФ и ВС РФ, 1993. – № 33).

Животные были разделены на 2 группы по 16 особей. Первая группа состояла из старых особей возрастом в 30 месяцев. Вторая группа состояла из юных крыс возрастом 3 месяца. Для чистоты эксперимента использовались только мужские особи. Моделирование травмы латеральной головки икроножной мышцы производили под общим обезболиванием препаратом «Золетил» в дозе 5 мл/кг. Для доступа к икроножной мышце производили кожный разрез длиной 1 см на каудальной поверхности задних конечностей ниже коленного сустава на 0,4–0,5 см. Разрез выполняли строго по центру параллельно длиннику большеберцовой кости. Хирургическим скальпелем производили механическое повреждение мышцы путем выполнения

5 надрезов перпендикулярно длиннику большеберцовой кости. Сформированные повреждения мышцы на левой конечности были опытными, на правой – служили динамическим контролем.

На втором этапе эксперимента однократно воздействовали на раневую поверхность левой голени лазерным излучением длиной волны 1060 нм. Лазерное воздействие осуществляли с помощью аппарата «Лахта-Милон» (г. Санкт-Петербург, Россия), мощностью 2 Вт в непрерывном режиме, длительностью в 1 минуту. Излучение подавалось через моноволоконный кварцевый световод с диаметром светонесущей жилы 0,4 мм. Обработку раневой поверхности производили с расстояния 5 мм сканирующими движениями со скоростью продвижения 5 мм/с. Лабораторных животных выводили из эксперимента через 7 и 14 суток.

Для оценки морфофункционального состояния скелетной мышечной ткани препараты фиксировали 10% нейтральным формалином. После стандартной гистологической проводки, приготовления парафиновых блоков, срезы окрашивали гематоксилин-эозином, пикрофуксином по Ван-Гизон.

Гистологические препараты изучали на микроскопе LEICA DMRXA (Германия) с помощью цифровой видеокамеры LEICA DFC 290 (Германия), сопряженной с ПК. В качестве объектов для морфометрических исследований использовали получившиеся графические изображения микропрепаратов в формате TIFF в цветовом пространстве RGB. Для морфометрических исследований использовали лицензионную версию программы анализа изображений ImageScore M (Россия). Количество миосателлитоцитов рассчитывалось на увеличении 400 (об. $\times 40$, ок. $\times 10$), площадь ядер миосателлитоцитов и миоцитов – с использованием функции «ручное выделение» на увеличении 1000 (об. $\times 100$, ок. $\times 10$) и масляной иммерсии.

Статистическая обработка данных проводилась на персональном компьютере с помощью лицензированного пакета прикладных программ: Excel 2016 и PAST версии 4.01. При обработке полученных данных использовались методы вариационной статистики. Определялось среднее арифметическое значение и его ошибка ($M \pm m$). Для оценки достоверности различий между группами использовали непараметрический метод Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На 7-е сутки и в контрольной, и в опытной группах в поперечно-полосатой мышечной ткани икроножной мышцы определялись неправильной формы очаги деструкции, выполненные фрагментами некротизированных мышечных волокон.

В перифокальных зонах наблюдалась пролиферация незрелой грануляционной ткани, богатой клеточными элементами, с небольшим количеством

новообразованных соединительнотканых волокон и начальными явлениями неангиогенеза. Мышечные волокна, прилегающие к очагам деструкции, несколько увеличены в объеме, с признаками контрактурной дегенерации и изменениями тинкториальных свойств. В группе лазерного воздействия обращало на себя внимание большое количество пролиферирующих миосателлитов (рис. 1а, табл. 1). В контрольной группе также выявлялись миосателлиты в этой зоне, но в меньшем количестве (рис. 1б, табл. 1).

К 14-м суткам очаги деструкции и в опытной, и в контрольной группах замещались молодой грануляционной тканью с большим количеством клеточных элементов (преимущественно фибробластов), новообразованных соединительнотканых волокон и сосудов. В опытной группе со стороны мышечных волокон

рядом с грануляционной тканью отмечались явления регенерации в виде образования колб роста, окруженных группами миосателлитов (рис. 1в). В контрольной группе сохранялись очаги контрактурной дегенерации мышечных волокон, колбы роста были единичными. Количество миосателлитов было достоверно меньше, чем в опытной группе (табл. 1).

Морфометрически установлено, что площадь ядер миосателлитов в опытной группе на всех сроках исследования была достоверно больше, чем в соответствующем контроле (табл. 1). Также стоит отметить тенденцию к увеличению площади ядер миосателлитов с 7-х по 14-е сутки как в группе после лазерного облучения, так и без данного воздействия. Максимальная площадь ядер миосателлитов наблюдалась в опытной группе на 14-е сутки. Достоверных отличий

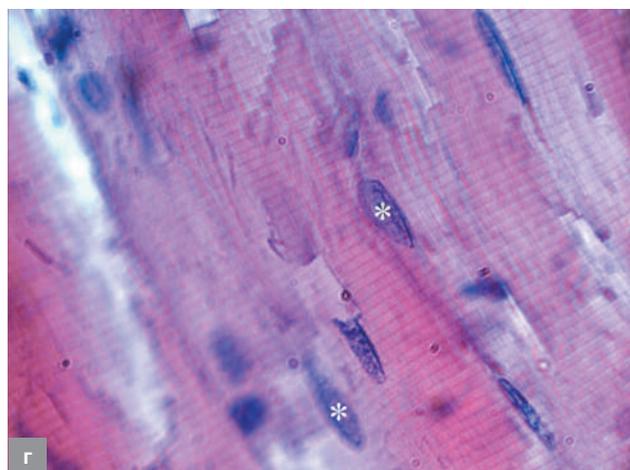
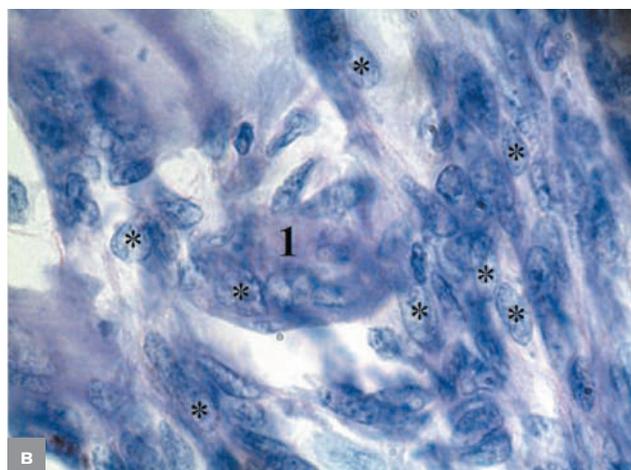
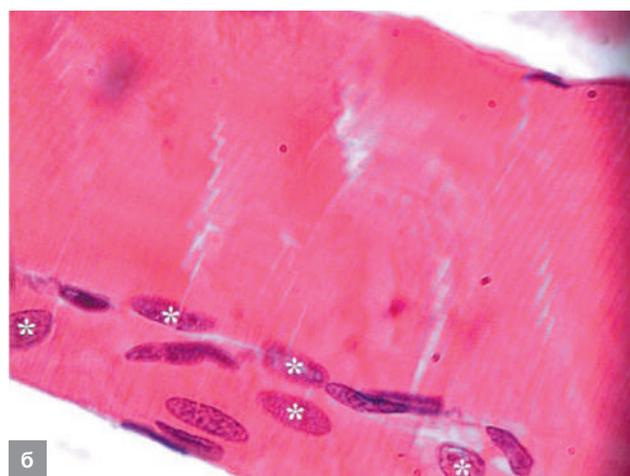
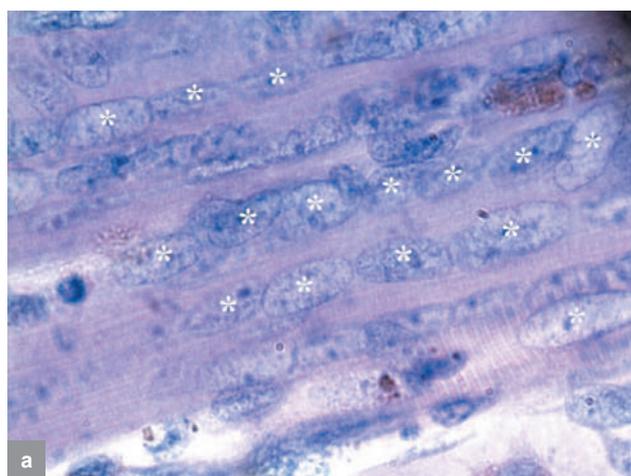


Рис. 1. Морфологическая картина регенерирующей скелетной мышечной ткани на разных сроках исследования у молодых и старых животных: **а** – большое количество пролиферирующих миосателлитов (*) у старой крысы через 7 суток после лазерного воздействия; **б** – малое количество миосателлитов (*) у старой крысы в контрольной группе через 7 суток; **в** – большое количество пролиферирующих миосателлитов (*) вокруг колбы роста (1) у молодой крысы через 14 суток после лазерного воздействия; **г** – малое количество миосателлитов у молодой крысы через 14 суток в контрольной группе. Окраска: гематоксилин-эозин, увеличение: 1000, масляная иммерсия

Fig. 1. Morphological pattern in regenerating skeletal muscle tissue at different terms of experiment in young and old animals: **a** – large number of proliferating myosatellites (*) in 7 days in an old rat after laser exposure; **б** – small number of myosatellites (*) in an old rat in the control group in 7 days; **в** – large number of proliferating myosatellites (*) around the growth bulb (1) in a young rat in 14 days after laser exposure; **г** – small number of myosatellites (*) in a young rat in the control group in 14 days. Staining: hematoxylin-eosin, magnification: 1000, oil immersion

Таблица 1

Морфометрические показатели миосателлитоцитов скелетной мышцы после лазерного облучения

Table 1

Morphometric indicators of myosatellite cells after laser irradiation

Показатели Indicators		7 суток, контроль 7 days, control	7 суток, опыт 7 days, experiment	14 суток, контроль 14 days, control	14 суток, опыт 14 days, experiment
Площадь ядер, мкм ² Nucleus area, μm ²	Старые крысы Old rats	32,81 ± 1,57	41,27 ± 1,54 [#]	37,37 ± 0,81	49,66 ± 1,53 [#]
	Юные крысы Young rats	32,68 ± 1,07	41,20 ± 0,79 [#]	35,15 ± 1,1	47,61 ± 0,84 [#]
Кол-во клеток / мм ² Cells/mm ²	Старые крысы Old rats	1128 ± 44,4	1752 ± 76,8 [#]	1116 ± 46,8	1488 ± 80,4 [#]
	Юные крысы Young rats	1188 ± 42,1	1848 ± 94,8 [#]	1164 ± 39,6	1548 ± 61 [#]

Примечание. [#] – p < 0,05 при сравнении группы лазерного воздействия с группой контроля. * – p < 0,05 при сравнении разных возрастных групп.

Note. [#] – p < 0,05 when comparing the laser group with the control one. * – p < 0,05 when comparing different age groups.

по этому показателю между группой старых и юных животных не было выявлено.

После лазерного воздействия на мышцу на всех сроках эксперимента отмечалось достоверное увеличение количества миосателлитов по сравнению с группой контроля. Достоверных изменений при сравнении показателей юных и старых животных не было выявлено.

Морфометрический анализ показал статистически значимое увеличение площади ядер миоцитов на всех сроках исследования в опытной группе по отношению к контролю. В опытной группе площадь ядер миоцитов максимально возросла к 14-му дню эксперимента. При этом у юных крыс площадь ядер миоцитов была достоверно больше, чем у старых животных. В контрольных группах прослеживалась та же динамика, но достоверные изменения между показателями юных и старых особей были выявлены только на сроке 7 суток (табл. 2).

Полученные результаты эксперимента показывают, что лазерное излучение ближнего инфракрасного спектра стимулирует пролиферативную активность миосателлитоцитов, что выражается в увеличении площади их ядер и количества клеток. Данные изменения

могут быть вызваны не только прямой фотоактивацией экспрессии генов миосателлитных клеток, но опосредованы усилением активности макрофагов, тучных клеток и других регуляторных клеток зоны репарации. Эти клеточные популяции реализуют митогенные ростовые факторы и ферменты, а также препятствуют апоптозу уцелевших мышечных волокон [5–7]. Отсутствие различий между показателями миосателлитоцитов в возрастном аспекте может быть связано с особенностями исследованных мышц, т. к. икроножные мышцы активно функционируют на протяжении всей жизни животного и резервов регенерации должно хватать для обеспечения этих процессов. Полученные данные о влиянии лазера на камбиальные клетки скелетной мышечной ткани подтверждают, что лазерную активацию пролиферации клеток-предшественников возможно применять в различных возрастных группах для эффективной стимуляции регенерации.

Пролиферация миосателлитоцитов после воздействия лазерного излучения могла являться причиной наблюдаемых изменений ядер зрелых миоцитов. По литературным данным, миосателлитоциты после активации экспрессируют специфические мышечные факторы транскрипции, синтезируют интерлейкины

Таблица 2

Площадь ядер миоцитов скелетной мышцы после лазерного облучения

Table 2

Nucleus area of skeletal muscle myocytes after laser radiation

Показатели Indicators		7 суток, контроль 7 days, control	7 суток, опыт 7 days, experiment	14 суток, контроль 14 days, control	14 суток, опыт 14 days, experiment
Площадь, мкм ² Area, μm ²	Старые крысы Old rats	11,85 ± 0,74*	16,93 ± 0,57 [#]	16,43 ± 0,81	21,03 ± 0,82 ^{#,*}
	Юные крысы Young rats	15,35 ± 0,64	18,07 ± 0,78 [#]	18,15 ± 0,76	24,27 ± 0,71 [#]

Примечание. [#] – p < 0,05 при сравнении группы лазерного воздействия с группой контроля. * – p < 0,05 при сравнении разных возрастных групп.

Note. [#] – p < 0,05 when comparing the laser group to the control one. * – p < 0,05 when comparing different age groups.

и факторы роста [2, 6], что может паракринно влиять на близлежащие миоциты и в последующем вызывать преобразование их ядер и гипертрофию. Кроме этого, слияние миосателлитоцитов с оставшимися мышечными волокнами приводит к пополнению ядерного пула миоцитов [6], что также сказывается на средней площади ядер. Благодаря этим процессам после лазерного воздействия на поврежденную икроножную мышцу реакция ядер миоцитов старых животных на сроке 7 суток была аналогична показателям юных крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, лазерное воздействие на регенерирующую скелетную мышцу меняет ответные реакции как сателлитных, так и зрелых миоцитов. Лазерное воздействие на поврежденную мышцу приводит к активации миосателлитов независимо от возраста животного. Более выраженная ответная реакция со стороны ядер миоцитов после лазерного воздействия наблюдается у молодых животных.

Полученные результаты расширяют представления о возрастных особенностях регенерации икроножной мышцы и возможностях лазерного излучения активировать восстановительные процессы в скелетных мышцах животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Одинцова И.А., Чепурненко М.Н., Комарова А.С.* Миосателлитоциты – камбиальный резерв поперечнополосатой мышечной ткани // *Гены и клетки.* – 2014. – № 1. – С. 6–14.
2. *Шурыгин М.Г., Болбат А.В., Шурыгина А.В.* Миосателлиты как источник регенерации мышечной ткани // *Фундаментальные исследования.* – 2015. – № 1–8. – С. 1741–1746.
3. *Юшков Б.Г.* Клетки иммунной системы и регуляция регенерации // *Бюллетень сибирской медицины.* – 2017. – № 4. – С. 94–105.
4. *Лебедева А.И., Муслимов С.А., Вагапова В.Ш., Щербаков Д.А.* Морфологические аспекты регенерации скелетной мышечной ткани, индуцированной аллогенным материалом // *Практическая медицина.* – 2019. – Т. 17. – № 1. – С. 98–102.
5. *Улащик В.С.* Стволовые клетки и физиотерапия // *Новости медико-биологических наук. News of biomedical sciences.* – 2017. – № 1. – С. 77–84.
6. *Шенкман Б.С., Туртикова О.В., Немировская Т.Л., Григорьев А.И.* Сократительная активность скелетной мышечной ткани и судьба миоядер // *Acta Naturae.* – 2010. – № 2 (5). – С. 62–68.
7. *Godwin J.W., Pinto A.R., Rosenthal N.A.* Macrophages are required for adult salamander limb regeneration, PNAS2013, 110 (23), 110 (23), 9415–9420.

REFERENCES

1. *Odivcova I.A., Chepurnenko M.N., Komarova A.S.* Myosatellitocytes – the cambial reserve of the striated muscle tissue. *Geny i kletki.* 2014; 1: 6–14. [In Russ.]
2. *Shurygin M.G., Bolbat A.V., Shurygina A.V.* Myosatellites as a source of muscle tissue regeneration. *Fundamental'nye issledovaniya.* 2015; 1–8: 1741–1746. [In Russ.]

3. *Yushkov B.G.* Cells of the immune system and regulation of regeneration. *Byulleten» sibirskoj mediciny.* 2017; 4: 94–105. [In Russ.]
4. *Lebedeva A.I., Muslimov S.A., Vagapova V.Sh., Shcherbakov D.A.* Morphological aspects of skeletal muscle tissue regeneration induced by allogeneic material. *Practicheskaya medicina.* 2019; 17 (1): 98–102. [In Russ.]
5. *Ulashchik V.S.* Stem cells and apparatus therapy. *Novosti mediko-biologicheskikh nauk.* 2017; 1: 77–84. [In Russ.]
6. *Shenkman B.S., Turtikova O.V., Nemirovskaya T.L., Grigor'ev A.I.* The contracting activity of skeletal muscle tissue and the fate of myonuclei. *Acta Naturae.* 2010; 2 (5): 62–68. [In Russ.]
7. *Godwin J.W., Pinto A.R., Rosenthal N.A.* Macrophages are required for adult salamander limb regeneration, PNAS2013, 110 (23), 110 (23), 9415–9420.

Конфликт интересов

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Соответствие нормам этики

Авторы подтверждают, что соблюдены права людей, принимавших участие в исследовании, включая получение информированного согласия в тех случаях, когда оно необходимо, и правила обращения с животными в случаях их использования в работе.

Compliance with ethical principles

The Authors confirm that respect the rights of the people participated in the study, including obtaining informed consent when it is necessary and the rules of treatment of animals when they are used in the study.

Сведения об авторах

Галлямутдинов Ростислав Винорович – научный сотрудник отделения ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», г. Челябинск, Россия; e-mail: rkenpachi@bk.ru; ORCID: 0000-0002-8994-570X.

Головнева Елена Станиславовна – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры нормальной физиологии Южно-Уральского государственного медицинского университета, заместитель директора по научно-исследовательской работе отделения ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», г. Челябинск, Россия; e-mail: micron30@mail.ru; ORCID: 0000-0002-6343-7563.

Астахова Людмила Витальевна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник отделения ГБУЗ «Многопрофильный центр лазерной медицины», г. Челябинск, Россия; e-mail: bonikva@mail.ru; ORCID: 0000-0002-3155-6605.

Серышева Олеся Юрьевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии Южно-Уральского государственного медицинского университета Минздрава России, г. Челябинск, Россия; e-mail: 22kiti22@mail.ru; ORCID: 0000-0003-1579-6315.

Information about authors

Gallyamutdinov Rostislav – researcher in Multiprofile Center of Laser Medicine, Chelyabinsk, Russia; e-mail: rkenpachi@bk.ru; ORCID: 0000-0002-8994-570X.

Golovneva Elena – MD, Dr.Sc. (med), professor at department of normal physiology in South Ural State Medical University, Deputy Director in Multiprofile Center of Laser Medicine, Chelyabinsk, Russia; e-mail: micron30@mail.ru; ORCID: 0000-0002-6343-7563.

Astakhova Lyudmila – MD, Cand. Sc. (med), researcher at Multiprofile Center of Laser Medicine, Chelyabinsk, Russia; e-mail: bonikva@mail.ru; ORCID: 0000-0002-3155-6605.

Serysheva Olesya – MD, Cand. Sc. (med), associate professor at department of histology, embryology and cytology in South Ural State Medical University (Chelyabinsk, Russia; e-mail: 22kiti22@mail.ru; ORCID: 0000-0003-1579-6315.