

Влияние гипогликемического средства гликоразмулина на функциональное состояние митохондрий при стрептозотацин-индуцированном диабете

Проф. М.И. АСРАРОВ^{1*}, М.К. ПОЗИЛОВ¹, к.б.н. Н.А. ЭРГАШЕВ¹, М.М. РАХМАТУЛЛАЕВА²

¹Институт биоорганической химии им. акад. А.С. Садыкова Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент; ²Ташкентский фармацевтический институт

Изучено состояние мегапоры (МРТП), дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени и поджелудочной железы крыс при стрептозотацин-индуцированном диабете, рассмотрены пути коррекции обнаруженных мембранных нарушений с помощью гликоразмулина, гипогликемического препарата на основе мумие и экстракта корней и корневищ растения родиолы *Rhodiola Semenovii* A. В условиях экспериментального диабета (ЭД) скорость набухания митохондрий печени и поджелудочной железы крыс выше, чем митохондрий здоровых крыс, т.е. при патологии МРТП митохондрий печени и поджелудочной железы находится в открытом состоянии. Гликоразмулин возвращает МРТП в нормальное состояние, снимая таким образом влияние стрептозотацина на митохондрии. При ЭД скорость дыхания митохондрий печени и поджелудочной железы в состояниях V₃ и V₄ увеличивается, что существенно снижает коэффициенты ДК и АДФ/О в сравнении с контролем. Полученные данные свидетельствуют о разобщении дыхания и окислительного фосфорилирования при ЭД. Гликоразмулин (перорально в дозе 50 мг/кг массы тела в течение 8 дней) устраняет обнаруженные функциональные нарушения митохондрий печени и поджелудочной железы крыс, возможно, благодаря своим антиоксидантным свойствам.

Ключевые слова: стрептозотациновый диабет, митохондрии, МРТП, гликоразмулин, окислительное фосфорилирование.

The influence of the hypoglycemic agent glycorazmulin on the functional state of mitochondria in the rats with streptozotocin-induced diabetes

M.I. ASRAROV^{1*}, M.K. POZILOV¹, N.A. ERGASHEV¹, M.M. RAKHMATULLAEVA²

¹Academician A.S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent; ²Tashkent Pharmaceutical Institute

We have studied the state of the mitochondrial permeability transition pore (MPTP), respiration, and oxidative phosphorylation in mitochondria of the liver and pancreas of the rats with streptozotocin-induced diabetes. In addition, we considered the approaches to the correction of membrane lesions with the help of glycorazmulin, a hypoglycemic preparation based on mumiyo (Jew's tar) and an extract from rhodiola roots and tubers (*Rhodiola Semenovii* A.). The mitochondrial swelling rate in the liver and pancreas of the rats with experimental diabetes mellitus is known to be lower than in the unaffected animals; in other words, hepatic and pancreatic megapores in case of pathology remain open. Glycorazmulin normalizes their state and thereby eliminates the effect of streptozotocin on mitochondria. The mitochondrial respiration rate in the liver and pancreas of the rats with experimental diabetes increases at states V₃ and V₄ which results in a significant decrease of respiratory and ADP/O coefficients compared with the control values. The results of the study suggest decoupling of respiration from oxidative phosphorylation in the rats with experimental diabetes. Glycorazmulin administered per os at a dose of 50 mg/kg b.w. during 8 days eliminated functional disorders of mitochondria in the liver and pancreas of the rats, presumably by virtue of its antioxidative properties.

Key words: streptozotocin-induced diabetes, mitochondria, MPTP, glycorazmulin, oxidative phosphorylation.

Несмотря на разнообразие средств лечения сахарного диабета, остается востребованным поиск новых фармакологических средств и их «мишеней». Такими «мишенями» могут быть мембраны митохондрий и локализованные в них структуры, в первую очередь дыхательная цепь и митохондриальная мегапора (митохондриальная пора перехода проницаемости, mitochondrial permeability transition pore, МРТП) [1, 2]. Роль МРТП в развитии различных патологий, в частности сахарного диабета, активно обсуждается [3]. Образование активных форм кисло-

рода в клетке и чрезмерная активация процессов свободнорадикального окисления лежат в основе развития сахарного диабета [4, 5]. Эти процессы рассматривают в качестве универсального механизма, объединяющего основные биохимические пути токсичного влияния гипергликемии на организм. Известно также, что дыхательная цепь митохондрий служит основным источником активных форм кислорода [6]. С другой стороны, воздействие активных форм кислорода переводит МРТП в открытое состояние, митохондрии набухают, и иницируются про-

цессы некроза или апоптоза [7]. Наряду с синтезом АТФ митохондрии играют важную роль в нормальном метаболизме: например, эти органеллы переключают пути, приводящие к секреции инсулина β -клетками в ответ на поступление в клетку глюкозы [4, 8].

Ранее на основе мумие и экстракта корней и корневищ растения родиолы *Rhodiola Semenovii* A. был разработан комбинированный лекарственный препарат гипогликемического действия — гликоразмулин [9], который при аллоксановом диабете у крыс оказывал выраженный гипогликемический эффект, положительно влиял на липидный обмен и нормализовал функциональное состояние печени [10]. Кроме того, гликоразмулин восстановил иммунологическую реактивность организма при остром токсическом гепатите и лучевой болезни [11].

Цель настоящей работы — изучение состояния митохондрий печени и поджелудочной железы при экспериментальном диабете (ЭА), а также возможности коррекции обнаруженных нарушений с помощью гликоразмулина.

Материал и методы

Эксперименты проводили на 90 белых беспородных крысах-самцах с массой тела 180—200 г. Животных разделили на три группы: 1-я группа — интактная, 2-я — животные, которым однократно внутрибрюшинно вводили водный раствор стрептозотоцина в дозе 50 мг на 1 кг массы тела в 0,5 мл 0,9% раствора NaCl, и 3-я — стрептозотоциновый диабет + гликоразмулин (перорально в дозе 50 мг на 1 кг на массы тела) в течение 8 сут, начиная с 12 дня после введения стрептозотоцина и достижения заданного уровня гипергликемии.

Митохондрий печени и поджелудочной железы выделяли методом дифференциального центрифугирования [12, 13] через 12 дней после инъекции стрептозотоцина, когда уровень глюкозы в крови достигал 11 ммоль/л. Состав среды выделения митохондрий печени: 250 мМ сахарозы, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4; для выделения митохондрий поджелудочной железы использовали ту же среду, но добавляли бычий сывороточный альбумин 2 мг/г массы ткани. Митохондрии из обоих органов ресуспендировали в среде выделения без ЭДТА. Ca^{2+} -зависимое набухание митохондрий регистрировали по изменению светорассеяния суспензии митохондрий (0,5 мг белка /мл) при 540 нм [14].

Определение скорости дыхания митохондрий в различных метаболических состояниях и величин коэффициентов дыхательного контроля (ДК) и АДФ/О проводили по методу Чанса [15]. При расчете скоростей дыхания и параметров окислитель-

ного фосфорилирования содержание кислорода в 1 мл среды принимали равным 500 нг-атомам кислорода при 26 °С.

Уровень глюкозы в крови определяли глюкозо-оксидазным методом с помощью набора Glucose — enzymatic-colorimetric test («Cypress diagnostic», Бельгия). Содержание митохондриального белка определяли по Лоури в модификации Петерсона [16]. Для статистической обработки результатов использовали программу Origin 6.1. Величину $p < 0,05$ рассматривали как показатель достоверных различий.

Результаты и обсуждение

В условиях нашего эксперимента (инкубационная среда содержала Ca-ЭГТА буфер) набухание митохондрий можно рассматривать как результат открытого состояния МРТР, а подавление набухания — как закрытое, т.е. с помощью этой методики можно оценить состояние МРТР при ЭД и действии гликоразмулина. Внесение в инкубационную среду 10 мкМ Ca^{2+} приводило к набуханию митохондрий печени и поджелудочной железы крыс 1-й группы. При этом скорости набухания митохондрий печени и поджелудочной железы составили 0,32 $\Delta E_{540}/10$ мин и 0,31 $\Delta E_{540}/10$ мин соответственно.

В тех же условиях скорость набухания митохондрий, выделенных из печени крыс 2-й группы (стрептозотоцининдуцированный диабет), была равна 0,59 $\Delta E_{540}/10$ мин, что на 84,3% выше показателя контрольной группы. Скорость набухания митохондрий поджелудочной железы (2-я группа животных) составила 0,48 $\Delta E_{540}/10$ мин, что выше контроля на 54,8%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при стрептозотоцининдуцированном диабете МРТР печени и поджелудочной железы находятся в открытом состоянии.

Фармакотерапия гликоразмулином крыс со стрептозотоцининдуцированным диабетом приводила к ингибированию отмеченного набухания митохондрий печени и поджелудочной железы. Так, скорость набухания митохондрий, выделенных из печени крыс 3-й группы (ЭД + гликоразмулин), составила 0,46 $\Delta E_{540}/10$ мин, что на 40,5% меньше скорости набухания митохондрий печени крыс 2-й группы. Скорость набухания митохондрий поджелудочной железы крыс (3-я группа) была равна 0,38 $\Delta E_{540}/10$ мин, что на 32,2% меньше скорости набухания митохондрий поджелудочной железы крыс 2-й группы. Таким образом, применение комбинированного препарата гликоразмулина в условиях стрептозотоцининдуцированного диабета значительно ингибировало открытие митохондриальной поры (рис. 1).

В следующей серии опытов изучали дыхательную и фосфорилирующую активность митохондрий

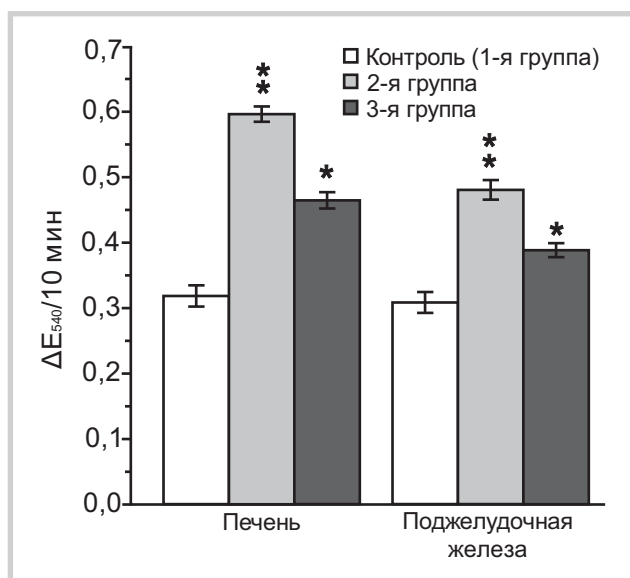


Рис. 1. Изменение набухания митохондрий печени и поджелудочной железы крыс в условиях стрептозотосиндуцированного диабета и при фармакотерапии гликоразмулином.

Среда инкубации (СИ): сахароза — 200 мМ, KH_2PO_4 — 1 мМ, сукцинат — 5 мМ, Ca^{2+} -ЭГТА-буфер — 20 мМ, Nernst — 20 мМ, трис- HCl — 20 мМ, ротенон — 2 мМ, олигомицин — 1 мкг/мл, pH — 7,2. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$; $n = 5$.

печени и поджелудочной железы крыс со стрептозотосиндуцированным диабетом и при воздействии гликоразмулина. При интоксикации стрептозотосином скорость дыхания митохондрий печени крыс в состоянии V_3 увеличивалась на 43,5% по сравнению с таковой митохондрий печени интактных животных (см. таблицу). Возрастала и скорость дыхания митохондрий в состоянии V_4 (на 65,6%). При этом по отношению к норме снижались коэффициенты ДК и АДФ/О на 14,8 и 27,9% соответственно. Полученные результаты указывают на активацию дыхания при окислении сукцината митохондриями печени крыс с ЭД в состояниях V_3 и V_4 . Аналогичные данные были получены при изучении действия гликоразмулина на дыхание и фосфорилирование

митохондрий поджелудочной железы. На фоне стрептозотосина скорость дыхания митохондрий поджелудочной железы в состоянии V_3 по сравнению с V_3 митохондрий интактной группы возрастала на 48,6%.

Корригирующее действие гликоразмулина в опытах с митохондриями поджелудочной железы выражалось в восстановлении состояния сопряжения: ДК оказался только на 4,0% ниже показателя в интактной группе, а эффективность фосфорилирования достигала возраста до 92,8% нормы (см. таблицу). При ЭД увеличивалась также скорость дыхания митохондрий поджелудочной железы в состоянии V_4 на 82,1% по сравнению с контролем, а коэффициенты ДК и АДФ/О снижались на 19,2 и 21,7% соответственно.

Результаты экспериментов указывают на разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях печени и поджелудочной железы при стрептозотосиндуцированном диабете; при этом развивается дефицит АТФ в тканях крыс и переход МРТР в открытое состояние, т.е. наблюдается пермеабиллизация митохондриальных мембран. Гликоразмулин уменьшает влияние стрептозотосинового диабета на функцию митохондрий.

Ранее было показано, что интоксикация стрептозотосином увеличивает скорость пероксидации липидов в митохондриях печени, вызывает гиперкомпенсированный низкоэнергетический сдвиг с повышением скоростей дыхания во всех метаболических состояниях и разобщением окислительного фосфорилирования [17]. Терапия янтарем-антитоксом нормализовала процессы сукцинат- и НАД-зависимой энергопродукции в митохондриях с восстановлением сопряжения окисления и фосфорилирования; уменьшалась также липидпероксидация в печени [17].

В наших экспериментах гликоразмулин влиял на систему энергообеспечения клеток подобно янтарю-антитоксу. Известно, что входящие в состав гликоразмулина компоненты — мумие и экстракт

Влияние гликоразмулина на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени и поджелудочной железы крыс со стрептозотосиновым диабетом

Условия эксперимента	Скорость дыхания, нг·атом O ₂ /мин ·мг белка		ДК	АДФ/О
	V ₃	V ₄		
Митохондрии печени:				
контроль (интактная группа)	85±2,4	32±2,9	2,7±0,28	1,86±0,07
стрептозотоциновый диабет	122±4,6***	53±3,8**	2,3±0,29	1,34±0,07***
стрептозотоциновый диабет + гликоразмулин	89±5,4**	42±3,6	2,1±0,19	1,72±0,06**
Митохондрии поджелудочной железы:				
контроль (интактная группа)	74±3,2	28±2,7	2,6±0,18	1,66±0,09
стрептозотоциновый диабет	110±3,7*	51±4,1*	2,1±0,15*	1,30±0,03**
стрептозотоциновый диабет + гликоразмулин	80±4,1***	32±2,0**	2,5±0,15	1,54±0,03***

Примечание. СИ: сахароза — 100 мМ, KCl — 75 мМ, KH_2PO_4 — 2,5 мМ, трис- HCl — 10 мМ, сукцинат — 10 мМ, pH-7,4; концентрация белка митохондрий 3,5 мг/мл. * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$; $n = 5$.

родиолы обладают антиоксидантными свойствами [18, 19]. В связи с этим нами было изучено действие различных концентраций гликоразмулина на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) митохондриальных мембран в системе Fe^{2+} +аскорбат *in vitro*. Внесение в инкубационную среду Fe^{2+} +аскорбат индуцирует ПОЛ, в результате чего нарушается барьерная функция митохондриальных мембран и органеллы резко набухают по сравнению с контролем (рис. 2).

При внесении в инкубационную среду гликоразмулина, начиная с концентрации 1 мкг/мл, наблюдается ингибирование набухания митохондрий, что свидетельствует об ингибировании процесса ПОЛ в мембранах и переходе МРТР в закрытое состояние. Влияние гликоразмулина на ПОЛ в мембранах митохондрий зависит от концентрации препарата, т.е. с ее увеличением в СИ процент ингибирования возрастает. Полное ингибирование набухания митохондрий печени, т.е. процесса ПОЛ и возврат МРТР в закрытое состояние, отмечалось при концентрации гликоразмулина 14 мкг/мл. Концентрация, вызывающая полумаксимальное ингибирование процесса ПОЛ (IC_{50}), для гликоразмулина составила $3,1 \pm 0,2$ мкг/мл. Аналогичные результаты, свидетельствующие об антиоксидантных свойствах гликоразмулина, были получены и в экспериментах *in vitro* с митохондриями поджелудочной железы крысы (данные не приведены).

По-видимому, генерация активных форм кислорода под действием стрептозотоцина ускоряет процессы ПОЛ в мембранах митохондрий, в результате чего МРТР переходит в открытое состояние, дыхание и окислительное фосфорилирование разобщаются. Гликоразмулин, реализуя свои антиоксидантные свойства, препятствует образованию перекисей липидов, стабилизирует мембраны митохондрий и таким образом восстанавливает их энергосинтезирующие функции.

Выводы

1. В условиях стрептозотининдуцированного диабета МРТР печени и поджелудочной железы переходит в открытое состояние, что может являться одним из механизмов повреждения функции митохондрий, а также клеток при ЭД.

2. При стрептозотининдуцированном диабете наблюдается увеличение скоростей дыхания в состояниях V_3 и V_4 , приводящее к разобщению окислительного фосфорилирования в митохондриях печени и поджелудочной железы и дефициту АТФ в тканях крыс.

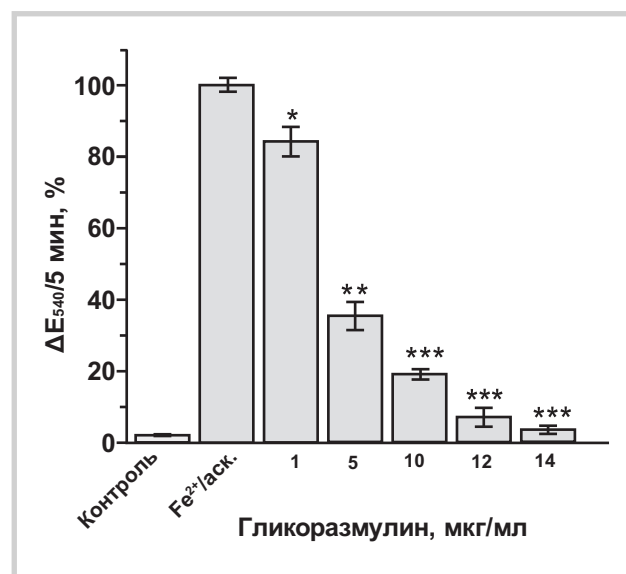


Рис. 2. Влияние гликоразмулина на Fe^{2+} +аскорбатиндуцированное набухание митохондрий печени крыс.

СИ: KCl — 125 мМ, трис-НСI — 10 мМ, pH — 7,4; концентрации: FeSO_4 — 10 мМ, аскорбата — 600 мМ; белок митохондрий 0,5 мг/мл;

* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$; $n = 5$.

3. Гипогликемическое средство гликоразмулин (препарат на основе мумие и экстракта растения родиолы *Rhodiola Semenovii* A.) эффективно корректирует нарушения функций митохондрий печени и поджелудочной железы, вызванные стрептозотоцином.

4. Гликоразмулин эффективно ингибирует индуцированное системой Fe^{2+} +аскорбат набухание митохондрий с IC_{50} $3,1 \pm 0,2$ мкг/мл, что свидетельствует о наличии у исследуемого препарата антиоксидантных свойств.

Участие авторов:

Концепция и дизайн исследования — М.И. Асра-ров

Сбор и обработка материала — М.К. Позиллов, Н.А. Эргашев, М.М. Рахматуллаева

Статистическая обработка данных — М.К. Позиллов

Написание текста — М.К. Позиллов, Н.А. Эргашев

Редактирование — М.И. Асра-ров

Конфликт интересов отсутствует.

Работа выполнена в рамках гранта фундаментальных исследований АН РУз №ФА-Ф5-Т084.

Авторы выражают благодарность ст.н.с. ИБОХ им. акад. А.С. Садыкова АН РУз, к.б.н. Шкиневу А.В. за ценные советы, оказавшие существенную помощь при написании настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haworth RA, Hunter DR. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. *Arch Biochem Biophys*. 1979;195(2):460-7. doi: 10.1016/0003-9861(79)90372-2
2. Szewczyk A. Mitochondria as a Pharmacological Target. *Pharmacol Rev*. 2002;54(1):101-27. doi: 10.1124/pr.54.1.101
3. Жилук В.И., Мамчур В.И., Павлов С.В., Бухтиярова Н.В. Влияние средств с ноотропными и нейропротекторными свойствами на процессы энергетического метаболизма и проявления митохондриальной дисфункции в нейронах головного мозга крыс с аллоксановым диабетом. // Проблемы эндокринной патологии. 2010;(3):69-74. [Zhilyuk VI, Mamchur VI, Pavlov SV, Bukhtiyarova NV. Vliyanie sredstv s nootropnymi i neyroprotekturnymi svoystvami na protsessy energeticheskogo metabolizma i proyavleniya mitokhondrial'noy disfunktsii v neyronakh golovnoy mozga krysa s alloxanovym diabetom. *Problems of Endocrine Pathology*. 2010;(3):69-74.]
4. Szabadkai G, Duchen MR. Mitochondria mediated cell death in diabetes. *Apoptosis*. 2009;14(12):1405-23. doi: 10.1007/s10495-009-0363-5
5. Victor VM, Rocha M, Banuls C, Bellod L, Hernandez-Mijares A. Mitochondrial Dysfunction and Targeted Drugs: A Focus on Diabetes. *Curr Pharm Des*. 2011;17(20):1986-2001. doi: 10.2174/138161211796904722
6. Скулачев В.П. Законы биоэнергетики. // Соросовский образовательный журнал. 1997;(1):9-14. [Skulachev VP. Zakony bioenergetiki. *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal*. 1997;(1):9-14.]
7. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The Mitochondrial Death/Life Regulator in Apoptosis and Necrosis. *Annu Rev Physiol*. 1998;60(1):619-42. doi: 10.1146/annurev.physiol.60.1.619
8. Maechler P, Li N, Casimir M, Vetterli L, Frigerio F, Brun T. Role of Mitochondria in β -cell Function and Dysfunction. 2010;654:193-216. doi: 10.1007/978-90-481-3271-3_9
9. Рахматуллаева М.М., Аминов С.Н. Элементный состав гипогликемического средства «ГликоРазмулин». // Фармацевтический журнал. 2005;(3):42. [Rakhmatullaeva MM, Aminov SN. Elementnyy sostav gipoglikemicheskogo sredstva «Glikorazmulin». *Farmatsevtichskiy zhurnal*. 2005;(3):42]
10. Файзиева З.Т. Влияние гликоРазмулина на биохимические показатели крови при аллоксановом диабете. // Проблемы эндокринологии. 2009;55(5):26-27. [Faizieva ZT. Effect of glycorazmulin on blood biochemical characteristics in alloxan diabetes. *Problemy Endokrinologii* 2009;55(5):26-27.] doi: 10.14341/probl200955526-27
11. Арипова Т.У., Аминов С.Н., Батырбеков А.А., и др. Влияние гликоРазмулина и его компонентов на иммунную систему в эксперименте. // Журнал теоретической и клинической медицины 2007;(2):6-8. [Aripova TU, Aminov SN, Bатыrbekov AA, et al. Vliyanie glikorazmulina i ego komponentov na immunnuyu sistemu v eksperimente. *Zhurnal teoreticheskoy i klinicheskoy meditsiny* 2007;(2):6-8.]
12. Schneider WC, Hageboom GH, Pallade GE. Cytochemical studies of mammalian tissues; isolation of intact mitochondria from rat liver; some biochemical properties of mitochondria and submicroscopic particulate material. *J. Biol. Chem*. 1948;172(2):619-635.
13. Алматов К.Т., Ахмеров Р.Н., Аулов Д.М., Рахимов М.М. Выделение митохондрий из поджелудочной железы. // Узбекский биологический журнал. 1977;(3):30-32. [Almatov KT, Akhmerov RN, Aulov DM, Rakhimov MM. Vydelenie mitokhondriy iz podzheludochnoy zhelezy. *Uzbekskiy biologicheskiy zhurnal*. 1977;(3):30-32.]
14. He L. Heat Shock Suppresses the Permeability Transition in Rat Liver Mitochondria. *J Biol Chem*. 2003;278(19):16755-60. doi: 10.1074/jbc.M300153200
15. Митохондрии в патологии. / Под ред. М.Н.Кондрашовой, Ю.Г.Каминского, Е.И.Маевского. — Пушино; 2001. 156с. [Mitochondria in pathology. Ed by. M.N.Kondrashova, Yu.G.Kaminskiy, E.I.Maevskiy. Pushchino; 2001. 156p.]
16. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable. *Anal Biochem*. 1977;83(2):346-56. doi: 10.1016/0003-2697(77)90043-4
17. Эскина К.А., Васильев К.Ю. Влияние янтаря-антиоксиданта и силимарина на окислительное фосфорилирование и перекисное окисление липидов в печени крыс при экспериментальном сахарном диабете. // Бюллетень сибирской медицины. 2006;5(2):101-106. [Eskina KA, Vasil'ev KYu. Vliyanie yantarya-antitoksa i silimarina na oksiditel'noe fosforilirovanie i perekisnoe okislenie lipidov v pecheni krysa pri eksperimental'nom sakharnom diabete. *Biulleten' Sibirskoi Meditsiny*. 2006;5(2):101-106.]
18. Калдыбаева АО, Абдусаматов АА. Влияние корня солодки, цветков бессмертника и мумиё на показатели перекисного окисления липидов при хроническом токсическом гепатите. // Медицинский журнал Узбекистана. 2010;(3):99-101. [Kaldybaeva AO, Abdusamatov AA. Vliyanie kornya solodki, tsvetkov bessmertnika i mumie na pokazateli perekisnogo okisleniya lipidov pri khronicheskom toksicheskoy gepatite. *Meditsinskiy zhurnal Uzbekistana*. 2010;(3):99-101.]
19. Симонова Н.В., Доровских В.А., Штарберг М.А. Влияние адаптогенов растительного происхождения на интенсивность процессов перекисного окисления липидов биомембран в условиях ультрафиолетового облучения. // Дальневосточный медицинский журнал. 2010;(2):112-115. [Simonova NV, Dorovskikh VA, Shtarberg MA. The influence of vegetal adaptogens on the intensity of lipid peroxidation processes of biomembranes during ultraviolet irradiation. *Dal'nevostochnyy meditsinskiy zhurnal*. 2010;(2):112-115.]