

Молекулярно-клеточные механизмы стимулирующего действия низкоинтенсивного лазерного (когерентного) и некогерентного (светодиодного) излучений на процесс заживления ран

тема диссертации и автореферата по ВАК РФ 03.00.02, кандидат медицинских наук Шураева, Наталия Юрьевна

- Шураева, Наталия Юрьевна
- кандидат медицинских наук
- 2005

- Специальность ВАК РФ 03.00.02

ОГЛАВЛЕНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

кандидат медицинских наук Шураева, Наталия Юрьевна

Введение

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Применение низкоинтенсивных лазерных и светодиодных источников в 10 медицине

1.2 Гипотезы о механизмах биологического действия 15 низкоинтенсивного лазерного излучения

1.3 Влияние низкоинтенсивного лазерного и светодиодного излучения на 26 процессы в клетках и тканях

1.4 3 аживление ран и влияние лазерного и светодиодного излучения 33 на раневой процесс

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Материалы

2.2 Препаративные методы

2.2.1. Животные

2.2.2. Экспериментальная модель полнослойной плоскостной раны

- 2.2.3. Получение раневого экссудата и выделение полиморфноядерных 39 лейкоцитов раневого экссудата
- 2.2.4. Выделение полиморфноядерных лейкоцитов крови человека
- 2.2.5. Выделение клеток перитонеального экссудата крыс
- 2.2.6. Культивирование перитонеальных макрофагов и клеток раневого экссудата 42 для определения ионов нитрита (ТМОг")
- 2.2.7. Получение общей фракции фосфолипидов из желтков куриных яиц
- 2.2.8. Приготовление многослойных фосфолипидных липосом
- 2.3 Биофизические методы исследования и модельные системы 44
 - 2.3.1. Измерение люминол-зависимой хемилюминесценции полиморфноядерных 47 лейкоцитов крови, клеток перитонеального экссудата крыс, клеток раневого экссудата крыс
 - 2.3.2. Определение содержания ионов нитрита (NO₂"") по методу Грисса
 - 2.3.3. Определение активности супероксиддисмутазы в клетках перитонеального 48 экссудата
 - 2.3.4. Определение накопления ТБК-активных продуктов в раневом экссудате 49 крыс
 - 2.3.5. Измерение антиоксидантной активности раневого экссудата в модельной системе водно-гомогенной модельной системы на основе азосоединения АДБА в присутствии раневого экссудата
 - 2.3.6. Измерение антиоксидантной активности раневого экссудата в модельной 50 системе окисления суспензии фосфолипидных липосом, индуцированного ионами двухвалентного железа
- 2.4 Изучение морфологии и скорости заживления ран 51
 - 2.4.1. Планиметрические исследования
 - 2.4.2. Фотографирование ран
 - 2.4.3. Патоморфологические исследования
- 2.5 Обработка клеток и экспериментальных ран лазером и светодиодом
 - 2.5.1. Облучение суспензии клеток для определения ЛХЛ и СОД
 - 2.5.2. Облучение перитонеальных макрофагов для определения ионов нитрита 52 (ИОг")
 - 2.5.3. Процедура облучения ран
- 2.6 Статистическая обработка результатов

- 3.1. Сравнительное исследование влияния красного когерентного лазерного) и некогерентного (светодиодного) излучения на свободнорадикальные механизмы активации фагоцитов
- 3.1.1. Исследование особенностей влияния светодиодного и лазерного излучения в красном диапазоне спектра на функциональную активность лейкоцитов периферической крови человека
- 3.1.2. Изучение механизмов действия ГНЛ и КСД на продукцию оксида азота 58 перитонеальными макрофагами крыс
- 3.1.3. Изучение механизмов действия ГНЛ и КСД на активность 60 супероксиддисмутазы перитонеальных макрофагов крыс
- 3.2. Сравнительное исследование влияния ГНЛ и КСД на 62 параметры заживления модельных ран у крыс
- 3.2.1. Определение влияния облучения ГНЛ и КСД на скорость заживления и 63 морфологию экспериментальных ран у крыс
- 3.2.2. Изучение действия ГНЛ и КСД на функциональную активность 68 фагоцитов в динамике заживления модельных ран у крыс
- 3.2.3. Исследование действия лазерного и светодиодного излучений 71 на уровень продукции оксида азота синтетическими лейкоцитами экссудата в динамике заживления ран
- 3.2.4. Изучение влияния лазерного и светодиодного излучений на уровень активности СОД в динамике заживления модельных ран у крыс
- 3.2.5. Изучение действия ГНЛ и КСД на антиоксидантную активность раневого экссудата и уровень перекисного окисления липидов в процессе заживления модельных ран у крыс

ВВЕДЕНИЕ ДИССЕРТАЦИИ (ЧАСТЬ АВТОРЕФЕРАТА)

на тему «Молекулярно-клеточные механизмы стимулирующего действия низкоинтенсивного лазерного (когерентного) и некогерентного (светодиодного) излучений на процесс заживления ран»

Актуальность исследования.

В настоящее время в клинической практике весьма успешно применяется низкоинтенсивное лазерное излучение. Наряду с этим постепенно развивается применение и некогерентных источников для лечения различных заболеваний [63].

Предполагается, что специфичностью действия лазерного излучения на биообъект в разных диапазонах спектра являются: пространственная и временная когерентность, поляризуемость и высокая степень монохроматичности. Но к настоящему времени известно, что по мере проникновения вглубь биологической ткани когерентность и поляризация лазерного излучения сохраняется только на глубине 200-500 мкм, а далее распространяется некогерентный, монохроматический свет [57]. Например, в работе Синякова В.С. показано, что при прохождении через образцы биологической ткани (кожа, кость, скелетная мышца, печень, мозг крысы) толщиной 200 мкм лазерный луч (длина волны 630 нм) не сохраняет когерентности [76]. Следовательно,

можно предположить, что проникающее вглубь организма излучения от лазерного источника действует наподобие обычного некогерентного света в соответствующей спектральной области. По мнению Данилова Н.К. и Малова А.Н. [24] сложное и оптически анизотропное строение биологических объектов, имеющих жидкокристаллическую структуру и содержащих связанную воду, обуславливает широкое многообразие оптических явлений при распространении когерентного излучения в них. Общеизвестно, что биологические ткани в организме, за исключением прозрачных тканей глаза, ведет себя в пределах глубины проникновения НИЛИ как сильно рассеивающие среды. Уже на небольшой глубине в одну точку приходит большое число рассеянных волн и при суперпозиции не наблюдается привычной для интерференции когерентных волн упорядоченной картины.

Помимо всего вышеперечисленного, вопрос о роли когерентности излучения, используемого в терапевтических целях, давно беспокоит исследователей, изучающих и механизмы действия лазерного света [112, 126, 127, 136, 179, 180, 215]. Так, например, авторы работ [196, 197] полагают, что когерентность необходима для того, что бы лазерное излучение эффективно воздействовало на биологические объекты. Действительно, по данным работы Reddy G.K.; [196] обнаруженные автором отличия в эффектах красного и инфракрасного лазерного света на заживление ран зависели не только от длины волны лазера, но и от когерентности излучения. В то же время, в работе [224] было показано, что пролиферацию фибробластов можно регулировать с помощью некогерентного излучения светодиодов. К сожалению, в этой работе [224] лазерное излучение использовали только в инфракрасной области спектра и, кроме того, ограничились только гистологическим исследованием. В исследовании [231] также был показан стимулирующий эффект некогерентного света на заживление ран, однако опять же излучение было в инфракрасном диапазоне. В работе [136] было показано положительное влияние красного лазерного излучения на заживление ран, в то время как излучение диодов действия не оказывало.

Кроме того, известно, что в процессе заживления ран активное участие принимают клетки лейкоцитарного звена [230]. Однако большинство работ посвящено действию когерентного лазерного излучения на лейкоциты [117, 118, 121], в то время как эффектам некогерентного света вообще не уделено должного внимания.

В связи с изложенным выше, в настоящей работе, возникла необходимость провести сравнительное исследование действия когерентного (He-Ne лазер) и некогерентного (светодиод) излучений на лейкоциты и на процессы заживления кожных ран у крыс. И на основании полученных данных выяснить эффективность действия некогерентного излучения на эти биологические объекты.

Цель и задачи исследования.

Целью настоящей работы являлось изучение некоторых звеньев молекулярно-клеточных механизмов стимулирующего воздействия лазерного и светодиодного излучений на лейкоциты и на процессы заживления ран. Задачи исследования:

1. Исследовать особенности влияния светодиодного и лазерного излучения в красном диапазоне спектра на функциональную активность лейкоцитов периферической крови человека, продукцию оксида азота и активность супероксиддисмутазы макрофагов *in vitro*.
2. Изучить особенности влияния низкоинтенсивного оптического излучения в красном диапазоне спектра на функциональную активность лейкоцитов в динамике заживления модельных ран у крыс.
3. Исследовать влияние лазерного и светодиодного излучений в красном диапазоне спектра на уровень продукции оксида азота лейкоцитами эксудата в динамике заживления ран.

4. Изучить влияние лазерного и светодиодного излучений в красном диапазоне спектра на уровень активности фермента-антиоксиданта СОД в динамике заживления модельных ран у крыс.
5. Изучить влияние лазерного и светодиодного излучений в красном диапазоне спектра на уровень свободнорадикальных параметров экссудата, таких как антиоксидантную активность и уровень перекисного окисления липидов в процессе заживления модельных ран у крыс.
6. Определить влияние облучения ГНЛ и КСД на скорость заживления и морфологию экспериментальных ран у крыс.

Научная новизна. В лабораторных условиях на лейкоцитах, перитонеальных макрофагах крыс и модельных ранах у крыс изучена роль и вклад свободнорадикальных, молекулярно-клеточных и иммунохимических механизмов на процессы заживления ран при лечении их с применением низкоинтенсивного лазерного и светодиодного излучений.

Установлено, что оптимальной стимулирующей дозой для лазерного и некогерентного излучения является 1,5 Дж/см².

Светодиодное излучение оказывают такое же стимулирующее действие на фагоцитарную активность лейкоцитов, продукцию оксида азота, активность супероксиддисмутазы перитонеальными макрофагами крыс, на скорость заживления модельных ран у экспериментальных животных как и когерентный лазерный свет.

Практическая значимость. В результате проведённой работы было установлено, что облучение экспериментальных ран у крыс лазерным и светодиодным излучением позволяло ускорить заживление ран по сравнению с контрольной группой животных в 1,4 раза. Результаты и подобранные оптимальные дозы облучения, полученные в данном исследовании, позволяют разработать схемы комплексной терапии применения светодиодной аппаратуры и традиционных методов лечения. Что в свою очередь позволит сократить сроки очищения ран от гноя и некротических масс и соответственно ускорить заживление ран у больных людей в клинике и как следствие, уменьшить время пребывания пациентов в стационаре, что имеет важное медико-социальное и экономическое значение.

Все обнаруженные эффекты светодиодного и лазерного излучений свидетельствуют о том, что такие специфические свойства когерентного лазерного излучения как когерентность, поляризуемость и высокая степень монохроматичности для формирования клеточных ответов не обязательны. Помимо этого, светодиодные медицинские приборы обладают рядом преимуществ и значительно дешевле лазерных аналогов, что может быть поводом для более широкого применения их в клинической практике.

Апробация диссертации. Материалы диссертации были представлены на заседании кафедры медицинской биофизики с курсом лабораторной диагностики 27 мая 2005 года, а также на Международной конференции «Лазерные и информационные технологии в медицине 21 века» (Санкт-Петербург 2001г.), на 3-ем съезде фотобиологов России (Воронеж 2001 г.), на конференции «Актуальные аспекты лазерной медицины» (Москва-Калуга 2002г.), на международной конференции «Системные проблемы качества, матем. моделиров., информ., электронных и лазерных технологий» (Сочи 2001г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка цитируемой

литературы, включающего 239 источника, из них 147 иностранных. Работа изложена на 104 страницах печатного текста. Иллюстративный материал представлен 32 рисунком и 5-ю таблицами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

по теме «Биофизика», Шураева, Наталия Юрьевна

ВЫВОДЫ

Сравнительное исследование действия излучения He-He лазера ($\lambda = 630,8$ нм) и светодиода У-322Б ($\lambda = 630$ нм) на экспериментальные кожные раны у крыс показало следующее:

1. При ежедневном облучении ран в течение трех дней, начиная со второго дня после нанесения раны, как лазером, так и светодиодом наблюдается изменение образования активных форм кислорода фагоцитами раневого экссудата. Используя метод люминол-зависимой хемилюминесценции, мы обнаружили, что максимальное увеличение продукции активных форм кислорода в 2-4 раза наблюдается на четвертый день при ежедневной дозе 1,5 Дж/см² как при облучении лазером, так и светодиодом. При дозе 4,4 Дж/см² наблюдается ингибирование активности клеток в обоих случаях.

2. Использование метода Грисса для измерения образования нитрит-ионов фагоцитами раневого экссудата показало, что наибольшая концентрация нитрита наблюдается на четвертый день после нанесения раны и соответствует ежедневной дозе облучения 1,5 Дж/см² как при облучении лазером, так и при облучении светодиодом. Дальнейшее увеличение дозы облучения до 4,4 Дж/см² приводит к снижению концентрации исследуемых ионов, независимо от источника облучения.

3. Аналогичные дозовые зависимости были получены при измерении активности супероксиддисмутазы раневого экссудата крыс. Оказалось, что независимо от источника излучения (лазер или светодиод) максимальное значение активности соответствует одинаковой дозе

1,5 Дж/см²) и наблюдался на 4 день после нанесения раны. Наибольшее увеличение активности супероксиддисмутазы составило 6,5 раз для лазерного и 7,3 раз для светодиодного излучений.

4. Результаты гистологического исследования ран, подверженных облучению как лазером, так и светодиодом на протяжении одиннадцати дней после нанесения раны, при ежедневной дозе 1,5 Дж/см², обнаружили интенсификацию процессов заживления. Сравнительный гистологический анализ динамики заживления ран показал, что облучение лазером или светодиодом ускоряет переход воспалительной фазы раневого процесса в репаративную (пролиферативную) фазу, а затем в фазу рубцевания.

5. Изучение действия света лазера и светодиода на процесс перекисного окисления липидов (ТБК-активные продукты) и уровень антиоксидантов (хемилюминесцентные системы липосом или АДБА) в раневом экссудате обнаружило ингибирование процесса окисления и увеличение общего количества антиоксидантов. Действительно, измерение ТБК-активных продуктов и латентного периода хемилюминесценции, при облучении экспериментальных ран у крыс ежедневной дозой 1,5 Дж/см² в течение четырех дней после нанесения раны, приводило к снижению количества продуктов перекисного окисления липидов и возрастанию антиокислительной активности раневого экссудата крыс как после облучения лазером, так и светодиодом. Так, в контрольной группе концентрация ТБК-активных продуктов в раневом экссудате к четвертому дню возросла

примерно в $3 \pm 0,4$ раза, а после облучения лазером или светодиодом увеличение уровня продуктов окисления липидов составляло к этому времени $1,8 \pm 0,4$ раза (лазер) или $1,5 \pm 0,3$ (светодиод).

6. Полученные нами результаты влияния лазерного и светодиодного света на функции фагоцитов *in vitro* (индукция синтеза iNOS, СОД, выработка АФК), а также на функциональную активность фагоцитов, процессы перекисного окисления липидов и на др. в раневом экссудате у крыс позволяют предположить, что такие свойства лазерного излучения как когерентность, поляризованность и монохроматичность не играют важной роли в реализации его физиологического действия.

Работа посвящается светлой памяти профессора кафедры биофизики РГМУ д.б.н. Клебанова Геннадия

Иосифовича, благодаря пионерским работам которого сделан большой вклад в понимание молекулярно-клеточных механизмов действия низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ). Г.И. Клебановым и соавторами убедительно показано, что НИЛИ оказывает стимулирующее действие на фагоциты, приводя к коренной перестройке клеточного метаболизма. Данная работа является продолжением исследований профессора Г.И. Клебанова. благодарности

Выражаю благодарность проф. д.б.н. А.Н. Осипову, к.лин. Т.В. Чичук, акад. РАМН Ю.А. Владимирову к.б.н, О.Б. Любичкому, к.т.н. Голяеву Ю.Д., к.м.н. Долгиной Е. А. и другим коллегам.

антиокислительной активности экссудата, продемонстрированным в двух модельных системах. При этом качественно когерентное излучение лазера и некогерентное излучение светодиода приводили к одинаковым эффектам. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе и литературе обсуждалась концепция свободнорадикального механизма активации в лейкоцитах синтеза ряда белков [49]. Напомним коротко её положения. Первичной 4 стадией запуска синтеза белков в лейкоцитах является внутриклеточное образование небольшого (микромоли) количества АФК. АФК индуцируют переход транскрипционного NF-κB - фактора в активное состояние. При этом NF-κB диффундируя из цитозоля в ядро, активирует ген, запускающий транскрипцию с образованием соответствующих т-РНК, которые затем выходят в цитоплазму и на рибосомах запускается синтез соответствующих белков, среди которых важное значение в контексте рассматриваемой проблемы имеет наработка *de novo* индуцибельной NO-синтазы, супероксиддисумутазы, различных цитокинов. Следовательно, можно предположить, что образование некоторого количества АФК идёт за счёт инициации фотосенсибилизированных СРР с участием эндогенных ФС.

Полученные результаты *in vitro* свидетельствуют о том, что пролонгированная активация МФ (индукция синтеза iNOS, СОД) и кратковременный прайминг лейкоцитов (выработка АФК) периферической крови, вызванные облучением ГНЛ и красным светодиодом, определяются в значительной степени инициацией фотосенсибилизированных свободнорадикальных реакций. Причём, как было показано в данной работе, для активации которых такое специфическое свойство лазерного излучения как когерентность по-видимому не обязательно.

Также в работе были получены данные влияния облучения ран ГНЛ и КСД на изменение параметров свободнорадикального статуса экссудата ран (активность фагоцитов в экссудате, антиокислительную активность экссудата и окисляемость липидного материала экссудата), а также на активность СОД и продукцию оксида азота. Динамика этих показателей в процессе регулярного облучения ран развивается в направлении положительного развития процесса заживления ран. Об этом же свидетельствуют данные измерения планиметрии ран, фотографии резаных ран и данные гистологического исследования, подвергнутых световому воздействию. Следует ещё отметить, что

оптимальная экспериментальная доза облучения, по данным полученным в настоящей работе, при которой достигается наилучший, позволяющий стимулировать заживление ран эффект это - 1,5 Дж/см².

И, возвращаясь к концепции свободнорадикального механизма, можно заключить, что для формирования процесса фотосенсибилизированного лечения ран не требуется привлечения особых свойств лазерного излучения: когерентности, поляризуемости и монохроматичности, поскольку при облучении поверхности резаных ран у крыс светодиодным, некогерентным излучением сам процесс заживления и свободнорадикальные и иммунохимические реакции, участвующие в заживлении активируются совершенно одинаковым образом по отношению к использованным дозам лазерного облучения.