

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ, ГИСТОХИМИЧЕСКИЕ И БИОФИЗИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ ПРИМЕНЕНИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Лазерное излучение, воздействуя на биологически активные точки, симпатические и трофические компоненты нервной системы, активизирует белоксинтезирующие процессы в коже, повышает функциональную активность нервов, клеток циркулирующей крови и элементов сосудистой стенки, увеличивает проницаемость сосудов и способствует трансмиграции клеток крови в основу кожи. Следствием изменения обменных процессов является изменение биофизических показателей кожи.

Интенсивное развитие лазерной техники обуславливает стремление к более широкому применению низкоэнергетической фотонной терапии. Интерес к этой области вызван рядом проблем, связанных с ростом заболеваемости человека и животных, а также удорожанием фармакологических средств. Кроме того, использование антибиотиков и гормональных препаратов, обладающих кумулятивными свойствами, способствует ухудшению качества продукции животноводства и делает ее небезопасной для использования в пищу людям. Актуальным является изучение воздействия лазерного излучения на организм в связи с отсутствием побочного действия, безболезненностью физиотерапевтических процедур, хорошей сочетаемостью с фармакологическими средствами, а также высокой экономической эффективностью, что является весьма важным при применении в животноводстве.

В отличие от обычного света лазерный свет когерентный, поляризованный и в высшей степени монохроматический. Длина волны луча гелий-неонового лазера располагается в красной части спектра. Энергия этой части спектра интенсивно поглощается биологическими структурами. Красный свет оказывает резонансное воздействие на элементы нервной системы, что выражается в возбуждении электронных процессов в цитоплазме клеток и мембранном аппарате ее органоидов [11].

Большая спектральная плотность луча лазера создает возможность получения чрезвычайно высокой концентрации фотонов на единицу площади, что может привести к химическому превращению молекул [15]. Взаимодействие фотонов лазерного излучения с биомолекулами реализуется чаще всего на клеточных мембранах, что приводит к изменению их свойств [23] и сопровождается усилением продукции провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [7, 18]. Лазероиндуцированные комплексы цитокинов способствуют усилению нейрососудистой трофики тканей [15], усилению биосинтетических процессов в клетках коры головного мозга и тимуса [6].

Вопрос о характере и степени общебиологического воздействия нетеплового излучения малой мощности на организм в целом обсуждается на уровне гипотез. Очень мало сведений о терапевтических возможностях воздействия лазерного излучения на кожу – орган наиболее доступный для применения оптических квантовых генераторов. При этом нужно учитывать, что кожа обладает обширным рецепторным полем, посредством которого осуществляется ее связь с различными органами организма.

Фотоны лазерного излучения за счет фотопроводимости белковых структур могут проникать через кожу в глубоко расположенные ткани, действуя на организм в целом. С другой стороны, в последние годы получены сведения, дополняющие представления об участии кожи в функционировании иммунной системы [24, 25]. Авторы с использованием иммуноцитохимического метода представили убедительные сведения, что базальные кератиноциты кожи обладают способностью вырабатывать тимусные гормональные факторы. Они полагают, что ретикулоэпителиальные элементы тимуса и многослойный эпителий кожи появляются в результате дивергентного развития из общего источника-эктодермы, в результате чего в них сохраняются некоторые преформированные гистогенетические признаки. Одним из их общих признаков является способность секретировать полипептид тималин, обеспечивающий экстратимическую дифференцировку Т-лимфоцитов.

Изучение функциональных возможностей эпидермальных клеток Лангерганса показало, что они являются антигенпрезентирующими клетками. Цитокины, продуцируемые клетками Лангерганса, покидают кожу и активизируют Т-клетки в лимфоидных органах. Помимо клеток Лангерганса кожа включает лимфоциты, кератиноциты, дендритные и тучные клетки, эозинофилы, которые через продукты их секреции могут регулировать функции иммунных клеток или сами участвовать в иммунном ответе [16].

Одним из показателей энергетического обмена в тканях служит сукцинатдегидрогеназа (СДГ). Она является универсальной составной частью клеток животного, локализуется исключительно в митохондриях и прочно связана с их мембранами [1]. Физиологическая роль СДГ как члена трикарбонового цикла заключается в ее участии в конечном окислении углеводов, транспорте электронов и окислительном фосфорилировании в митохондриях [2].

Цель исследования заключалась в изучении гистохимических, морфологических и биофизических изменений в коже под влиянием излучения гелий-неонового лазера.

Материал и методы

Опыты проведены на 28 кроликах и 4 овцах. Кролики были разделены на 7 групп. Одна группа служила контролем. Область облучения у кроликов захватывала биологически активные точки (БАТ) и проецируемые на них пути прохождения трофических и симпатических компонентов нервной системы через звездчатые узлы. Длина волны лазерного излучения, полученного в генераторе ЛГ-75, составляла 632 нм, сила тока 26 мА, мощность светового потока 20-40 мВт, плотность энергии 18-20 Дж/см² с экспозицией облучения 3 минуты с каждой стороны. Объект исследования помещали на расстоянии 30 см от источника света.

Кусочки кожи для гистохимического и электронно-микроскопического методов исследования брали из дорсальной, боковой и вентральной областей шеи на уровне четвертого сегмента через 30 минут, 2 часа и 1, 3, 5, 7 суток после облучения. Активность СДГ определяли на криостатных срезах по методу Нахласа [3]. Метод выявления активности СДГ основан на восстановлении тетранитросинего тетразолия в срезах в присутствии сукцината натрия в течение 45 минут. Контролем служили срезы, не содержащие субстрат. Затем срезы обезвоживали и получали гистологические препараты, которые фотографировали на микратную пленку М-300. При этом с каждого препарата получали 4-5 снимков. Интенсивность окраски (концентрации зерен синего формазана) определяли на фотоэлектрическом фотометре ИФО-451, в котором источник света формирует световое пятно. Оно попадает на исследуемый объект, в частности на фотопленку, а затем через нейтральный фильтр на фотокатод ФЭУ-86. Величина светового потока, падающего на фотокатод, изменяется пропорционально прозрачности кадров пленки, через которую проходит световой луч. Фотокатод преобразует модулированное пленкой световое

излучение в электрический сигнал, амплитуда которого измеряется с помощью универсального цифрового вольтметра.

Для электронно-микроскопического метода исследования кусочки кожи фиксировали в 2% растворе глутарового альдегида на фосфатном буфере Миллонига, постфиксацию проводили в 2% четырехоксида осмия на том же буфере. После обезвоживания кусочки заливали в аралдит. Ультратонкие срезы окрашивали цитратом свинца по методу Рейнольдса. Препараты фотографировали на фотопластины под электронным микроскопом «Tesla BS 500».

Изучение электрической активности и импеданса (полного электродного сопротивления) кожи овец проводили в биологически активной и нейтральной точках. Первая располагается в области выхода из межпозвоночного отверстия пятого шейного спинномозгового нерва, вторая – на уровне яремного желоба того же сегмента. БАТ отыскивали прибором для электропунктуры ПЭП-1. Метод поиска БАТ основан на выявлении пониженного кожного сопротивления в их зоне. При изучении полного электродного сопротивления кожи в БАТ пользовались методикой Р.Х. Тукшаитова [21]. Импеданс в БАТ и нейтральной точке измеряли через установку лампового вольтметра ВК-7-3. Силу тока определяли генератором ультразвуковой частоты ГЗ-33, равной 500 Гц. Электроды были стандартными от прибора ПЭП-1. Площадь активного электрода 1 мм². Индифферентный электрод накладывали через марлевую повязку, смоченную водопроводной водой, на область ахиллова сухожилия. Силу тока в опыте выставляли на уровне 1 мА, которая была значительно ниже порога раздражения. Для измерения импеданса использовали установку, состоящую из генератора ультразвуковой частоты ГЗ-33, лампового вольтметра и одного тумблера. Учитывая, что погрешность этой схемы равна 5%, показания двухэлектродного значения импеданса отсчитывали непосредственно по вольтметру. Величину импеданса определяли по формуле, предназначенной для определения полного кожного сопротивления. Преобразование прибора ГЗ-33 в генератор осуществляли с помощью дополнительного нагрузочного регистра Р.Х. Тукшаитова. Биофизические показатели регистрировали при температуре воздуха 18 ± 2° С.

После определения электрической активности и импеданса кожи в норме производили облучение определяемых точек светом гелий-неонового лазера по 3 минуты с каждой стороны. Биофизические показатели регистрировали через 30 ми-

нут, 2 часа, 2, 5, 7 суток. Цифровые данные обрабатывали методом вариационной статистики с проверкой достоверности результатов с помощью критерия Стьюдента и уровня значимости (P) по Г.Ф. Лакину [10].

Результаты исследования

Полученные данные свидетельствуют, что спустя 30 минут после облучения отмечается возрастание активности СДГ в коже. Оптическая плотность синего формазана увеличивается в 2-2,5 раза (рис. 1). При этом происходит увеличение количества зерен синего формазана в нервах и кровеносных сосудах. Однако активность СДГ в сосудах несколько меньше, чем в нервах. Высокая активность энзима наблюдалась также в клетках базального слоя эпидермиса, волосяных фолликулов и мышцах – поднимателях волос. Через 2 часа и в течение 24 часов после облучения происходит снижение активности СДГ в тканях. Оптическая плотность синего формазана к концу первых суток опускается ниже исходного уровня. При этом зерна синего формазана в виде диффузного отложения выявляются в базальном слое эпидермиса, эпителиальных клетках волосяных фолликулов, поднимателях волос и незначительно в кровеносных сосудах, преимущественно артериях мышечного типа. Увеличение активности СДГ происходит через трое суток после облучения. Следует отметить, что в первую очередь она восстанавливается в нервных проводниках, а затем зерна синего формазана выделяются на поверхности нервных волокон и вазавазорум, расположенных в адвентиции кровеносных сосудов.

Изменение активности СДГ свидетельствует, что лазерное излучение оказывает стимулирующее влияние на характер протекания окислительно-восстановительных процессов в тканях кожи сразу же после облучения, а затем в течение суток происходит снижение интенсивности обменных процессов, что связано с изменением типа обмена веществ с анаболического на катаболический.

В ходе исследования биофизических показателей кожи шеи в норме и после облучения лазером регистрировали биопотенциал и импеданс в биологически активной и нейтральной точках. Спустя 30 минут после облучения в БАТ происходит достоверное увеличение биопотенциала и снижение импеданса (рис. 2). Через 2 часа после облучения наблюдается снижение биопотенциала, но он был несколько выше исходного уровня, происходит также повышение импеданса. На 7 сутки наблюдения оба показателя еще остаются измененными. Одновременно в нейтральной точке изме-

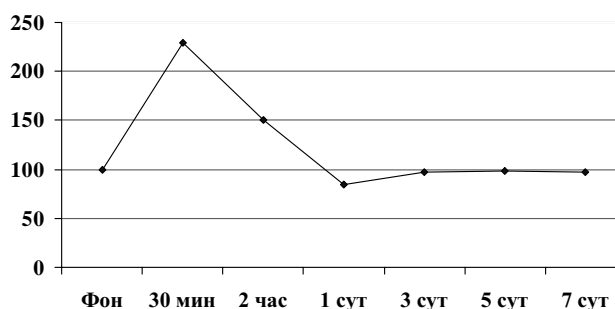


Рисунок 1. Оптическая плотность синего формазана в коже шеи кроликов после облучения красным светом гелий-неонового лазера области звездчатых узлов.

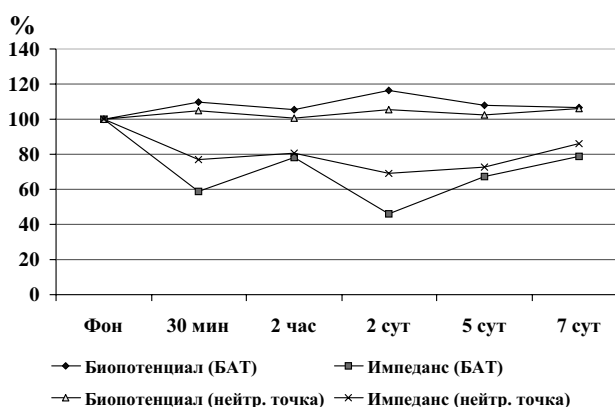


Рисунок 2. Кривые изменения биопотенциала и импеданса кожи шеи овец в биологически активной и нейтральной точках после облучения светом гелий-неонового лазера.

нения биопотенциала и импеданса имеют ту же направленность, но с меньшей амплитудой колебаний. Луч лазера, воздействуя на БАТ, оказывает более выраженное влияние на уровень обменных процессов, следствием которых является изменение биофизических показателей кожи.

На ультраструктурном уровне через 30 минут после облучения происходит увеличение электронной плотности нейроплазмы осевых цилиндров нервных волокон, расположенных в основе кожи (рис. 3-а). В цитоплазме нейролеммоцитов увеличивается количество рибосом, полисом, пузырьков различного диаметра, а в некоторых из них появляются крупные вакуоли, занимающие значительный объем цитоплазмы. Отмечается высокая активность эндотелиоцитов и перицитов.

В ядрах эндотелиоцитов увеличено количество рибонуклеопротеидных гранул. В цитоплазме перицитов выявляется большое количество везикул различного диаметра и электронной плотности с преимущественной концентрацией вблизи плазмолеммы, а многие из них открываются во внеклеточный матрикс.

В основе кожи облученных животных чаще, чем у контрольных, встречаются гранулоциты, мо-

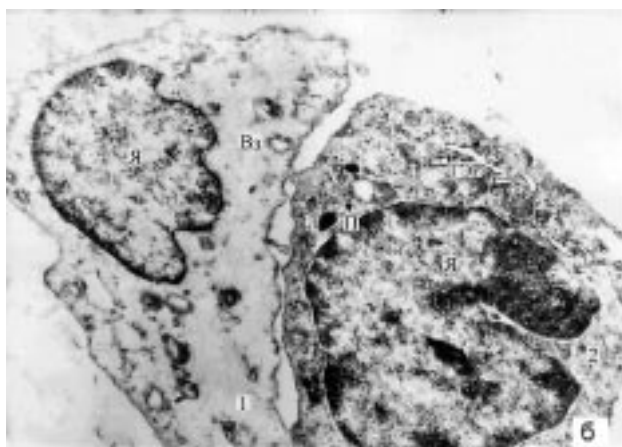
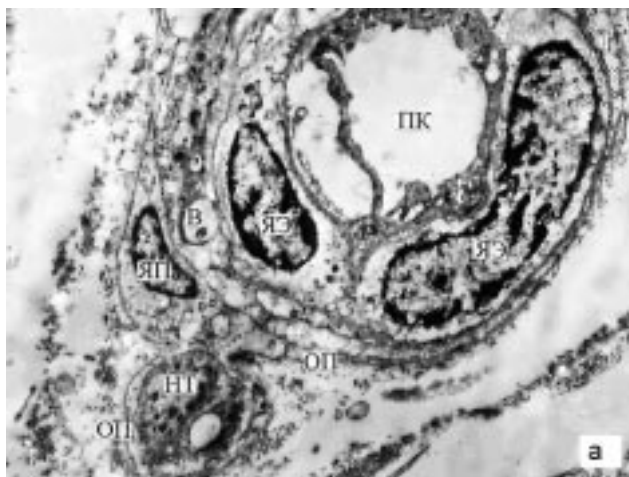


Рисунок 3. Ультраструктурные особенности стимулирующего действия низкоинтенсивного лазерного излучения. Трансмиссионная микроскопия.
 а – расширение просвета капилляра (ПК), ядро эндотелиоцита (ЯЭ), ядро перicyта (ЯП), вакуоли (В), нервная терминаль (НТ), окруженная отростками перicyта (ОП). Ув. 8000.
 б – малодифференцированная клетка (1) и макрофаг (2), ядро макрофага (Я) с многочисленными открытыми порами (П) и выходом электронноплотных частиц в цитоплазму, ГЭР – гранулярный эндоплазматический ретикулум, Л – лизосомы, везикулы (Вз) в виде розеток, окруженные пиноцитозными пузырьками. Ув. 20000.

нонуклеарные лейкоциты и макрофаги. Макрофаги имеют бобовидное или несколько расчлененное ядро, часто расположенное эксцентрично (рис. 3-б). Гетерохроматин имеет тенденцию к преимущественному скапливанию вблизи ядерной мембраны, а ближе к центру располагается эухроматин. Выявляются два или несколько ядрышек. Кариолемма имеет многочисленные поры, через которые наблюдается выход в цитоплазму мелких электронно-плотных гранул, по всей видимости, рибосом. Цитоплазма имеет высокую электронную плотность за счет большого содержания митохондрий, рибосом, полисом и везикул различного размера.

Некоторые везикулы в виде розеток окружаются мелкими пиноцитозными пузырьками, что свидетельствует о повышении белоксинтезирующих процессов в тканях кожи. В большом количестве, чем другие клетки крови, выявляются нейтрофилы. Их ядра содержат преимущественно гетерохроматин, перинуклеарное пространство расширено. В цитоплазме содержатся рибосомы, полисомы, фагосомы, а также большое количество гранул с более высокой электронной плотностью центральной зоны и несколько меньшей по периферии.

Обсуждение результатов исследования

Полученные гистохимические, морфологические и биофизические показатели после воздействия лазерного излучения свидетельствуют, что происходит изменение метаболических процессов в тканях кожи. Однако при этом нужно принимать во внимание выбор места воздействия светом лазера на соответствующие образования нервной системы или БАТ. Они характеризуется морфологическими и биофизическими особенностями. Эпидермис в БАТ образует гребешки, повышающие толщину эпидермиса, что обеспечивает наибольший контакт с сосочками дермы. В этих участках увеличено количество сосудов и нервов [17], вокруг миелиновых волокон отсутствует соединительнотканная оболочка [26].

В БАТ, по сравнению с нейтральными участками, встречаются свободные нервные окончания, которые, постепенно истончаясь, повторяют своим извилистым ходом контуры клеток базального слоя эпидермиса. Места анатомического входа нервов в кожу характеризуются малыми размерами и отличаются величиной биопотенциала [13]. В БАТ величина биопотенциала, отражая физико-химические следствия обмена веществ, является исключительно надежным, универсальным и точечным показателем течения физиологических функций [14]. В БАТ возникает первичный ответ на внешнее физическое воздействие [12]. Авторы полагают, что красный цвет гелий-неонового лазера оказывает стимулирующее влияние на трофический компонент нервной системы, воздействует на фосфолипиды мембран клеток и их органоидов, способствует активизации в них белоксинтезирующих процессов. В конечном итоге это приводит к изменению обмена веществ с ассимиляционного на диссимиляционный с восстановлением исходного уровня через 7-14 дней. Результаты наших исследований свидетельствуют, что лазерное излучение оказывает более выраженное влияние при воздействии на БАТ или участки кожи, на которые проецируются симпатические компоненты нервной

системы. Таким местом воздействия может служить звездчатый ганглий, который располагается на уровне головки первого ребра. Установлено, что нейроны звездчатого ганглия принимают участие в иннервации трахеи и пищевода [19, 20], сердца, щитовидной железы, некоторых мышц шеи [22], кожи и мышц шеи [8, 9], оказывает влияние на моторику 12-перстной кишки [4]. Можно предположить, что облучение этой области влияет на функциональную деятельность данных органов.

Луч лазера, воздействуя на БАТ, оказывает стимулирующее влияние на характер протекания окислительно-восстановительных процессов в тканях кожи, повышает функциональную активность нервов, клеток циркулирующей крови и элементов сосудистой стенки, увеличивает проницаемость сосудов микроциркуляторного русла и трансмиграцию клеток крови в основу кожи, что несомненно способствует повышению защитных сил организма.

Список использованной литературы:

1. Буйкис И.М. Гистохимия дегидрогеназ развивающегося спинного мозга. – Рига: Зинатне, 1975. – 230с.
2. Виноградов А.Д., Гаврикова Э.В., Головешкина В.Г. Кинетические и структурные характеристики компонентов сукцинатдегидрогеназы, реагирующие с естественными акцепторами электронов // Биохимия, 1976. – Т. 41. – С. 1155-1168.
3. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М.: Медицина, 1982. – С. 257-292.
4. Воробьева О.Б. Изменения интрамуральных ганглиев и моторики двенадцатиперстной кишки крысы при химической десимпатизации // Морфология, 2001. – №4. С. 68.
5. Горбунова Н.Ю., Горбунов А.Г., Сорокина И.А. Лазеротерапия при экземах собак // Здоровье, разведение и защита мелких домашних животных/Материалы первой Междунар. конф. – Уфа, 2000.
6. Зубкова С.М., Михайлик Л.В. Влияние импульсного инфракрасного лазерного облучения на синтез ДНК в тканях интактных крыс при активной физической нагрузке // Бюл. экспер. биол. и медицины, 1995. – Т. 70. – №6. – С. 625-627.
7. Клебанов Г.И., Теселкин Ю.О., Бабенкова И.В., Башкуева Т.Ю. и др. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на функциональный потенциал лейкоцитов // Бюл. экспер. биол. и медицины, 1997. – Т. 123. – №4. – С.395-398.
8. Кузнецова К.И. Микроморфология позвоночного нерва овец // Актуальные проблемы ветеринарии /Матер. междунар.конф. – Барнаул, 1995.
9. Кузнецова К.И. К вопросу микроморфологии позвоночного нерва // Иммунобиологические, технологические, экономические факторы повышения производства продукции сельского хозяйства. – Москва-Уфа, 2002.
10. Лакин Г.Ф. Биометрия.-М.: Высшая школа, 1980.-291с.
11. Михайлов Н.В. Механизм лечебно-стимулирующего действия луча лазера на организм животных и повышение их продуктивности. – Казань, 1985. – 196 с.
12. Михайлов Н.В., Яшина Г.И., Михайлов А.Н. Красный свет гелий-неонового лазера – стимулятор защитных сил и продуктивности животных //Возрастная и экологическая морфология животных в условиях интенсивного животноводства. – Ульяновск. – 1987. – С. 146-148.
13. Подшибякин А.К. О трофической функции нервной системы.– Киев: Изд. АН УССР, 1964. – 63с.
14. Преображенский О.Н., Тукшаитов Р.Х. Электрическое сопротивление кожи молочной железы свиноматок во время беременности и лактации // Ученые записки Казанского ордена Ленина гос. вет. института им. Н.Э. Баумана.-Казань, 1977. – Т. 125. – С. 37-40.
15. Рахитов А.Р. Реакции элементов периферической нервной системы на воздействие лазерного излучения //Архив анатомии, гистологии и эмбриологии, 1976. – Т. 70. – №2. – С. 5-13.
16. Ревякина В.А., Коростаев Д.С. Атопический дерматит: роль цитокинов в механизмах развития // Аллергология, 2000. – №1. – С. 40-48.
17. Рябуха В.А., Засорина Г.Н. Особенности строения биологически активных точек головы собак // Морфология, 2000. – Т.117. – №3. – С. 104.
18. Слабская Е.В., Мешкова Р.Я. Иммунобиологические свойства лазериндуцированных комплексов естественных цитокинов // Цитокины и воспаление, 2002. – Т. 1. – №2. – С. 39.
19. Стрелков А.А. Источники иннервации грудного отдела пищевода кошки // Морфология, 1998. – Т. 113. – №3. – С.116.
20. Стрелков А.А., Источники иннервации пищевода кошки // Росс. морф. ведомости, 1999. – №1,2. – С. 142.
21. Тукшаитов Р.Х. Закономерности изменения импеданса на переходе «электрод-кожа» у биологических объектов.-Казань, 1971.
22. Фатеев М.Н., Ноздрачев А.Д., Стрелков А.А. Иннервация внутренних органов нейронами звездчатого ганглия кошки // Докл. АН(Россия), 1996. – Т.38. – С. 122-123.
23. Чечунбаева Т.И., Котомцев В.В. Использование лазерной терапии при лечении экзем // Актуальные вопросы ветеринарной медицины. – Екатеринбург, 1997. – С. 14-16.
24. Хлыстова З.С., Калинина И.И., Хавинсон В.Х. Гормоны тимуса в эпидермисе кожи плода человека // Бюл. экспер. биол. и медицины, 2002 Т. 133. – №4. – С. 231-233.
25. Хлыстова З.С., Калинина И.И., Шмелева С.П., Рябчиков О.П., Хавинсон В.Х. Возрастные изменения тималина в эпидермисе кожи человека // Бюл. экспер. биол. и медицины, 2002 Т. 133. – №6. – С. 713-715.
26. Шабанов А.Н., Сосунов А.А., Тельцов Л.П. Иннервация аурикулярных точек акупунктуры // Росс. морф. ведомости, 1999. – №1,2. – С. 130.