



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЕ

ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТИМУЛЯЦИИ РЕПАРАТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В КОЖЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ФИЗИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

УДК 615.8: 616-001.4

Исайкин А.И., заведующий виварием, к.м.н.;

Щеколдин П.И., профессор кафедры восстановительной медицины, физиотерапии и курортологии, д.м.н.;

Валамина И.Е., доцент кафедры патологической анатомии, к.м.н.;

Власов А.А., доцент кафедры семейной медицины, к.м.н.;

Базарный В.В., профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии, главный научный сотрудник ЦНИЛ, д.м.н.

ГОУ ВПО «Уральская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России», г. Екатеринбург

Введение

Нарушение целостности кожного покрова и его репаративных возможностей лежат в основе патогенеза многих патологических состояний. Поэтому поиск путей направленного воздействия на эти процессы является актуальной проблемой восстановительной медицины.

При лечении кожных ран в настоящее время наряду с современными лечебными технологиями (клеточные культуры, рекомбинантные ростовые факторы, искусственные эквиваленты кожи и другие) [4, 6] обоснованно применяют методы физической терапии, например ультразвук [10, 12]. В то же время данные о влиянии некоторых других воздействий (магнитолазерная терапия, динамическая электронейростимуляция) на заживление кожной раны крайне ограничены, а в отношении других, например электротерапии, данные противоречивы [5, 7, 8]. Дальнейшее развитие технологий восстановительного лечения повреждений кожи требует их патогенетического обоснования. Этим определена цель работы – оценить влияние широко распространенных физических факторов – магнитолазерной терапии (МЛТ), ультразвука (УЗ) и динамической электронейростимуляции (ДЭНС) на заживление кожной раны и расшифровать возможные иммунологические механизмы их репаративного эффекта.

Материал и методы исследования

Эксперимент выполнен на 84 беспородных крысах-самцах массой 120–150 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария (Приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.). Для решения задачи исследования была использована модель кожной раны, площадь которой составляла 1 см², описанная нами ранее [1]. Ее моделирование осуществляли хирургическим способом на дорсальной поверхности тела крыс с соблюдением правил асептики. Для наркоза использовали рометар (0,1 мл/100 г. массы тела), дополнительно проводилась местная инфльтрационная анестезия 0,3%-ным раствором лидокаина.

Животных подвергали воздействию физических факторов. В первой группе была использована ДЭНС (аппарат ДиаДЭНС-Т) в области кожи хвоста и одновременно в проекции раны (частота 77 Гц, мощность 3 усл. ед., длительность воздействия 10 мин), начиная со дня операции, на курс 7 процедур. Во второй группе крыс использовали МЛТ аппаратом АМЛТ-1 (плотность мощности лазерного излучения – 4 мВт/кв. см, индукция переменного магнитного поля – 40 мТл, общая продолжительность процедуры 8 мин), на курс 7 процедур. Крысам третьей группы проводили воздействие на кожную рану

УЗ с помощью аппарата «УЗТ-1.01ф». Режим генерации УЗ – непрерывный, способ озвучивания – контактный, методика лабильная (частота – 880 кГц, контактная среда – ланолин и глицерин). Излучателем УЗТ-1.03ф воздействовали на кожу хвоста (интенсивность 0,4 – 0,7 Вт/см², площадь эффективного воздействия 1 см², время процедуры 15 мин), на курс 7 процедур. В контрольной группе (четвертая группа) крысы терапии физическими факторами не получали.

Животных выводили из эксперимента методом декапитации в условиях эфирного наркоза на седьмые сутки для изучения лабораторных и морфологических данных. Часть животных наблюдали в течение 15 суток для оценки сроков полной эпителизации раны и отторжения кожного струпа.

Репаративные процессы контролировали по морфологической картине заживления. Для этого приготавливали стандартные гистологические срезы тканей, взятых с краев раны с грануляционной тканью, которые окрашивали гематоксилином-эозином. В целях объективизации полученных данных интенсивность клеточной реакции оценивали методом компьютерной морфометрии (аппаратный видео-компьютерный комплекс Видео-тест, Россия).

Для оценки системных реакций организма выполняли общеклинический анализ крови (гематологический анализатор Advia 60) и определение концентрации острофазовых белков: С-реактивного белка (СРБ) – полуколичественным методом латекс-агглютинации («Ольвекс», Санкт-Петербург) и фибриногена (клоттинговый метод с регистрацией времени образования сгустка на коагулометре «Солар», тест-система «Технология-стандарт», Россия). Активность биохимического маркера цитолиза – дактатдегидрогеназы (ЛДГ) определяли кинетическим методом (Olympus AU640).

Функцию нейтрофильных гранулоцитов оценивали в цитохимическом лизосомально-катионном тесте с бромфеноловым синим по Пигаревскому В.Е. Результат реакции выражали в виде среднего цитохимического коэффициента (сцк) по L. Karlow [3].

Статистическая обработка результатов выполнялась на основе принципов вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни для определения достоверности различий между группами [2].

Результаты и их обсуждение

По современным представлениям заживление кожной раны является сложным динамическим процессом, включающим ряд стадий: воспаление, пролиферация,

ремоделирование. В них принимают активное участие клетки соединительной ткани и гуморальные факторы (факторы роста, цитокины и другие) [6, 9, 11].

Морфологическое исследование показало, что у крыс контрольной группы на 7-е сутки после нанесения травмы раневой дефект был выполнен грануляционной тканью (ГТ). В клеточном составе преобладали лейкоциты, имелись явления отека. Полная эпителизация раневого дефекта в этот срок отсутствовала, в краях раны только начиналось утолщение эпителия за счет пролиферации клеток базального слоя. К 13-м суткам происходила полная ремоделиция ткани, которая завершалась отторжением струпа и формированием мягкого соединительно-тканного рубца.

При воздействии ДЭНС на 7-е сутки число нейтрофилов в зоне раны было несколько меньше, чем в контроле, хотя и сохранялась экссудативная реакция. Существенного ускорения эпителизации раны установлено не было. Однако в 30% гистологических препаратов в этот срок выявлено наплывание на ГТ новообразованного эпителия.

При дальнейшем наблюдении было установлено, что полное восстановление целостности кожного покрова

наступало в среднем на 11-е сутки (у контрольных крыс на 12-е сутки). При этом, под влиянием ДЭНС образовывался более нежный соединительнотканый рубец. МЛТ вызывала аналогичные изменения в динамике заживления кожной раны.

Под влиянием УЗ в аналогичный срок наблюдения раневой дефект также был выполнен созревающей ГТ. Она содержала хорошо сформированные капилляры, разнонаправленные коллагеновые волокна, пролиферирующие клетки, среди которых преобладали фибробласты, встречались гистиоциты, лимфоциты, единичные нейтрофилы. На большем протяжении новообразованная ткань была покрыта эпителием в виде однослойного пласта клеток. Кожный струп у животных данной группы отходил на 1 сутки раньше, чем в контрольной группе, что подтверждало морфологическое заключение.

Для объективизации морфологической картины было проведено морфометрическое исследование, в ходе которого определяли общую долю клеток (в % к поверхности ГТ), что отражало пролиферативную активность клеток, а также объемную долю лимфоцитов (таблица 1).

Таблица 1. Клинико-морфологическая характеристика кожного регенерата

Группы	Общая доля клеток, %	Объемная доля лимфоцитов, %	Средний срок эпителизации, сут.
ДЭНС	14,6±2,3*	0,43±0,07*	11,5±0,5
МЛТ	16,7±2,3*	0,31±0,10	11,5±0,5
Ультразвук (n=32)	16,9±3,8*	0,38±0,08	11,0±0,5
Контроль (n=17)	10,1±2,0	0,26±0,08	12,5±1,0

Примечание: *p<0,05 в сравнении с контролем

Под влиянием физических факторов количество клеток в ГТ «кожного регенерата» увеличивалось на 55 – 67% (p < 0,05 в сравнении с контролем), при этом достоверных различий между группами не обнаружилось.

Следовательно, все использованные физические факторы оказывали стимулирующее действие на заживление кожной раны, более выраженный эффект проявляла УЗ-терапия. Данный фактор вызывал и более выраженную неоваскуляризацию ГТ.

Для понимания механизмов стимулирующего влияния физиотерапии на кожную репарацию исследовали системные реакции организма. Такой анализ позволил подтвердить известные противовоспалительные свойства изучаемых факторов, о чем свидетельствовали нормальное число лейкоцитов и концентрация острофа-

зовых реактантов – С-реактивного белка и фибриногена (таблица 2). Это закономерно приводило к снижению степени повреждения тканей на клеточном уровне, о чем судили по нормализации активности ЛДГ.

Известно, что в регуляции репаративных процессов важную роль играют иммунокомпетентные клетки. В нашем исследовании мы оценивали количество лимфоцитов в зоне регенерата (таблица 1) и лизосомально-катионный тест (ЛКТ), свидетельствующий о функционально-метаболической активности нейтрофилов крови (таблица 2). Такой подход показал, что под влиянием ДЭНС происходило максимальное накопление лимфоидных клеток при репарации кожи, а заметная стимуляция нейтрофилов, выявленная в лизосомально-катионном тесте, – при воздействии МЛТ и УЗ.

Таблица 2. Лабораторные показатели крыс при заживлении кожной раны, 7-е сутки

Показатели	Контрольная группа n=17	ДЭНС n=15	МЛТ n=17	УЗ n=13
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	8,47±0,56	7,71±0,35	7,15±0,44	8,12±0,49
С-реактивный белок, г/мл	9,0 ±2,5	7,5±3,0	7,0 ±1,2	6,0 ±0,5
Фибриноген, г/л	4,8±0,5	4,2±0,3	4,1±0,50	4,0±0,1
ЛДГ Е/л	1377,0±163,1	812,5±194,3*	795,0±150,1*	840,6±237,1*
ЛКТ (сцк)	1,51±0,06	1,67±0,31	2,11±0,19*	1,84±0,22

Примечание: * p<0,05 в сравнении с контрольной группой

Репарация кожи регулируется сложным комплексом механизмов с участием гормонов, факторов роста, миграционной активности клеток и многих других [6, 9, 11]. Установлены механизмы стимуляции восстановительных процессов на клеточном, тканевом и органном уровнях при магнитолазерном воздействии, лечебном применении ультразвука и ДЭНС. В данной работе нами показано известное стимулирующее влияние на регенерацию кожи физических факторов. В реализации этих эффектов лежат и иммунные механизмы. Так, под влиянием ДЭНС происходит накопление лимфоидных кле-

ток в зоне регенерата и можно полагать, что это ведет к реализации присущей Т-клеткам морфогенетической функции. При МЛТ и УЗ-воздействии активируются нейтрофильные гранулоциты, которым также свойственна не только провоспалительная, но и ростостимулирующая активность, связанная с секрецией многочисленных биологически активных веществ. Некоторые из них способны продуцировать стимуляторы ангиогенеза, что приводит к активизации микроциркуляции и оксигенации регенерирующей ткани.



ДиаДЭНС · ПКМ

АППАРАТ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДИНАМИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОНЕЙРОСТИМУЛЯЦИИ (ДЭНС)

Портативный физиотерапевтический аппарат для лечения, реабилитации, профилактики заболеваний у взрослых и детей.

- 13 специализированных программ для терапии наиболее часто встречающихся симптомов заболеваний
- Самостоятельный выбор параметров стимуляции для составления индивидуального рецепта процедуры



ДЭНС-аппликатор

КОМПЛЕКТ ВЫНОСНЫХ ЭЛЕКТРОДОВ ДЛЯ АППАРАТА ДиаДЭНС-ПКМ

Применяется для воздействия на зоны большой площади

- Уменьшение трудоемкости процедур
- Комфортное воздействие на область спины, суставов при оказании самопомощи
- Максимальная конгруэнтность любому участку тела



ИМЕЮТСЯ ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ. ПЕРЕД ПРИМЕНЕНИЕМ ПРОКОНСУЛЬТИРУЙТЕСЬ СО СПЕЦИАЛИСТОМ ИЛИ ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ИНСТРУКЦИЕЙ ПО ПРИМЕНЕНИЮ

Заключение

Физические факторы МЛТ, УЗ и ДЭНС обладают свойствами стимулировать восстановительные процессы в коже при ее повреждении. Результаты проведенного экспериментального исследования позволили доказать ускорение темпов заживления кожной раны при физиотерапии. Это связано в значительной степени с активизацией пролиферативных процессов, скорее всего – с участием Т-лимфоцитарных механизмов регу-

ляции пролиферации, при использовании ДЭНС. МЛТ и УЗ вызывали стимуляцию «невоспалительных» функций нейтрофилов, чем, вероятно, было обусловлено и усиленное новообразование капилляров микроциркуляторного русла, более выраженное при действии УЗ. Важный вклад в ускорение сроков заживления раны и формирования рубца вносит и выраженная противовоспалительная активность всех изучаемых факторов физической терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Базарный В.В., Валамина И.Е., Селянина О.Н. и др. Иммуномодуляция рибомунилом репаративных процессов в коже крыс // Бюлл.эксп. биол.мед. – 2007. – Т. 143, № 6. – С. 660–662.
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
3. Клиническая лабораторная аналитика. Том 2. /Под ред. В.В.Меньшикова. – М.:Лабинформ-РАМЛД. – 1999. – 352 с.
4. Кузнецов Н.А. Лечение ран: учебно-методическое пособие / Н.А. Кузнецов, Г.В. Родоман, В.П. Туманов, В.Г. Никитин, Т. И. Шалаева. – М.: МЗ РФ, 2004. – 34 с.
5. Godbout C., Frenette J. Periodic Direct Current Does Not Promote Wound Closure in an In Vitro Dynamic Model of Cell Migration // Phys. Ther. – 2006. – Vol. 86, № 1. – P. 50–59.
6. Godwin, J.W. Brookes J.P. Regeneration, tissue injury and the immune response // J. Anat. – 2006. – Vol. 209, № 4. – P. 423–432.
7. Grim S.B., Duffy J.M., Theodosopoulos P.N. et al. For a patient with type 1 diabetes and a heel ulcer, could the addition of electrical stimulation to standard wound treatment improve wound healing over standard wound treatment alone? // Phys. Ther. – 2003. – Vol. 83, № 3. – P. 290–296
8. Houghton P.E., Kincaid C. B., Lovell M. et al. Effect of Electrical Stimulation on Chronic Leg Ulcer Size and Appearance // Phys. Ther. – 2003. – Vol. 83, No. 1. – P.17–28.
9. Jameson J., Ugarte K., Chen N. et al. A role for skin T cells in wound repair // Science. – 2002. – Vol. 296. – P. 747–749.
10. Klucinec B., Sheidler M., Denagar C. et al. Effectiveness of wound care products in the transmission of acoustic energy // Phys. Ther. – 2000. – Vol. 80, No. 5. – P. 469–476.
11. Werner S., Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines // Physiol. Rev. – 2003. – Vol. 83. – P. 835–870.
12. Wollina U., Heinig B., Naumann G. et al. Effects of low-frequency ultrasound on microcirculation in venous leg ulcers. // Indian J Dermatol. – 2011. – Vol. 56, № 2. – P.174–179.

АННОТАЦИЯ

В работе изучалось влияние магнитолазерной терапии, динамической электростимуляции и ультразвука на заживление кожной раны. Показана стимуляция репаративных процессов в тканях и ускорение сроков эпителизации раны. Обсуждаются возможные механизмы корректирующего воздействия физических факторов на репаративный процесс в коже, в том числе – через активацию различных звеньев иммунной системы.

Ключевые слова: динамическая электростимуляция, магнитолазерная терапия, ультразвук, кожная рана.

ABSTRACT

We studied the effect of magneto-laseric therapy, dynamic electroneurostimulation and ultrasound on the skin wounds healing. It is shown that stimulation of the repair processes in the tissue and accelerate wound epithelialization time. Possible mechanisms of the corrective influence of physical factors on reparative process in which the same, including – through the activation of different branch of the immune system.

Key words: dynamic electroneurostimulation, magneto-laser therapy, ultrasound, cutaneous wound.

Контакты

Базарный Владимир Викторович. Служебный адрес: 620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3 УГМА
e-mail: vlad-bazarny@yandex.ru.