

13. Москвин С.В., Ачилов А.А. Основы лазерной терапии. М.–Тверь: Триада, 2008. 256 с.
14. Москвин С.В., Наседкин А.Н., Кочетков А.В. и др. Терапия матричными импульсными лазерами красного спектра излучения. Тверь: Триада, 2007. 112 с.
15. Москвин С.В., Наседкин А.Н., Осин А.Я., Хан М.Я. Лазерная терапия в педиатрии. М.: ЭКСМО, 2010. 479 с.
16. Наседкин А.Н., Зенгер В.Г. Лазеры в оториноларингологии. М.: Техника, 2000. 140 с.
17. Наседкин А.Н., Зенгер В.Г. Оптимизация методов лазерной терапии заболеваний уха, горла и носа // Лазерная медицина. 2000. Т. 4. Вып. 4. С. 9–12.
18. Наседкин А.Н., Петлев А.А. Клиническое применение лазерного излучения видимого диапазона спектра в импульсном режиме для лечения различных заболеваний уха, горла и носа // Лазерная медицина. 2000. Т. 4. Вып. 4. С. 56–57.
19. Новаковский А.Л., Горецкий К.Г. Современные лазерные медицинские технологии в оториноларингологии. Минск: Технопринт, 2006. 256 с.
20. Петлев А.А., Наседкин А.Н., Москвин С.В. и др. Сравнение эффективности низкоинтенсивного импульсного и непрерывного лазерного излучения красного и инфракрасного диапазонов спектра в комплексной терапии хронического аденоидита у детей // Лазерная медицина. 2003. Т. 7. Вып. 3–4. С. 27–30.
21. Плужников М.С., Лопотко А.И. Низкоэнергетическое лазерное излучение в оториноларингологии // Вестн. оториноларингол. 1996. № 2. С. 5–14.
22. Скупченко В.В., Милудин Е.С. Фазотонный гомеостаз и врачевание. Самара: Сам. гос. мед. ун-т, 1994. 256 с.

Поступила в редакцию 02.06.2014 г.

Для контактов: Наседкин Алексей Николаевич

E-mail: nasedkin46@yandex.ru

УДК 616.832:599.323.3

Володченко А.М., Кузьмин А.Н., Козель А.И., Гиниатуллин Р.У., Астахова Л.В.

Активация ангиогенеза в ишемизированном спинном мозге крыс после воздействия лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона

Volodchenko A.M., Kuzmin A.N., Kozel A.I., Giniatullin R.U., Astahova L.V.

Angiogenesis activation in rats' ischemized spinal cord after irradiation with laser light of the near infrared spectrum

ГБУЗ ЦОСМП «Челябинский государственный институт лазерной хирургии», отдел фундаментальных исследований, г. Челябинск

Цель исследования – на основе изучения патоморфологических изменений в ишемизированном спинном мозге крыс обосновать возможность применения лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона для коррекции структурно-функциональных нарушений при спинальном инсульте в эксперименте. Для достижения цели работы применялись гистологические, морфометрические и статистические методы исследования. *Результаты* количественного морфологического исследования препаратов спинного мозга показали, что при применении лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона содержание нормальных нейронов и кровеносных сосудов было значительно больше, а число нейронов с хроматолизом и клеток-теней меньше по сравнению с 1-й серией группы сравнения. *Ключевые слова*: спинной мозг крыс; экспериментальная ишемия; патоморфология; лазерное излучение.

Purpose. To study pathological changes in the ischemized spinal cord of rats so as to define a possibility to use laser light of the near infrared spectrum for the correction of structural and functional disorders in spinal stroke in the experiment. *His-tological, morphometric and statistical methods were used in the study. Results.* The findings obtained after a quantitative morphological examination of spinal cord preparations have showed that the number of normal neurons and blood vessels was significantly larger and the number of neurons with chromatolysis and shadow-cells was less as to compared with the 1 series of comparison group under near infrared laser light irradiation. *Keywords:* spinal cord of rats, experimental ischemia, pathomorphology, laser radiation.

Введение

Спинальный инсульт – острое нарушение спинального кровообращения с повреждением спинного мозга и расстройством его функций вследствие затруднения или прекращения поступления крови [2].

Частота миелоишемии составляет до 1,2% случаев всех нарушений мозгового кровообращения [4], а инвалидизация при спинальном инсульте – до 1/3 случаев заболевания [2].

Несмотря на наличие значительного арсенала современных лекарственных препаратов, терапия сосудистой патологии ЦНС, проводимая в настоящее время, недостаточно эффективна.

Цель исследования

На основе изучения патоморфологических изменений в ишемизированном спинном мозге крыс обосновать возможность применения лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона для коррекции структурно-функциональных нарушений при спинальном инсульте в эксперименте.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проведен на 45 беспородных половозрелых крысах разного пола массой 220–250 г. Животные содержались в условиях вивария, регламентируемых приказом МЗ СССР № 1179 от 10.10.1983 г. Опыты про-

водили в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.09.1977 г. и № 701 от 27.07.1978 г. об обеспечении принципов гуманного обращения с животными. Все оперативные вмешательства проводили в экспериментальной операционной с соблюдением правил асептики и антисептики в условиях внутримышечной общей анестезии зоветилом (2 мг/кг массы тела животного). Выведение животных из эксперимента осуществляли путем внутрисердечного введения 3 мл 7,5% раствора хлористого калия.

Все животные были разделены на 3 серии опытов.

1-я серия эксперимента. На 20 животных (группа сравнения) моделировали ишемию спинного мозга по методике, предложенной Г.З. Суфиановой и др. [3]. Транзиторную ишемию поясничного отдела спинного мозга создавали тотальной интраваскулярной окклюзией и последующим клипированием бедренных артерий. С этой целью в обе бедренные артерии по направлению к сердцу вводили окклюдеры (стерильную нить из хромированного кетгута 3.0), глубину введения которых определяли расстоянием от мечевидного отростка до основания хвоста. Через 45 мин окклюдеры извлекали, а бедренные артерии затем клипировали.

Животных выводили из опыта на 3, 7, 14, 30-е сут после моделирования ишемии. На каждом сроке наблюдения исследовано 5 крыс.

2-я серия эксперимента. На 5 животных с моделью ишемии спинного мозга через 2–4 ч отрабатывали параметры лазерного воздействия на кожу в области ишемического очага. Мы использовали излучение диодного лазера «ALTO» с длиной волны 980 нм. Лазерное облучение осуществляли с помощью кварц-кварцевого моноволоконного световода диаметром 600 мкм, дистанционно (3–4 см от поверхности кожной раны), используя различную мощность (0,5 Вт, 1 Вт, 2 Вт) и экспозицию (30 с, 1 мин, 3 мин). Выходную мощность на торце световода контролировали измерителем мощности лазерного излучения Gentec TPM-300-CE (Canada). Животных выводили из опыта на 7-е сутки после моделирования ишемии.

3-я серия эксперимента. На 20 животных с моделью ишемии спинного мозга через 2 ч после операции проводили дистанционное накожное (4 см от ее поверхности) в непрерывном режиме облучение области ишемического очага диодным лазером с длиной волны 980 нм, используя обоснованные морфологические параметры: мощность – 2 Вт, экспозиция – 3 мин. Животных выводили из опыта на 3, 7, 14, 30-е сутки после моделирования ишемии. На каждом сроке наблюдения исследовано 5 крыс. После выведения животных из эксперимента спинной мозг извлекали полностью и тщательно осматривали. Регистрировали изменения окраски и консистенции спинного мозга. Кусочки спинного мозга маркировали и фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, обезживали в спиртах с возрастающей концентрацией и заливали в парафин. Из парафиновых блоков готовили серийные фронтальные срезы толщиной 3–5 мкм, которые окрашивали: гематоксилином и эозином – для обзорной микроскопии, по методу Бильшовского – для выявления миелиновых волокон, по методу Ниссля – для верификации тигроидного вещества Ниссля, глиальных клеток. Исследование

и фотографирование микропрепаратов проводили микроскопом «Leica DMRXA» (Germany).

Для объективизации параметров морфологических изменений, кроме описательных, использовали следующие счетные признаки:

- количество неизмененных (нормальных) нейронов на условной единице площади;
- количество нейронов с хроматолизом на условной единице площади;
- количество клеток-теней на условной единице площади;
- количество мелких кровеносных сосудов (капилляров, артериол) на условной единице площади.

Морфометрические исследования проводили с помощью компьютерной программы анализа цветового изображения «ДиаМорф Cito-W» (Россия), при увеличении микроскопа $\times 400$, в 10 случайно отобранных полях зрения.

Полученные результаты обрабатывали на IBM PC с помощью лицензионного пакета прикладных программ Statistica 6.0 (StatSoftIns, USA). Применяли методы вариационной статистики. Статистическую значимость различий сравниваемых признаков в группах оценивали с использованием непараметрического U-теста Манна-Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Патоморфология ишемии спинного мозга (1-я серия эксперимента)

1-е, 3-и сутки. При гистологическом исследовании препаратов поясничного утолщения спинного мозга наиболее выраженные изменения были отмечены в передних рогах – хроматолиз цитоплазмы, пикноз ядер, растворение глыбок базофильного вещества Ниссля в нейронах с превращением их в клетки-тени. Встречались также неизмененные и гиперхромные нейроны (рис. 1.). Отмечалась нейронофагия, перичеселлюлярный и периваскулярный отек в белом веществе (рис. 2.).

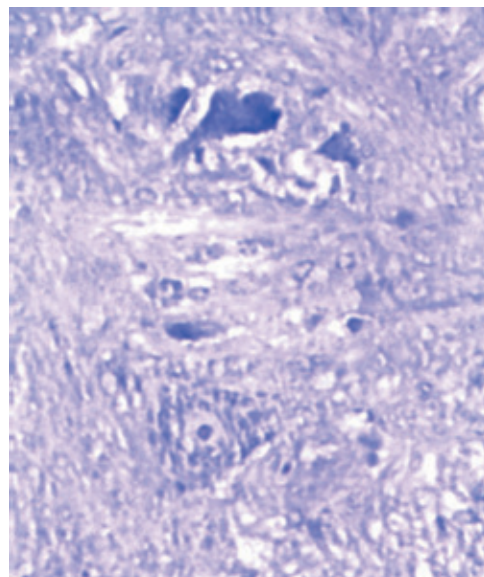


Рис. 1. Хроматолиз цитоплазмы, пикноз ядер, растворение глыбок базофильного вещества в нейронах, клетки-тени

7-е сутки. В центральной зоне ишемического очага были обнаружены деструктивные изменения в нейронах (рис. 3–4), а в перифокальной зоне встречались неповрежденные нейроны. Увеличивалось содержание астроцитов с признаками их гипертрофии, наблюдалась активизация микроглии, появлялись макрофаги.

14, 30-е сутки. Морфологические изменения в тканях спинного мозга в эти сроки опыта были сходными с таковыми, описанными на 7-е сутки.

Результаты количественного исследования препаратов спинного мозга показали (см. таблицу), что содержание нормальных нейронов на 7-е сутки существенно уменьшилось, а число нейронов с хроматозом, клеточ-теней увеличилось по сравнению с предыдущими сроками наблюдения. На 14-е сутки количество нормальных нейронов, а также содержание кровеносных сосудов на 30-е сутки достоверно увеличилось по отношению к предыдущим срокам экспериментов.

Отработка адекватных параметров лазерного воздействия на ишемизированные ткани спинного мозга крыс (2-я серия эксперимента)

Результаты исследования показали, что применение излучения мощностью 3 Вт при экспозиции 3 мин вы-

зывало существенные морфологические изменения в коже поясничного отдела в виде ожога, что не отвечало требованиям нашего эксперимента.

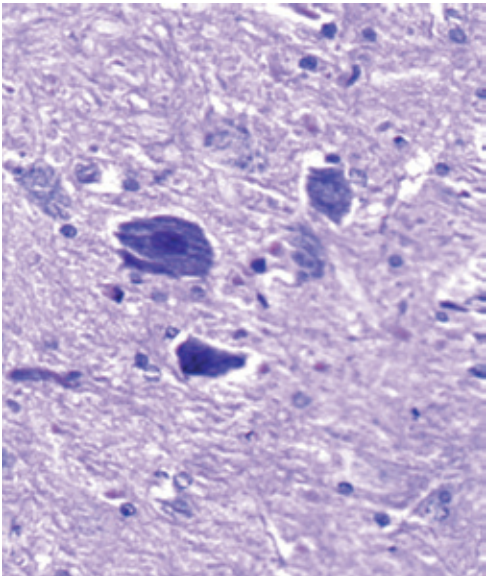


Рис. 3. Нейроны в состоянии набухания и сморщивания. Окраска гематоксилином и эозином. ×400

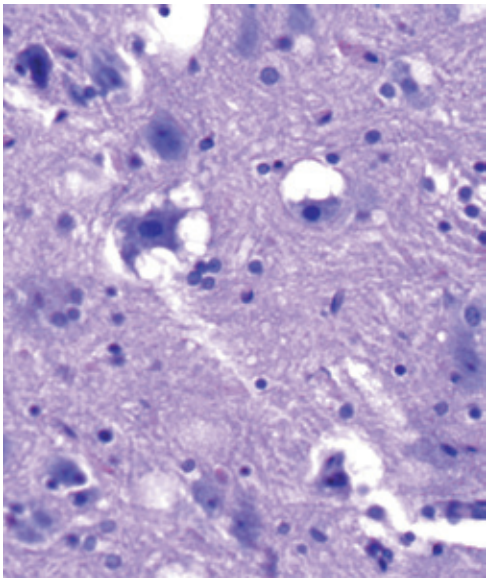


Рис. 2. Выраженный перичеллюлярный и периваскулярный отек. Окраска гематоксилином и эозином. ×400. Окраска по Нисслю. ×400

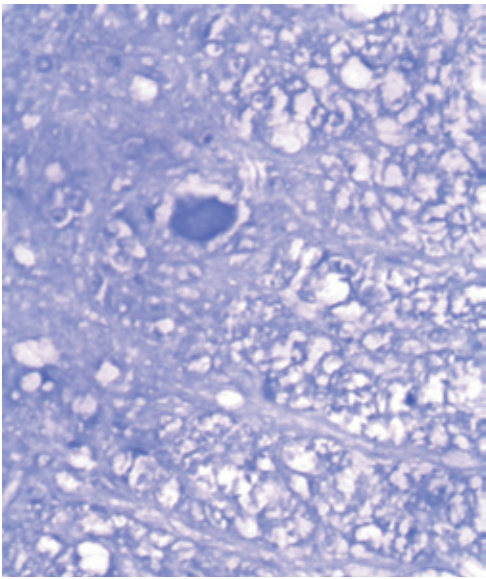


Рис. 4. Деструкция ядер и цитоплазмы отдельных нейронов, клетка-тень. Окраска по Нисслю. ×400

Т а б л и ц а

Количественные изменения исследуемых показателей в различных сериях опыта (M ± m)

Исследованный показатель (на условной единице площади)	Серия опыта	Сроки наблюдения (сутки)			
		3-й	7-е	14-е	30-е
Количество нормальных нейронов	1-я	30,2 ± 2,1	24,3 ± 1,1*	27,8 ± 1,3*	29,9 ± 2,5
	3-я	59,1 ± 1,7**	65,2 ± 1,3***	72,3 ± 2,1***	81,4 ± 2,6***
Число нейронов с хроматозом	1-я	29,3 ± 0,6	36,4 ± 0,9*	43,6 ± 2,1*	53,8 ± 1,2*
	3-я	27,4 ± 0,7**	25,2 ± 0,3***	20,1 ± 0,4***	16,3 ± 0,3***
Число клеток-теней	1-я	36,2 ± 2,3	58,1 ± 2,5*	63,8 ± 2,8	67,9 ± 2,2
	3-я	19,8 ± 0,2**	15,7 ± 0,3***	10,6 ± 0,3***	5,9 ± 0,6***
Количество мелких кровеносных сосудов	1-я	4,3 ± 0,2	6,2 ± 0,4	8,1 ± 0,7	10,2 ± 0,6*
	3-я	9,8 ± 0,4**	15,9 ± 0,3***	20,8 ± 0,6***	25,9 ± 0,6***

Примечание: 1-я серия опыта – модель ишемии спинного мозга (группа сравнения); 3-я серия опыта – модель ишемии спинного мозга, леченная лазерным излучением; * – $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим сроком опыта в каждой серии; ** – $p < 0,05$ по отношению к 1-й серии опыта.

При применении лазерного излучения мощностью 2 Вт при экспозиции 3 мин. не отмечалось повреждающего действия на кожу и ткани спинного мозга, но вызывало активизацию сосудистой реакции, что подтверждалось результатами количественного исследования на 7-е сутки опыта, что было подтверждено далее в 3-й серии опытов (см. табл.).

Таким образом, воздействие непрерывного инфракрасного излучения диодного лазера длиной волны 980 нм, мощностью 2 Вт в течение 3 мин, в дистанционном режиме работы являлось, по данным морфологического исследования, оптимальным для облечения ишемизированных тканей спинного мозга у крыс.

Оценка патоморфологических изменений при применении лазерного излучения для коррекции ишемических поражений спинного мозга у крыс (3-я серия эксперимента)

3-и, 7-е сутки. При микроскопическом исследовании гистологических препаратов спинного мозга мы отмечали деструктивные изменения ядер и цитоплазмы отдельных нейронов, встречались клетки-тени. Определялись также полнокровные сосуды, пролиферация глиоцитов и эндотелиоцитов капилляров и артериол.

Данные морфологические изменения сохранялись до 14-х суток опытов. В это время, а также на 30-е сутки эксперимента регистрировалась хорошая сохранность нейронов, лишь отдельные из них находились в состоянии набухания и сморщивания. Также наблюдали пролиферацию глиоцитов, эндотелиоцитов капилляров и артериол, встречались чаще неповрежденные нервные волокна (рис. 5–6).

Результаты морфометрического исследования гистологических препаратов спинного мозга показали (см. табл.), что количество нормальных нейронов было достоверно больше, начиная с 7-х и до 30-х суток. Наряду с этим, с 7-х суток и в последующие сроки наблюдения число клеток-теней и нейронов с хроматолизом было значительно меньше, а содержание кровеносных сосудов – больше. Кроме того, количество нормальных нейронов, кровеносных сосудов было значительно больше, а число нейронов с хроматолизом и клеток-теней – меньше на всех сроках опытов по сравнению с 1-й серией экспериментов.

Таким образом, результаты проведенного экспериментального исследования показали, что использование для коррекции ишемических нарушений в спинном мозге лазерного излучения ближнего инфракрасного диапазона, глубоко проникающего в ткани, способствует усилению микроциркуляции, повышению функциональной активности различных клеточных элементов, включая эндотелиоциты сосудов, что при-

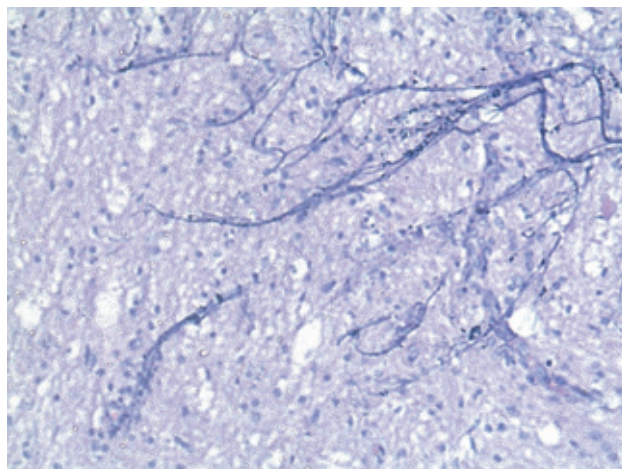


Рис. 5. Проплиферация глиоцитов и эндотелиоцитов и капилляров

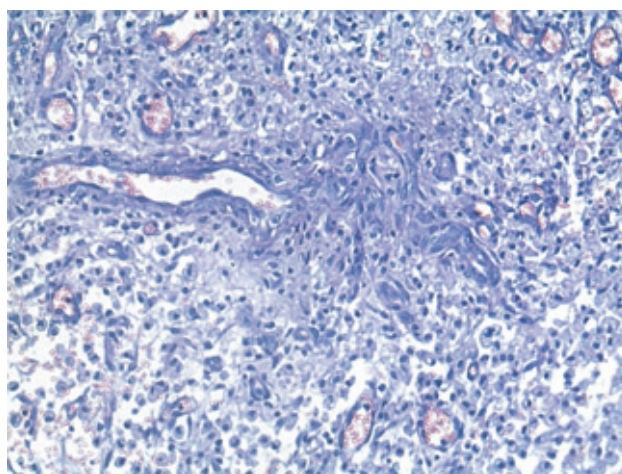


Рис. 6. Полнокровные артериол и капилляров. Окраска по Нисслю. $\times 400$

водит к активации неонангиогенеза в облучаемых тканях с образованием нового кровеносного русла [1].

Литература

1. Головнева Е.С. О роли тучных клеток в стимуляции процесса неонангиогенеза в ответ на воздействие высокоинтенсивного лазерного излучения // Лазерная медицина. 2001. № 5. С. 29–32.
2. Скоромец А.А., Скоромец А.П., Скоромец Т.А., Тиссен Т.П. Спинальная ангионеврология. Руководство для врачей. СПб.: МЕДпресс информ, 2003. 608 с.
3. Суфианова Г.З., Усов Л.А., Суфианов А.А. и др. Новая малоинвазивная модель ишемии спинного мозга у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002. Т. 133. № 1. С. 116–120.
4. Clowes A.W., Clowes M.M., Au Y.P., Reidy M.A., Belin D. Smooth muscle cells express urokinase during mitogenesis and tissue-type plasminogen activator during migration in injured rat carotid artery. CircRes. 1990. 67 (1). P. 61–67.

Поступила в редакцию 28.01.2015 г.

Для контактов: Володченко Алексей Михайлович
E-mail: volodchenko174@yandex.ru