

Астахова Л.В., Игнатьева Е.Н., Головнева Е.С., Гиниатуллин Р.У., Астахова М.И.

Сравнительное изучение действия непрерывного и импульсного высокоинтенсивного лазерного излучения на кожу (экспериментальное исследование)

Astakhova L.V., Ignatjeva E.N., Golovneva E.S., Giniatullin R.U., Astakhova M.I.

A comparative study on effectiveness of continuous and pulsed high-intensity laser light on the skin (an experimental work)

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

В сравнительном аспекте изучены морфофункциональные изменения кожи после ее деструкции непрерывным и импульсным высокоинтенсивным лазерным излучением. У 20 крыс выполняли поверхностную лазерную деструкцию кожи (длина волны – 0,97 мкм) в непрерывном режиме мощностью 3 Вт и импульсном режиме со средней мощностью 3 Вт (импульс и пауза – 50 мс). Сроки исследования – 1 час, 1 сутки. Использовались гистологические, морфометрические, статистические методы исследования. Измеряли ширину зоны деструкции, подсчитывали количество тучных клеток (общее, целых – Н, дегранулированных – Д). Определяли индекс их дегрануляции по формуле: $ID = D/(D + H)$. Выявлено, что очаг лазерной деструкции кожи, независимо от режима излучения, не имеет четкого деления на зоны. Ширина очага во всех случаях была достоверно меньше при использовании импульсного излучения. Через 1 сутки после деструкции количество всех форм тучных клеток было достоверно больше при импульсном режиме. Индекс дегрануляции тучных клеток был высоким при всех видах воздействия, в гиподерме – достоверно выше при импульсном режиме. *Ключевые слова:* непрерывное импульсное лазерное излучение, кожа, тучные клетки.

Morphological alterations in the skin after its destruction with continuous and pulsed high-intensity laser light were studied in the State Institute of Laser Surgery in Chelyabinsk (Russia). Superficial laser dermal destruction was performed in 20 rats (wavelength 970 μm; continuous mode, power 3 W; pulse average power 3 W, pulse and pause 50 msec). The studied parameters were examined in one hour and in one day after the irradiation. Histological, morphometric and statistical methods were used. Destruction area was measured, mast cell number was counted (total, intact – I, degranulated – D). Index of degranulation (ID) was determined as: $ID = D/(D + I)$. A skin lesion after laser destruction was found to have no well-defined zone division regardless of laser mode applied. The width of lesion was significantly less in all cases when pulsed laser was used. One day after the destruction the total number of mast cells of all forms was significantly higher after pulsed mode. A mast cell degranulation index was high in all irradiation modes, being significantly higher in hypodermis after pulsed irradiation. *Keywords:* continuous and pulsed laser light, skin, mast cell.

Актуальность

Широкое применение лазеров для хирургических манипуляций в дерматологии обусловлено исключительным разнообразием и распространением кожных патологий, а также быстрым прогрессом в увеличении надежности лазерной медицинской техники [6, 7]. Преимущества лазерных операций (возможность работы в анатомически сложных местах, минимальные повреждения, отсутствие кровотечения) обеспечиваются применением адекватных режимов лазерного пучка. Одним из важных факторов, определяющих степень воздействия лазерного излучения на биологическую ткань, является режим генерации. Актуальным остается экспериментальное обоснование эмпирически подобранных режимов для минимизации повреждений окружающих тканей и обеспечения хорошей репарации [3, 5]. Воспаление в ответ на лазерное повреждение является многоступенчатым процессом, регулятором которого на разных этапах выступают различные клеточные ансамбли. Тучные клетки соединительной ткани обращают на себя внимание способностью уже в первые минуты отвечать на лазерное воздействие дегрануляцией с выбросом сосудистых медиаторов, факторов роста и цитокинов, привлекающих другие клеточные популяции в зону повреждения [1, 9]. Выраженность морфофункциональных изменений тучных клеток проявляет зависимость от параметров лазерного воздействия [4]. Затем, в течение первых суток, происходит активация

популяции мононуклеарных фагоцитов, которым принадлежит существенная роль в дальнейшей репарации лазерной раны [2, 3].

Целью работы являлось сравнительное исследование морфофункциональных изменений тканей в области поверхностной деструкции кожи вследствие воздействия высокоинтенсивного лазерного излучения в непрерывном и импульсном режиме генерации.

Материал и методы исследования

Эксперименты проводили на 20 беспородных крысах с применением полупроводникового лазера с длиной волны излучения 0,97 мкм (лазерный скальпель ЛС-0,97 – «ИРЭ-Полкус», г. Фрязино, Россия). Мощность излучения в непрерывном режиме – 3 Вт и средняя мощность в импульсном режиме – 3 Вт (длительность импульса и паузы – 50 мс). Доставку излучения осуществляли через моноволоконный световод диаметром 600 мкм. Производили поверхностную деструкцию кожи контактным способом по трафарету (площадь 16 мм²) глубиной 1 мм. Обрабатывали симметричные относительно позвоночника участки (на расстоянии 1 см от него), шерсть предварительно состригали. Животных выводили из эксперимента через 1 час и 1 сутки.

Морфологические изменения в тканях изучали на парафиновых срезах после окрашивания гематоксилином-эозином и толудиновым синим с pH 2,0. Микроскопическое изучение гистологических срезов проводили

на микроскопе Leica DMRXA (Германия). Морфометрическое исследование осуществляли с помощью компьютерной программы анализа изображений «ДиаМорф Cito_W», (Москва, Россия). Произведено измерение ширины зоны деструкции, подсчет общего количества, количества целых и дегранулированных тучных клеток и индекс их дегрануляции. Индекс дегрануляции рассчитывали по формуле: $ИД = (Д + Н)/Н$, где Д – количество дегранулированных, Н – количество недегранулированных тучных клеток.

Полученные данные подвергали статистической обработке методами вариационной статистики с помощью программы Statistica 6. Рассчитывали коэффициент достоверности t Стьюдента и доверительную вероятность Р. Различия считали достоверными при $P < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение

Микроскопическое исследование через 1 час после эксперимента показало, что очаг лазерной деструкции кожи с тонким роговым слоем при обоих видах воздействия не имел четкого деления на зоны. При использовании непрерывного лазерного излучения очаг

термического воздействия включал в себя эпидермис с роговым слоем, дерму и поверхностный слой гиподермы, а при импульсном режиме – эпидермис с роговым слоем, поверхностные и средние слои дермы (рис. 1, а, б). В роговом слое и в эпидермисе при обоих видах воздействия определялись множественные разрывы и мелкие пустоты (рис. 1, г). Клетки эпидермиса в этой области были веретеновидной формы, значительно уменьшены в объеме, ядра их густо закрашены, вытянуты, переориентированы в виде фигур «метелок» и «щеток». Сосочки дермы сглажены, коллагеновые волокна гомогенизированы, сближены между собой, наблюдались утрата извитости и нарушение восприятия окраски в сторону усиления сродства к основным красителям. Граница с неповрежденной тканью через 1 час после лазерного воздействия была выражена неотчетливо. В пограничной зоне выявлялся умеренный отек и набухание соединительнотканых волокон и полнокровие капилляров и вен. Ширина зоны первичного термического повреждения при использовании непрерывного режима лазерного излучения была значительно больше, чем при использовании импульсного режима (табл. 1).

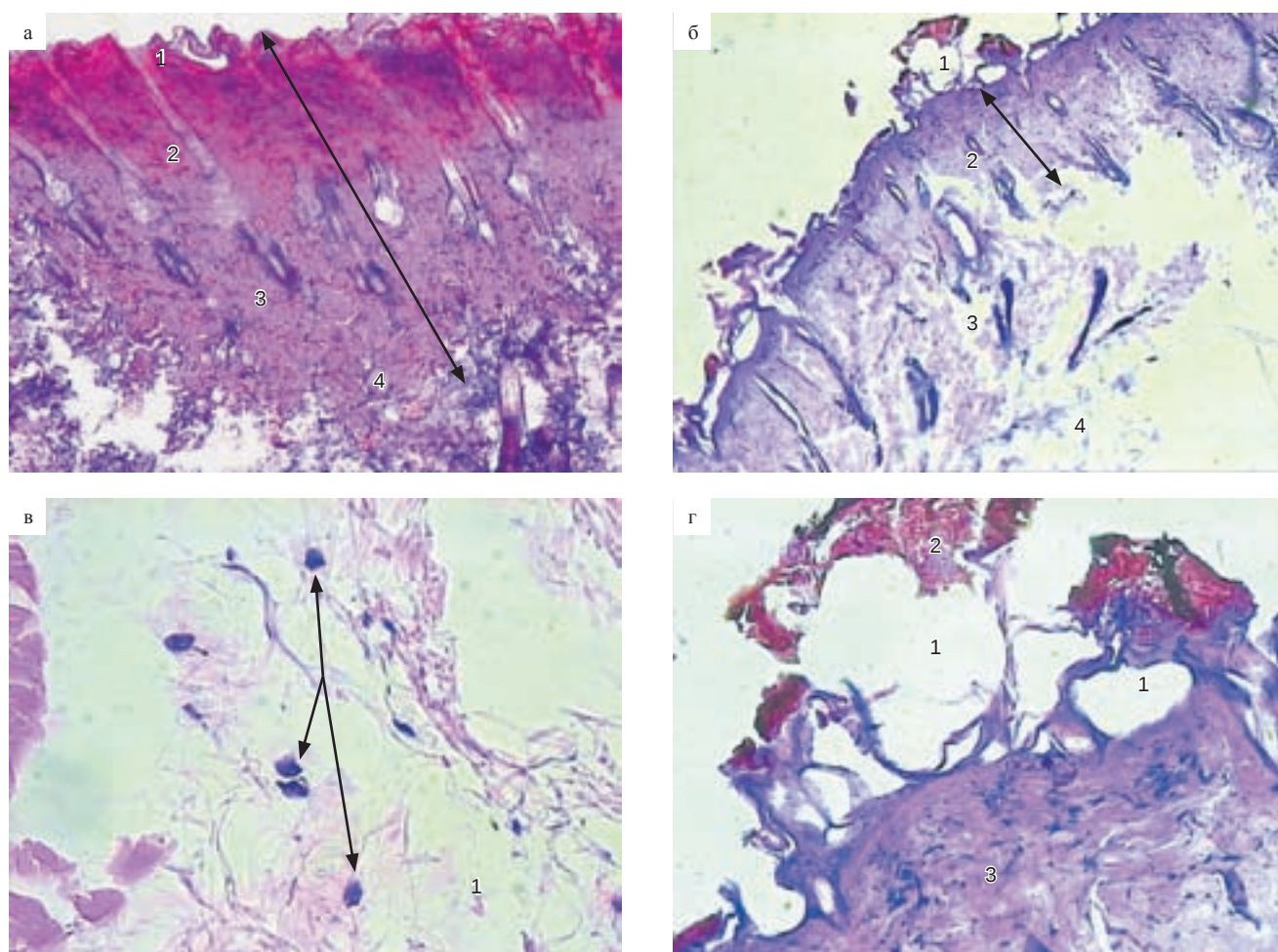


Рис. 1. Морфологическая картина в коже с тонким роговым слоем через 1 час после лазерного воздействия: а – непрерывный режим лазерного излучения: зона первичного термического воздействия (отмечена стрелкой) включает в себя эпидермис (1), поверхностные (2) и глубокие (3) слои дермы, а также участок гиподермы (4); ув. $\times 100$; б – импульсный режим лазерного излучения: зона первичного термического воздействия (отмечена стрелкой) включает в себя эпидермис (1) и поверхностные слои дермы (2); в глубоких слоях дермы (3) и в гиподерме (4) отсутствуют светооптические морфологические признаки термического воздействия на ткань; ув. $\times 100$; в – непрерывный режим лазерного излучения: дегранулированные тучные клетки (стрелки) в гиподерме (1), ув. $\times 400$; г – деталь рис. 1, б – множественные мелкие разрывы и пустоты (1) в роговом слое (2) и эпидермисе (3), ув. $\times 400$. Окраска: а, б, г – гематоксиллин-эозин, в – толуидиновый синий с рН 2,0

Таблица 1
Ширина зоны первичного термического повреждения
в коже крыс через 1 час и 1 сутки после лазерного
воздействия в непрерывном и импульсном режиме, М ± m

Режим генерации лазерного излучения	Ширина зоны первичного термического повреждения, мкм	
	1 час	1 сутки
Непрерывный	572,27 ± 11,74	588,17 ± 32,47
Импульсный	243,61 ± 3,96*	263,28 ± 11,68*

Примечание. * – $P < 0,05$ по сравнению с непрерывным режимом.

Спустя 1 сутки после лазерного воздействия существенной динамики в состоянии эпидермиса и дермы (в области деструкции) не было выявлено. Граница между неповрежденными тканями и зоной лазерного воздействия становилась более четкой (рис. 2, а, б). В пограничной зоне определялось паретическое полнокровие капилляров и вен с картиной лейкостазов и миграцией лейкоцитов за пределы сосудистых стенок с формированием лейкоцитарного демаркационного вала, отграничивающего очаг лазерного воздействия от окружающих тканей (рис. 2, в, г). При использовании непрерывного режима излучения под зоной первичного термического воздействия (включающей в себя эпидермис и дерму) оп-

ределялся довольно обширный очаг некроза в глубоких слоях собственно дермы и в гиподерме. При использовании импульсного режима зона некроза была выражена не всегда, и граница с неповрежденными тканями была существенно уже. По сравнению с предыдущим сроком исследования ширина зоны лазерного воздействия достоверно не изменялась (табл. 1).

Через 1 час после деструкции тучные клетки в коже локализовались в собственно дерме и в особенно больших количествах – в гиподерме, на границе с мышечным пластом (рис. 1, в). Подсчет количества тучных клеток осуществляли в зоне непосредственного лазерного воздействия, в перифокальной (пограничной) зоне и в гиподерме в проекции очага лазерного воздействия, так как там тучные клетки создают физиологически значимое скопление. В перифокальную зону входили все слои кожи. В очагах лазерной деструкции, независимо от режима воздействия, тучные клетки были преимущественно в дегранулированном состоянии, а их количество увеличивалось по направлению от центра к периферии очагов. При этом как общее количество тучных клеток, так и количество их дегранулированных и целых форм в перифокальных зонах и в гиподерме через 1 час

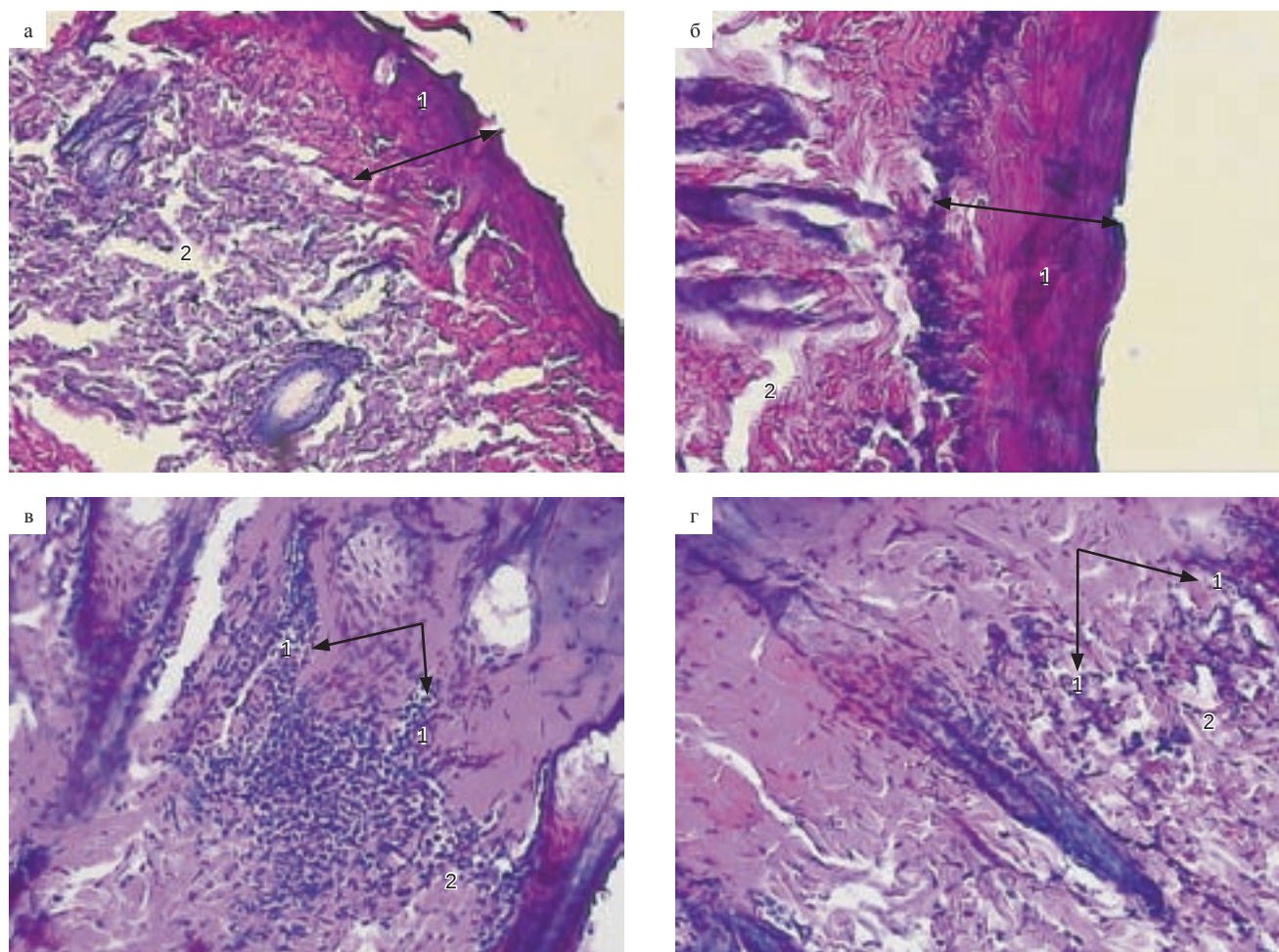


Рис. 2. Морфологическая картина в коже с тонким роговым слоем через 1 сутки после лазерного воздействия: а – непрерывный режим: отчетливая граница между очагом лазерного воздействия (1) и неповрежденной гиподермой (2); ув. $\times 200$; б – импульсный режим: отчетливая граница между очагом лазерного воздействия (1) и неповрежденными глубокими слоями дермы (2); ув. $\times 400$; в – непрерывный режим, густой демаркационный лейкоцитарный вал (1) в перифокальной зоне (2), ув. $\times 400$; г – импульсный режим, слабо выраженный демаркационный лейкоцитарный вал (1) в перифокальной зоне (2), ув. $\times 400$. Окраска: гематоксилин-эозин

после лазерного воздействия было достоверно больше при использовании непрерывного режима (табл. 2–4). Индекс дегрануляции тучных клеток в вышеуказанных структурных образованиях кожи также был достоверно выше при использовании непрерывного режима лазерного излучения (табл. 5).

Реакция тучных клеток на лазерное воздействие через 1 сутки после облучения существенно отличалась от предыдущего срока исследования. При использовании импульсного излучения общее количество, количество дегранулированных и целых форм тучных клеток значительно увеличилось, при применении непрерывного режима – уменьшилось (табл. 2–4). Индекс дегрануляции тучных клеток при деструкции импульсным излучением в эпидермисе, дерме, перифокальной зоне был достоверно меньше, а в гиподерме – выше, чем при использовании непрерывного режима (табл. 5). Таким образом, на этом сроке исследования отмечалась выраженная активация тучных клеток при воздействии импульсным излучением.

Из результатов опубликованных исследований известно, что очаг лазерного воздействия на биологические ткани имеет зональное строение [3, 5]. Однако нами выявлено, что в коже нет четкого деления очага деструкции на зоны. На наш взгляд, эта особенность связана со сложным многослойным строением кожи, оптическая неоднородность ее структур обуславливает неравномерность распределения лазерной и тепловой энергии [4]. Несмотря на особенности структуры очага деструкции, более обширные повреждения наблюдались при применении непрерывного лазерного излучения (табл. 1). Если при импульсном воздействии очаг термического повреждения включал в себя только эпидермис с роговым слоем, поверхностные и средние слои дермы, то при использовании непрерывного излучения он распространялся через все слои кожи, захватывая и поверхностные слои гиподермы.

Реакция тучных клеток через 1 час после воздействия характеризовалась большим количеством тучных клеток

Таблица 2

Общее количество тучных клеток в 1 мм² гистологического среза кожи крыс через 1 час и 1 сутки после лазерного воздействия в непрерывном и импульсном режиме, М ± m

Режим генерации лазерного излучения	Эпидермис	Дерма	Перифокальная зона	Гиподерма в проекции очага лазерного воздействия
Непрерывный, 1 час	68,98 ± 4,40	157,03 ± 11,49	206,93 ± 14,65	567,96 ± 21,39
Импульсный, 1 час	72,65 ± 6,70	123,50 ± 13,83*	141,26 ± 11,80*	441,66 ± 25,41*
Непрерывный, 1 сутки	60,54 ± 2,76	94,44 ± 5,6	109,78 ± 8,61	411,66 ± 30,06
Импульсный, 1 сутки	67,80 ± 3,65	136,41 ± 13,04*	187,27 ± 11,67*	575,52 ± 64,87*

Примечание. * – P < 0,05 по сравнению с непрерывным режимом.

Таблица 3

Количество целых тучных клеток в 1 мм² гистологического среза кожи крыс через 1 час и 1 сутки после лазерного воздействия в непрерывном и импульсном режиме, М ± m

Режим генерации лазерного излучения	Эпидермис	Дерма	Перифокальная зона	Гиподерма в проекции очага лазерного воздействия
Непрерывный, 1 час	2,94 ± 1,23	46,23 ± 4,88	62,37 ± 5,45	398,45 ± 14,73
Импульсный, 1 час	4,84 ± 1,78	35,52 ± 4,20	52,47 ± 6,73	308,34 ± 16,62*
Непрерывный, 1 сутки	0,00 ± 0,00	28,25 ± 2,17	32,29 ± 2,69	311,57 ± 23,34
Импульсный, 1 сутки	1,67 ± 1,08	43,59 ± 4,84	59,73 ± 3,26	404,40 ± 38,55*

Примечание. * – P < 0,05 по сравнению с непрерывным режимом.

Таблица 4

Количество дегранулированных тучных клеток в 1 мм² гистологического среза кожи крыс через 1 час и 1 сутки после лазерного воздействия в непрерывном и импульсном режиме

Режим генерации лазерного излучения	Эпидермис	Дерма	Перифокальная зона	Гиподерма в проекции очага лазерного воздействия
Непрерывный, 1 час	66,04 ± 4,33	110,80 ± 8,51	144,56 ± 11,12	169,51 ± 12,83
Импульсный, 1 час	67,80 ± 6,16	87,98 ± 10,10	88,79 ± 5,89*	103,32 ± 9,83*
Непрерывный, 1 сутки	60,54 ± 2,76	66,19 ± 3,78	77,49 ± 6,04	100,09 ± 9,18
Импульсный, 1 сутки	66,19 ± 6,16	92,83 ± 10,10	127,53 ± 5,89*	171,12 ± 9,83*

Примечание. * – P < 0,05 по сравнению с непрерывным режимом.

Таблица 5

Индекс дегрануляции тучных клеток в коже крыс через 1 час и 1 сутки после лазерного воздействия в непрерывном и импульсном режиме, М ± m

Режим генерации лазерного излучения	Эпидермис	Дерма	Перифокальная зона	Гиподерма в проекции очага лазерного воздействия
Непрерывный, 1 час	0,96 ± 0,02	0,71 ± 0,02	0,70 ± 0,02	0,30 ± 0,02
Импульсный, 1 час	0,94 ± 0,02	0,71 ± 0,01	0,64 ± 0,02*	0,25 ± 0,01*
Непрерывный, 1 сутки	1,00 ± 0,00	0,70 ± 0,01	0,71 ± 0,01	0,24 ± 0,01
Импульсный, 1 сутки	0,98 ± 0,01	0,68 ± 0,01	0,68 ± 0,01*	0,29 ± 0,02*

Примечание. * – P < 0,05 по сравнению с непрерывным режимом.

после применения непрерывного излучения по сравнению с импульсным (наибольшую разницу наблюдали в перифокальной зоне). В течение суток в этой зоне происходило значительное уменьшение количества тучных клеток при непрерывном излучении, а после действия импульсного оно увеличивалось (табл. 2). Уменьшение количества тучных клеток в зоне действия непрерывного излучения в течение 1 суток может быть связано с полной дегрануляцией и гибелью части тучных клеток, которые не выявлялись при окраске толудиновым синим с pH 2,0. Это подтверждается и другими исследованиями [1, 5].

Более выраженная активация тучных клеток в зоне повреждения импульсным излучением позволяет делать благоприятный прогноз относительно скорости процессов регенерации кожи. Разрушение тучных клеток при лазерном воздействии, увеличение их количества и дегрануляция приводят к повышению концентрации биологически активных веществ в окружающих тканях. Гепарин, находящийся в гранулах, стимулирует синтез структурных гликопротеинов и образование коллагеновых и эластических волокон соединительной ткани, защищает факторы роста от деградации [8–10]. Комплекс факторов роста, цитокинов и ферментов тучных клеток является базой для начальных этапов репарации тканей после лазерной деструкции. В дальнейшем тучные клетки способны взаимодействовать со всеми участвующими в воспалении клеточными популяциями, ведущими из которых являются мононуклеарные фагоциты, регулировать неоангиогенез и сосудистый тонус [1, 3].

Заключение

Меньшая ширина очага деструкции и более выраженная активация тучных клеток в ответ на действие импульсного лазерного излучения свидетельствует о меньшем термическом повреждении тканей (по сравнению с использованием непрерывного режима генера-

ции), что позволяет рекомендовать его для деструкции доброкачественных новообразований кожи и коррекции рубцов.

Литература

1. Головнева Е.С. Патофизиологические механизмы неоангиогенеза, индуцированного воздействием высокоинтенсивного лазерного излучения на ткани (экспер. исслед.): Автореф. дис. ... докт. мед. наук. Челябинск, 2003. 38 с.
2. Елисеев В.И., Скобелкин О.К., Титова Т.М. Морфология репаративных процессов после остановки желудочных кровотечений с помощью различных лазеров // Архив патологии. 1981. № 9. С. 43–49.
3. Елисеев В.И. Особенности заживления лазерных ран // Лазерная медицина. 2011. Т. 15. Вып. 2. С. 24.
4. Игнатьева Е.Н., Астахова Л.В., Головнева Е.С. Сравнительное исследование действия высокоинтенсивного лазерного излучения в непрерывном и импульсном режиме в поперечнополосатой мышечной ткани (экспер. исслед.) // Вестн. Челябинского гос. педагог. ун-ва. 2006. № 5. Часть 3. С. 242–250.
5. Козель А.И. и др. Обоснование применения лазерных технологий в хирургии (экспер. исслед. с внедрением их в клиническую практику). Челябинск: ООО фирма «Пирс», 2009. 196 с.
6. Неворотин А.И., Красников А.Г., Плотнова О.В. Полупроводниковый лазер: экспериментальное обоснование оптимального режима работы // Современные достижения лазерной медицины и их применение в практическом здравоохранении: Мат. науч.-практ. конф., Москва, 5–6 окт. 2006. М., 2006. С. 199–200.
7. Потехаев Н.Н., Круглова Л.С. Лазер в дерматологии и косметологии. М.: МВД, 2012. 280 с.
8. Buckwalter J.B., Curtis V.C., Ruble S.B. Laser revascularization of ischemic skeletal muscle // J. Surg. Res. 2003. Vol. 115. № 2. P. 257–321.
9. Golovneva E.S. Expression of basic fibroblast growth factor in the course of neoangiogenesis stimulated by high intensity laser irradiation // Bull. of Exper. Biol. and Med. 2002. T. 134. № 1. С. 95–97.
10. Reiser C., Biamino G. Eximer laser assisted angioplasty for the treatment of critical limb ischemia // J. Cardiovasc. Surg. 2004. Vol. 45. № 3. P. 239–287.

Поступила в редакцию 21.05.2015 г.

Для контактов: Астахова Людмила Витальевна
Тел. 8 (351) 749-97-46