

ЛИТЕРАТУРА

1. Общая анатомия лимфатической системы / Под ред. Ю. И. Бородина, М. Р. Сапина, Л. Е. Этингена и др. — Новосибирск: Наука СО РАМН, 1990.
2. *Петренко В. М.* Функциональная морфология лимфатических сосудов. — СПб.: Изд-во ДЕАН, 2008.
3. *Поташов Л. В., Орлов Р. С., Бубнова Н. А.* и др. Хирургическая лимфология. — СПб.: Изд-во ЛЭТИ, 2002.

Петрова М. Б., Павлова Н. В., Харитонова Е. А., Шестакова В. Г.

ВОЗДЕЙСТВИЕ КРАСНОГО И ИНФРАКРАСНОГО ИМПУЛЬСНЫХ ЛАЗЕРОВ НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ИНФИЦИРОВАННЫХ РАН

*Кафедра биологии (заведующий — д-р биол. наук М. Б. Петрова)
Тверской медицинской академии*

Результаты наших исследований показали, что эффективность воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения значительно возрастает при применении фотосенсибилизирующего вещества в большей степени при ИК-излучении, что подтверждают данные гистологических исследований. При этом выявлена неоднозначная ферментативная реакция *St. aureus* на лазерное облучение, свидетельствующая об их широких адаптационных возможностях. Не выявлено преимуществ раздельного применения красного импульсного излучения в эксперименте по сравнению с инфракрасным, что свидетельствует о необходимости более широкого изучения вариантов сочетанного использования лазеров с различными диапазонами генерируемого излучения.

Целью нашего исследования было изучение сравнительного влияния полупроводникового лазера длиной волны красного диапазона ($\lambda = 0,63$ мкм), работающего в импульсном режиме ($f = 80$ Гц и $f = 3000$ Гц), и инфракрасного излучения ($\lambda = 0,89$ мкм, $f = 80$ Гц) на жизнеспособность 16 видов грамположительных (*St. aureus*, *Candida parapsilosis*, *Candida crusea*, *Acinetobacter anitratus*, и др.) и грамотрицательных (*Pseudomonas maltophilia*, *Ps. putida*, *Hafnia alvei*, *Rhododorus* и др.) микроорганизмов *in vitro* и *in vivo* в чистом виде и с применением специального фотосенсибилизатора на основе метиленовой сини. Параметры лазерного излучения как *in vitro*, так и *in vivo* были идентичными, а именно: время облучения инфракрасного лазера (ИК лазера) составляло 4 мин, $P_{\max} = 10$ Вт с разовой дозой облучения $0,02$ Дж/см²; время облучения красного импульсного лазера также было 4 мин, $P_{\max} = 5$ Вт с разовой дозой облучения при $f = 80$ Гц — $0,01$ Дж/см², а при $f = 3000$ Гц — $0,4$ Дж/см². Расчет доз — по таблицам В. И. Козлова и В. А. Буйлина [1, 2, 3, 4].

Материалы и методика. В экспериментах на животных (45 крыс линии «Вистар» средним весом 120 г) использовали *St. aureus* штамм 236, обладающий повышенной жизнестойкостью и выраженной патогенностью. На спине у крыс под эфирным наркозом в межлопаточной области делали скальпированную открытую рану размером 1×1 см. В нее вводили суточную суспензию *St. aureus*, соответствующую стандарту мутности № 6 по Mc Farland. Через 3 дня формировался воспалительный процесс. Все обследуемые животные были разбиты на 5 групп (по 9 крыс в каждой) в зависимости от применения лазеров различных длин волн и фотосенсибилизаторо-

ра (ФС). Для изучения морфологических изменений в ходе репаративной регенерации ран кожи использовались стандартные гистологические методики.

Результаты исследования и их обсуждение. Эксперимент проводили в два этапа. Вначале исследовали действие НИЛИ длин волн различного диапазона на жизнеспособность микробных клеток и активность их ферментных систем при действии лазера в чистом виде и после предварительной обработки культур специальным фотосенсибилизатором.

Было установлено, что полупроводниковые лазеры красного и ИК диапазонов не влияли на изменение жизнедеятельности и патогенности исследуемых микроорганизмов. В то же время предварительная обработка бактерий фотосенсибилизатором перед лазерным воздействием не только значительно уменьшала их количество на 2–6 порядков, но и в некоторых случаях способствовала выраженному бактерицидному эффекту. При этом результаты облучения были неоднозначными. Так, количество грамотрицательных бактерий, обработанных фотосенсибилизатором в суббактериостатической концентрации, снижалось с $5 \cdot 10^9$ КОЕ/г до $1 \cdot 10^2$ КОЕ/г как при использовании ИК излучения, так и красного импульсного лазера в одинаковой степени при частоте 80 Гц и 3000 Гц. Однако 100 % гибель золотистого стафилококка, нагруженного фотосенсибилизатором, вызывало только ИК излучение. В то же время красный импульсный лазер при воздействии на данный штамм, независимо от частоты излучения, лишь уменьшал их количество.

Контрольную группу составили крысы, раны которых обрабатывались только фотосенсибилизатором без применения лазера. Раны животных первой и второй групп обрабатывались ФС и подвергались воздействию импульсного НИЛИ соответственно красного и инфракрасного диапазонов с вышепредставленными параметрами. При облучении животных третьей и четвертой групп использовались идентичные параметры лазерного излучения, но раны не обрабатывались фотосенсибилизатором. Курс НИЛИ проводился в течение 5 дней. Эффективность воздействия оценивали по изменению культуры бактерий, взятой из раны до и после лазерной обработки.

В результате проведенных исследований установлено, что в третьей и четвертой группах количество выделенных из биоптата штаммов *St. aureus* после применения импульсного НИЛИ красного и инфракрасного диапазонов было таким же, как и в контрольной группе. У крыс первой группы также не снижалось количество бактерий по сравнению с контролем. В то же время ИК лазер во второй группе крыс достоверно снижал количество *St. aureus* в биоптатах в 2–4 раза ($p < 0,05$).

Результаты микробиологического анализа содержимого ран экспериментальных животных коррелируют с микроскопическими изменениями, происходящими в области повреждения [4, 5].

Через 7 дней после операции раны животных, подвергнутых когерентной иррадиации, покрыты струпом, в составе которого четко различаются два компонента: выпот плазмы и слой некротизированных клеток. Толщина струпа составляет $324,9 \pm 31,9$ мкм. Под ним располагается лейкоцитарный вал, представленный нейтрофильными лейкоцитами, большинство которых, особенно в верхних слоях, находятся на стадии физиологической дегенерации. Область раневого дефекта выполнена грануляционной тканью, формирование которой осуществляется от краев повреждения к центру раны, поэтому молодая ткань располагается очагами и отличается полиморфизмом клеточных элементов, среди которых встречаются

нейтрофильные лейкоциты, макрофаги и гистиоциты. Основу грануляционной ткани составляют вертикально расположенные капилляры, стенка которых состоит из одного слоя эндотелиальных клеток. Малодифференцированные фибробласты ориентированы в различных направлениях и лишь в глубоких слоях грануляций они принимают более упорядоченное расположение параллельно поверхности раны.

Дефект в центре повреждения чаще всего представлен жировой клетчаткой, которая поднимается почти к поверхности раны. Формирующаяся ткань выглядит отечной, отчетливо выраженная лейкоцитарная инфильтрация наблюдается не только в поверхностных слоях раны, но и в области ее дна. Одновременно с образованием молодой ткани начинается эпителизация раны. Эпителиальный регенерат представлен 6–7 слоями клеток, имеет небольшую протяженность ($431,2 \pm 27,9$ мкм), а базальная мембрана местами разрушена.

У животных, облученных ИК лазером с использованием ФС, течение посттравматической регенерации было более благоприятным, что находит отражение в морфологическом строении всех структур полнослойного дефекта. У крыс данной серии через 7 дней после травмы рана покрыта струпом, толщина которого значительно меньше, чем у животных предыдущей серии. Более узкий лейкоцитарный вал содержит в основном фагоцитирующие макрофаги и находящиеся на стадии физиологической дегенерации нейтрофилы. Толщина лейкоцитарного вала составляет $69,4 \pm 11,5$ мкм против $83,7 \pm 16,7$ мкм у облученных животных.

Грануляционная ткань животных этой серии имеет очаговый характер расположения, но занимает большую площадь, чем у только облученных красным и инфракрасным лазером. Кроме того, изменяется количественный состав грануляционной ткани: существенно уменьшается количество круглоклеточных элементов гематогенного происхождения с одновременным увеличением числа фибробластов и кровеносных сосудов. Фибробласты имеют многоотростчатую форму и содержат крупные ядра. Они ориентируются параллельно поверхности раны, что наиболее ярко выражено в периферических участках и глубоких слоях раневого дефекта. Около фибробластов в межклеточном веществе располагаются коллагеновые волокна, которые агрегируются в пучки.

Другой особенностью грануляционной ткани животных описываемой серии является отсутствие отека и лейкоцитарной инфильтрации, поэтому сформированная ткань создает благоприятные условия для развития эпителия. Он покрывает раневую поверхность на значительном протяжении ($714,3 \pm 52,6$ мкм), причем толщина эпителиального клина почти в 1,5 раза больше, чем у облученных животных без использования ФС.

Различия, отмеченные у животных данных серий через 7 дней, более ярко проявляются на поздних этапах регенерации [3, 4, 6]. В серии крыс, облучавшихся красным и ИК лазером, к 21-му дню наблюдения раны покрыты эпителием, состоящим из нескольких слоев слабодифференцированных клеток. В отдельных случаях сохраняются фрагменты струпа, под которым эпителий имеет небольшую толщину. Молодая соединительная ткань имеет типичное строение и состоит из горизонтально ориентированных фибробластов, между которыми располагаются многочисленные коллагеновые волокна.

В этот же период исследования у животных, получавших ИК лазеротерапию в сочетании с ФС, область раны представлена рубцом типичной структуры. Область дефекта замещена более зрелой по сравнению с контролем соединительной

тканью, которая приобретает вид дермы. Клеточные элементы представлены фибробластами, тучными клетками, гистиоцитами, макрофагами. Эпителиальный регенерат дифференцирован на слои. Базальная мембрана молодого эпителия образует множество выростов в подлежащую соединительную ткань различной длины и формы. В них формируются волосяные фолликулы и сальные железы.

Применение ИК лазера в сочетании с ФС приводит к благоприятным изменениям как внешнего вида ран, так и структуры регенерата. Грануляционная ткань начинает развиваться лишь в краевых участках и отдельными очагами в области дна раны, толщина ее составляет $385,2 \pm 23,7$ мкм (табл. 1). Формирующаяся ткань бедна новообразованными сосудами и клеточными элементами, особенно соединительнотканного происхождения. Между очагами грануляционной ткани располагается жировая клетчатка и бессосудистые поля межтучного вещества.

Таблица 1

ВЕЛИЧИНА РАЗЛИЧНЫХ СТРУКТУР ЗАЖИВАЮЩИХ РАН
ЧЕРЕЗ 7 ДНЕЙ ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ (В МКМ)

Серии	$M \pm m$	Струп	Лейкоцитарный вал	Грануляционная ткань	Эпителий на границе	Толщина регенерата	Протяженность регенерата
ФС	$M \pm m$	481,8 27,2	142,3 18,5	385,2 23,7	69,3 6,7	21,4 5,6	391,7 29,1
ИК лазер + ФС	$M \pm m$	396,5 34,9	119,6 20,1	523,7* 21,1	98,6* 5,1	42,3* 6,6	659,6* 31,2

* $p < 0,05$.

Через 7 дней после операции рана у животных, подвергавшихся воздействию ИК лазера и ФС, покрыта однородным по своему составу и плотно спаянным с подлежащими тканями струпом. Лейкоцитарный вал несколько уже, чем у животных контрольной группы ($119,6 \pm 20,1$ мкм против $142,3 \pm 18,5$ мкм). В поверхностных слоях лейкоцитарного вала отмечаются в основном разрушенные нейтрофильные лейкоциты, тогда как более глубокие слои представлены активно фагоцитирующими нейтрофилами нормальной структуры. Наблюдается резкое снижение количества микроорганизмов.

Грануляционная ткань, толщина которой существенно превышает аналогичный показатель в контроле ($523,7 \pm 21,1$ мкм против $385,2 \pm 23,7$ мкм соответственно), представлена вертикально расположенными сосудистыми петлями и горизонтально ориентированными фибробластами. У животных, облученных ИК лазером с использованием ФС, преобладают клетки фибробластического ряда, причем в области ее дна их количество почти в 2 раза больше, чем у облученных животных без применения ФС. Фибробласты имеют многоотростчатую форму, четко оформленное ядро, ориентированное вдоль оси клетки. В межклеточных пространствах около фибробластов выявляется большое количество коллагеновых фибрилл, которые в некоторых участках формируют горизонтально ориентированные пучки, что свидетельствует об определенной степени зрелости грануляционной ткани и начальных этапах ее трансформации в соединительную. Эпителиальный клин, нарастающий по молодой ткани, имеет протяженность в 1,7 раза большую, чем у животных сравнимой серии, и состоит из 5–6 рядов клеток.

Значительные отличия между животными сравниваемых серий обнаружены при изучении микроструктур заживающих ран на поздних этапах заживления. У животных, на раны которых наносили ФС, через 21 день происходит почти полная эпителизация раневой поверхности. У отдельных животных неэпителизованным остается небольшой участок в центре раны. Эпителий утолщен и представлен 6–8 рядами клеток. Молодая соединительная ткань имеет типичное строение со всеми присущими ей клеточными и волокнистыми компонентами, однако сохраняет еще значительное количество сосудов.

Раны животных, находившихся в условиях сочетанного применения ИК лазера и ФС, через 21 день наблюдения были полностью покрыты новообразованным эпителием, причем его структура и толщина мало отличались от неповрежденного эпидермиса. Базальная мембрана молодого эпителия образует большое количество различной длины и формы выростов в подлежащую соединительную ткань. Под эпителием располагается развитая соединительная ткань, в которой практически отсутствуют кровеносные сосуды и содержится большое количество зрелых коллагеновых волокон. Усиливается контракция раны, базальная мембрана новообразованного эпителия неровная, происходит образование специфических структур кожи. Нами установлено, что в условиях применения ИК лазера в сочетании с ФС изменяются скорость и характер осуществления отдельных этапов посттравматической регенерации инфицированных ран кожи, что приводит к сокращению общих сроков заживления на 3 дня.

Таким образом, результаты нашего исследования показали, что эффективность воздействия низкоинтенсивного лазерного излучения значительно возрастает при применении фотосенсибилизирующего вещества в большей степени при ИК-излучении, что подтверждают данные гистологических исследований. При этом выявлена неоднозначная ферментативная реакция *St. aureus* на лазерное облучение, свидетельствующая об их широких адаптационных возможностях, что требует дальнейшего изучения и объяснения. Результаты нашего исследования не выявили преимуществ отдельного применения красного импульсного излучения в эксперименте по сравнению с инфракрасным, что свидетельствует о необходимости более широкого изучения вариантов сочетанного использования различных видов лазеров.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов В. И. Лазеротерапия. — М., 1992.
2. Корепанов В. И. Теория и практика лазерной терапии. — М.: НПП РАПИД, 1993.
3. Павлова Н. В. Морфологические аспекты посттравматической регенерации кожи в условиях воздействия магнитолазерной терапии: Автореф. дисс. ...канд. мед. наук. — Тверь, 1996
4. Петрова М. Б. Физико-химические аспекты воздействия гелий-неонового лазера на биологические системы: Автореф. дис. ...канд. хим. наук. — Тверь, 1993.
5. Харитонова Е. А. Особенности динамики фосфоинозитидов в крови и грануляционной ткани при заживлении ран кожи в условиях применения гиалуроновой кислоты: Автореф. дисс. ...канд. биол. наук. — Тверь, 1997.
6. Capon A., Mordon S. Can thermal lasers promote skin wound healing? // *Am. J. Clin. Dermatol.* 2003. V. 4. № 1. P. 1–12.