

рение органы, покровные ткани и скелетные мышцы в целостный (мягкий) фиброзный скелет организма, принимают участие в создании формы тела. Согласованную работу по обеспечению мышц пластическими веществами, кислородом и микроэлементами (кальцием, фосфором и др.), освобождение их от продуктов обмена, поддержание мышечного тонуса выполняет *соединительная ткань*. Химические и электрические процессы передачи нервного импульса через медиатор и ионный поток протекают через жидкости в синапсах, так как у нервных волокон нет прямых контактов с мышечными.

Оптимальную функцию мышц обеспечивают: адекватная трофическая функция соединительнотканной стромы (поставка пластических веществ и кислорода, удаление углекислоты и метаболитов); поставка ионов фосфора, калия в мышцу, кальция и натрия в синаптическую щель для поддержания ионной асимметрии; достаточное количество свободной жидкости в синаптической щели и в фасциальном футляре для электрических и биохимических процессов передачи нервно-мышечного импульса, аксонального тока, активного ионного транспорта (одинаково вредны обезвоженность и наводненность); подвижность фасциальных листов (поверхностного, относящегося к кожным покровам, и собственного, связанного с мышцами) относительно друг друга для обеспечения необходимого скольжения мышцы при ее работе, адекватное соотношение длины фасциального футляра длине мышцы [6].

Сосуды – соединительно-тканые образования, образованные мышечной тканью мезенхимного происхождения. Сосуды укреплены в окружающих тканях соединительно-ткаными волокнами и представляют собой своеобразный внутриорганный скелет. Транскапиллярный обмен зависит от физико-химических свойств вещества соединительной ткани и тучных клеток, которые содержат местные регулирующие факторы – гистамин, серотонин, гепарин, гиалуронидазу, протеолитические ферменты, влияющие на процессы фильтрации, диффузии и осмоса.

Соединительная ткань связывает между собой все ткани организма, заполняет пустоты, образует формы и объемы структур, соединяет организм в единое целое, обеспечивает единство структуры и функции. Она служит механическим каркасом скелета, создает футляры для всех внутренних органов, мышц, сосудов и клеточных микроструктур. Но механическая функция – не единственная функция соединительной ткани. Эта ткань является интеграционной по отношению к функционированию всех систем жизнеобеспечения организма. Она интегрирует функции этих систем по доставке к паренхиме тканей кислорода, пластических веществ и удалению метаболитов, поддерживает непрерывность обмена, являясь тканью внутренней среды.

Мануальная диагностика и лечение. Специфическая мануальная диагностика направлена на выявление структурно-функциональных нарушений в соединительнотканной системе, которые могут проявляться нарушениями пространственного расположения костных структур, деструктивными изменениями с ограничением их подвижности, укорочением или перерастяжением структур сухожильно-связочно-фасциального комплекса, что дестабилизирует статико-динамическую работу мышц и двигательный стереотип в целом. Уменьшение просвета межпозвоноковых и других костных отверстий, межмышечных каналов, фиксации фасциальных листов приводят к формированию компрессионных неврологических и сосудистых синдромов, перераспределению (затеканию) тканевой жидкости в направлении смещения центра тяжести от вертикальной оси, застойным явлениям в полостях туловища и зашлакованности эндозоологического пространства клеток [5, 6]. Предметом изучения мануальной медицины являются патобиомеханические и метаболические дисфункции соединительной ткани в разных ее взаимоотношениях с другими тканями. Мануальная терапия насчитывает в своем арсенале около 600 различных техник, направленных на коррекцию основных патобиомеханических нарушений – функциональных костно-суставных блоков; регионального постурального дисбаланса мышц, складывающегося из укороченных и расслабленных мышц в пределах позвоночного двигательного сегмента и/или в пределах продольных мышечных синергий; а также миофасциальных триггерных точек. Послойное структурирование тканей с восстановлением подвижности фасциальных листов, длины мышечных футляров и тонусно-силового баланса мышц, объемов полостей туловища, подвижности ребер, физио-

логических изгибов позвоночника, пространственного положения позвонков и равномерной гравитационной нагрузки на все костные структуры позволяет улучшить работу как клеточных микро-систем, так и основных функциональных систем макроорганизма. По закону «внешнее-внутреннее», воздействие не покровные ткани улучшает работу внутренних органов, создавая более оптимальные условия для их функционирования, так как для здоровья человека в целом необходимо сохранение вертикальной оси туловища и беспрепятственная циркуляция жидкостей, особенно внесосудистого сектора [7].

Заключение. Цель настоящего сообщения – на основе краткого анатомо-физиологического анализа особенностей соединительной ткани ОДС привлечь внимание к визуально-пальпаторным методам диагностики с целью выявления предрасположенности к патологическим процессам на доонтологическом этапе, когда функциональные системы работают в форсированном или угнетенном режиме (вместо того, чтобы ставить диагноз «у постели больного», на этапе срыва адаптации). Мануальная терапия – одна из немногих нелекарственных восстановительных методик, позволяющих активизировать механизмы саногенеза за счет восстановления оптимальности основных функций ткани – формообразующей, обменно-трофической, иммунной, информационной и гомеостатической. Мануальная терапия – терапия дисфункций соединительной ткани, от которой зависит здоровье других тканей – мышечной, нервной, эпителиальной. Широкие возможности в диагностическом, терапевтическом и прогностическом плане выводят мануальную медицину на уровень междисциплинарного направления, рассматривающего человека с позиций целостности.

Литература

1. Васильева Л.Ф. Мануальная диагностика и терапия (клиническая биомеханика и патобиомеханика). Рук-во для врачей.– СПб: Фолиант, 1999.– 398 с.
2. Сител А.Б. // Тез. I съезда мануальных терапевтов России.– М., 1999.– С.14.
3. Гистология: Учебник / Под ред. Ю.И. Афанасьева.– 5-е изд., перераб. и доп.– М.: Медицина, 1999.– 774 с.
4. Алексеев А.А. Новая медицина и биология: Клинико-энциклопедический анализ традиционной и нетрадиционной медицины. М., 1996.– 460 с.
5. Патент № 2167601, 61 Н 39/04, опубл. 27 марта 2001 в БИ № 15 / Способ оценки функционального состояния организма человека.
6. Сафоничева О.Г. а. // VII Междун. форум «Новые технологии восстановительной медицины».– Тунис, Хаммамет, 2002.– С. 396–399.
7. Сафоничева О.Г. // Тр. V междун. конф. АСВОМЕД.– Сочи, 11-15 мая 2002.– С.348–350.

УДК 612.67

НЕЛИНЕЙНЫЙ АНАЛИЗ ИЗМЕНЕНИЙ ДИНАМИКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОГО КРОВотоКА КОЖИ ЧЕЛОВЕКА В ПРОЦЕССЕ СТАРЕНИЯ

А.В. ТАНКАНАГ, И.В. ТИХОНОВА, Н.К. ЧЕМЕРИС*

Введение. С возрастом происходят функциональные и структурные изменения во всех системах организма, в том числе и в микроциркуляторном русле (МЦР). При старении развиваются гипоксические и ишемические процессы, обуславливающие изменение микроциркуляции и ухудшение трофического снабжения тканей и органов, а также происходит нарушение репаративных процессов [3, 10]. Эти изменения играют важную роль в патогенезе многих заболеваний [2]. Одним из современных и наиболее объективных методов оценки состояния МЦР является метод лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ) [8]. Данный метод позволяет изучать ряд обменно-динамических процессов в системе микроциркуляции и проводить неинвазивные исследования параметров

* Институт биофизики клетки РАН, Пущино

периферического кровотока, что важно для оценки состояния капиллярного кровотока, который изменяет свои характеристики при минимальном воздействии. В настоящее время для анализа сигналов, зарегистрированных методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ-грамм), в основном используются либо статистические методы обработки [15], либо спектральный анализ, основанный на Фурье-преобразовании [11] или вейвлет-преобразовании [13]. Ранее для исследования микроциркуляторных изменений в процессе старения мы использовали спектральный анализ ЛДФ-грамм на основе непрерывного вейвлет-преобразования [4–6]. Данный подход дает детальную оценку состояния и особенностей функционирования звеньев и систем регуляции микроциркуляции, но достаточно трудоемок и увеличивает затраты времени на обработку сигнала. Поэтому требуются методы, позволяющие проводить экспресс-оценку состояния периферического кровотока в режиме реального времени.

В последние годы для исследования медицинских сигналов, например, ЭКГ, электроэнцефалограмм и ряда других, чаще применяют методы нелинейного анализа [7, 9, 14]. Использование таких подходов при характеристике функционального состояния МЦР кожи представляется актуальным, т.к. они дают оценку функционального состояния МЦР фактически в реальном масштабе времени.

Цель исследования – оценка интегральных изменений функционального состояния МЦР кожи у условно здоровых испытуемых разного возраста на основе величины относительной энтропии и фрактальной размерности.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 122 условно здоровых добровольца в возрасте от 19 до 92 лет. Испытуемые были разделены на 5 возрастных групп (табл. 1). Все испытуемые воздерживались от курения, приема лекарственных препаратов, алкогольных и кофеинсодержащих напитков, по крайней мере за 12 часов до исследования. Все испытуемые давали согласие на участие в исследовании на основе полной информации о методе и ходе проведения процедуры.

Таблица 1
Основные характеристики групп исследуемых

	К-во (чел)	Возраст (лет)	АДС (мм рт. ст.)	АДД (мм рт. ст.)	ЧСС уд/мин
1 группа	26	21.0±0.3	111.1±1.5	69.1±1.4	68.8±2.4
2 группа	28	28.0±0.2	115.9±1.5	76.7±1.1	68.7±1.5
3 группа	22	39.0±0.1	116.0±2.2	74.4±2.0	68.9±2.5
4 группа	34	52.0±1.0	129.8±2.9	80.8±1.4	66.7±1.2
5 группа	12	77.0±2.0	149.6±5.6	79.2±2.5	71.3±4.9

Параметры микроциркуляции регистрировали при помощи одноканального лазерного анализатора капиллярного кровотока ЛАКК-01 (НПП «Лазма», Москва), позволяющего проводить зондирование ткани в видимой красной области спектра (длина волны 630 нм) в объеме 1 мм³ [2]. Регистрируемая характеристика капиллярного кровотока представляет собой показатель микроциркуляции (ПМ), который отражает объемную скорость эритроцитов в единицу времени.

Исследования проводили в тихом помещении при постоянной комнатной температуре 22–24°C. Измерения выполняли в положении испытуемого лежа на спине. ЛДФ-зонд фиксировали над наружной поверхностью дистального конца правого предплечья вблизи лучезапястного сустава. Измерения проводили через 10 минут после периода адаптации. Динамику ПМ регистрировали в течение 10 минут в условиях покоя.

Для оценки степени сложности и хаотичности микроциркуляторной системы рассчитывали такие нелинейные показатели, как относительная энтропия и фрактальная размерность. Энтропия представляет собой меру степени непредсказуемости системы, снижение этого показателя говорит об уменьшении хаотичности в функционировании системы. Величина относительной энтропии рассчитывалась по формулам, представленным в [1].

Фрактальная размерность определяет число независимых переменных, описывающих систему. Таким образом, величина фрактальной размерности позволяет судить о степени сложности исследуемой системы. Для расчета величины фрактальной размерности использовалась методика, предложенная в [12].

Известно, что на амплитудно-частотном спектре выделяется

ся 5 характерных областей частот, наличие пиков в которых связывают с определенными физиологическими процессами [13]. Поэтому, перед проведением нелинейного анализа исходные сигналы фильтровали в частотном окне 0,01–2 Гц с тем, чтобы ограничиться исследуемым частотным диапазоном.

Результаты. Значения нелинейных параметров микроциркуляции, полученные при нелинейном анализе динамики периферического кровотока, представлены в табл. 2.

Таблица 2

Значения относительной энтропии (RE) и фрактальной размерности (FD) у условно-здоровых испытуемых разного возраста

	RE	FD
1 группа	0.90±0.005	1.47±0.008
2 группа	0.91±0.004	1.48±0.005
3 группа	0.89±0.007	1.49±0.006
4 группа	0.89±0.004	1.49±0.007
5 группа	0.88±0.006*^	1.53±0.012*^>#

Примечание: * ^ > # – отличия достоверны по непараметрическому критерию Манна – Уитни относительно 1-й, 2-й, 3-й и 4-й групп (p < 0.01).

Показано, что с возрастом происходит снижение величины относительной энтропии. В 1-й и 2-й группах данный показатель практически не меняется, затем наблюдается возрастное снижение значения относительной энтропии, которое к 77-ми годам приобретает достоверный характер относительно 1-й и 2-й возрастных групп. Мы полагаем, что наблюдаемое возрастное уменьшение величины относительной энтропии позволяет предположить, что в процессе старения происходит уменьшение хаотизации системы микроциркуляции, что может свидетельствовать об упрощении функционирования МЦР.

Фрактальная размерность в процессе старения достоверно увеличивается к 77-ми годам относительно всех предыдущих групп. Если для 1-й группы величина фрактальной размерности составила 1.47±0.008, то в 5-й группе этот показатель достоверно вырос до 1.53±0.012. Такое возрастное увеличение фрактальной размерности может свидетельствовать об увеличении степени упорядоченности микроциркуляторной системы, вызванном процессами, происходящими при старении.

Наблюдаемое возрастное упрощение и увеличение упорядоченности системы микроциркуляции можно объяснить срабатыванием компенсаторных механизмов (например, увеличением силы и частоты сердечных сокращений, активным перераспределением потоков крови в капиллярных сетях, обусловленным активной вазомоторной прекапиллярных артериол и т. д.), поддерживающих нормальное функционирование организма в условиях органо-тканевой гипоксии и нарушений метаболических процессов, развивающихся при старении [3].

Известно, что кровоток в МЦР нестабилен и подвержен колебаниям [13], которые отражают текущее функциональное состояние систем его регуляции [13]. Ранее мы показали [4–6], что с возрастом наблюдается увеличение кровотока в артериальном и уменьшение кровотока в веноулярном звеньях микроциркуляторной системы кожи. При старении происходит снижение активности миогенной, нейрогенной и эндотелиальной систем регуляции кровотока в МЦР кожи [4–6]. Использование методов нелинейной динамики при анализе колебаний в диапазонах кардио- и респираторного ритмов, а также в диапазонах миогенной, нейрогенной и эндотелиальной активности позволит определить вклад звеньев МЦР и его регуляторных систем в процессы, вызывающие упрощение и упорядочение системы микроциркуляции. Выявление механизмов старения звеньев и систем регуляции МЦР является предметом наших исследований.

Заключение. Методами нелинейного анализа исследована динамика периферического кровотока кожи условно здоровых испытуемых разного возраста, что позволяет утверждать, что с возрастом происходит упрощение и увеличение степени упорядоченности системы микроциркуляции. Эти закономерности могут быть основой для методов экспресс-оценки состояния периферического кровотока для диагностики расстройств, вызванных возрастными изменениями в функционировании МЦР, а также заболеваниями различной этиологии.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 06-04-48737).

Литература

1. Гайдийцев И. Анализ и обработка данных: Специальный справочник. – СПб.: Питер. – 2001.
2. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови: Рук-во для врачей. – М.: Медицина. – 2005.
3. Коркушко О.В., Лишневская В.Ю. // Успехи геронтологии. – 2002. – Вып. 9. – С. 262–268.
4. Тихонова И.В. и др. // Росс. физиол. Ж. им. И.М. Сеченова. – 2005. – Т.91, № 10. – С. 1132–1137.
5. Тихонова И.В. и др. // Росс. физиол. Ж. им. И.М. Сеченова. – 2005. – Т.91, № 11. – С. 1305–1311.
6. Тихонова И.В. и др. // Клини. физиол. кровооб. – 2005. – № 4. – С. 53–58.
7. Acharya U.R. et al. // Comput. Methods Programs Biomed. – 2005. – Vol. 80(1). – P. 37–45.
8. Bonner R., Nossal R. // Appl. Opt. – 1981. – Vol. 20. – P. 2097–2107.
9. Carolan-Rees G. et al. // Med. Eng Phys. – 2002. – Vol. 24(1). – P. 71–76.
10. Harris N.R., Rumbaut R.E. // Pathophysiology. – 2001. – Vol. 8(1). – P. 1–10.
11. Muck-Weymann M.E. et al. // Microvasc. Res. – 1996. – Vol. 52(1). – P. 69–78.
12. Sevcik C. // Complexity International. – 1998. – Vol. 5.
13. Stefanovska A. et al. // IEEE Trans. Biomed. Eng. – 1999. – Vol. 46(10). – P. 1230–1239.
14. Tu C. et al. // Technol. Health Care. – 2004. – Vol. 12 (1). – P. 1–9.
15. Van den Brande P. et al. // Microvasc. Res. – 1997. – Vol. 53(2). – P. 156–162.

УДК 611.77:616-076

ВОЗМОЖНОСТИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ В ИЗУЧЕНИИ КЛЕТОК КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

Д.Я. АЛЕЙНИК*, Н.В. ВОСТОКОВ**, И.А. КЛЕМЕНОВА ***

Изучение особенностей клеток кожи позволяет охарактеризовать патогенетические механизмы многих дерматозов. Особый интерес в этом отношении представляют клетки эпидермиса (кератиноциты) и клетки дермы – фибробласты.

Актуально уточнение механизмов развития псориаза. Патогенез этого заболевания остается до конца невыясненным. Многие авторы относят псориаз к мультифакториальным заболеваниям с высокой ролью наследственных факторов [1, 2]. Важнейшие проявления заболевания манифестируют в эпидермисе, однако структуры дермы также претерпевают существенные изменения. Усиление пролиферации и нарушение процесса созревания кератиноцитов является ведущим звеном морфогенеза заболевания. Роль фибробластов в этом процессе не ясна, хотя выявлены их изменения при псориазе [3–5]. Помимо рутинных методов микроскопии, лежащих в основе всех исследовательских программ, для изучения ультраструктур клетки и клеточных мембран в настоящее время используются электронная микроскопия и сканирующая зондовая микроскопия. Метод электронной микроскопии известен давно, в то время как методы сканирующей микроскопии развиваются не более 2 десятилетий. Сканирующая туннельная микроскопия и атомно-силовая микроскопия (АСМ) являются наиболее перспективными представителями сканирующей зондовой микроскопии, причем АСМ не требует обязательной электрической проводимости исследуемых образцов, то есть образцы не нуждаются в предварительной обработке. АСМ известна с 1986 года и в применяется не только для исследования твердых объектов, но и для изучения биоструктур (вирусы, молекулы белков, клетки крови) [6–8]. Работ по изучению клеток кожи с помощью АСМ в литературе обнаружить не удалось.

Цель исследования – определение возможностей АСМ для изучения клеток кожи: фибробластов и кератиноцитов.

Материалы и методы исследования. В работе использован атомно-силовой микроскоп (Atomic Force Microscope — AFM) «Solver-P4» (NT-MDT, Зеленоград). В конструкцию AFM входят зонд, пьезоэлектрические двигатели для перемещения зонда, компьютер для управления процессом сканирования, получения и обработки изображений. Главной частью микроскопа является сенсор с высоким пространственным разрешением. Принцип действия атомно-силового сенсора основан на использовании сил атомных связей, действующих между атомами вещества. В AFM такими телами служат исследуемая поверхность и скользящее над нею острие сенсора. Одной из сложностей при изучении биоструктур с помощью АСМ является равномерное размещение исследуемых биообъектов на поверхности. Монослойные культуры поверхностно-зависимых клеток кожи – дермальных фибробластов и кератиноцитов – являются адекватной моделью для исследования микрорельефа клеточных мембран.

Культуры клеток кожи получали в лаборатории клеточных культур Нижегородского НИИ травматологии и ортопедии. Источником клеточного материала были биоптаты кожи, полученные от здоровых добровольцев, и взятые из очагов поражения кожи больных псориазом. Клеточные культуры, полученные из псориатических очагов, использовались для изучения гиперпролиферативных процессов. Первичные культуры фибробластов получали из биоптатов кожи после трипсинизации и механической дезагрегации и в дальнейшем культивировали с использованием среды Игла (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва) с добавлением 2% глутамина, антибиотиков и 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Биолот», Санкт-Петербург). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе в атмосфере воздуха с 5% углекислого газа, при температуре 37°C и абсолютной влажности. Для исследования использовали культуру фибробластов 4–5 пассажей, сформировавшую конфлюэнтный монослой, через 24 часа после пассажа. Плотность исходного посева составляла 20×10⁴ /см² пластиковой чашки («Costar»).

Культуры дермальных фибробластов, полученные из биоптатов кожи молодых здоровых доноров с использованием указанной технологии каритипированы в Медико-генетическом научном центре РАМН (Москва) и использовались в качестве стандартных штаммов. Всего исследовано 3 стандартных штамма и 5 штаммов дермальных псориатических фибробластов.

Культуры кератиноцитов получали по методу Reinwald, Green [9–10]. В качестве источника первичного материала использовали такие же биоптаты кожи размером 1 см² от здоровых добровольцев и псориатические. С помощью холодной трипсинизации при 4°C эпидермис отделялся от дермы по линии базальной пластинки, затем кусочки эпидермиса дополнительно обрабатывались трипсином и пипетировались для дезагрегации эпидермоцитов. Полученная в результате дезагрегации суспензия кератиноцитов культивировалась с использованием среды DMEM: F12 («Sigma») 1: 1 с добавлением телячьей эмбриональной сыворотки, антибиотиков, 2% глутамина, фактора роста эпидермоцитов, гидрокортизона [9–10]. Условия культивирования соблюдались, как и при формировании культур фибробластов. Исследовали культуры, сформировавшие конфлюэнтный монослой с исходной плотностью посева 40×10⁴ /см² пластиковой чашки («Costar»). В качестве стандартных штаммов кератиноцитов использовали культуры клеток из биоптатов кожи молодых здоровых доноров. Проведено исследование 2 штаммов кератиноцитов из псориатических очагов и двух стандартных штаммов. Рост культур ежедневно контролировали, используя инвертированный микроскоп («Leica DMIL HC», Switzerland) с системой видеоконтроля и компьютерной программой «LEICA IM 1000».

Результаты. В поле зрения инвертированного микроскопа ×40 наблюдали культуры фибробластов, формирующие конфлюэнтный монослой и образующие типичный рисунок в виде завитков. Клетки в монослой ×100, ×250 были преимущественно веретеновидной, реже – звездчатой формы с выраженными отростками. Ядра клеток были плотными, четко очерченными с 1–2 мелкими ядрышками. Различий в рисунке монослоя и строении образующих его клеток в культурах фибробластов, полученных от здоровых лиц и от пораженных псориазом, при световой микроскопии выявить не удалось. Культуры кератиноцитов представляли собой монослой клеток неправильной полигональ-

* Федеральное государственное учреждение Нижегородский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию
** Институт физики микроструктур РАН, Нижний Новгород
*** Федеральное государственное учреждение Нижегородский научно-исследовательский кожно-венерологический институт Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию