

УДК 616.002.3.001.5:616.073.27

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОЦЕНКА АНГИОГЕНЕЗА И КЛЕТОЧНОГО МИКРООКРУЖЕНИЯ В КОЖНОЙ РАНЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Н.В. ЕРЕМИН*, М.В. МНИХОВИЧ**

В статье представлены результаты исследования влияния низкоинтенсивного лазерного излучения на состояние микроциркуляторного русла и его клеточного микроокружения в условиях экспериментальной резаной раны кожи. Исследование проводилось с помощью трансмиссивной электронной микроскопии. Показано, что под влиянием низкоинтенсивного лазерного излучения в ране кожи уменьшается нейтрофильная инфильтрация, что ведет к сокращению сроков очищения ран от некротических тканей. Гелий – неоновый лазер стимулирует иммунитет через клеточные элементы системы мононуклеарных фагоцитов в кожно-мышечной ране. Лазерная стимуляция изменяет реакцию микроциркуляторного русла, активизируя локальный тканевой кровоток в интактных и регенерирующих тканях за счет включения в кровоток ранее не функционирующих капилляров и более раннего образования новых.

Ключевые слова: эксперимент, кожа, рана, репаративные процессы, низкоинтенсивное лазерное излучение

Проблема заживления ран (гнойных, пролежневых, трофических язв и др.), характеризующихся той или иной степенью выраженности отклонений от стереотипной динамики воспалительно-репаративного процесса, остается одной из важнейших в хирургии. Известны многочисленные исследования, посвященные гистологическим и гистохимическим аспектам заживления осложненных ран у человека: гнойных ран [1], пролежневых ран, трофических язв венозной этиологии. Вместе с тем имеются лишь отдельные электронно-микроскопические работы, посвященные в основном заживлению ран. Мало изучены ультраструктурные особенности раны.

Многие морфологические аспекты заживления осложненных ран человека еще мало разработаны и не выяснены. Остаются малоизученными ультраструктурные механизмы торможения роста и созревания *грануляционной ткани* (ГТ), дифференцировка и структурно-функциональные особенности соединительнотканых клеток, взаимодействие клеточных элементов между собой и с межклеточным матриксом, взаимоотношение между воспалением, регенерацией и фиброзом в осложненных ранах. Традиционные средства и методы лечения осложненных ран часто малоэффективны и не всегда предупреждают развитие различных осложнений. Это определяет необходимость дальнейшего поиска новых и совершенствование известных средств и методов лечения, стимулирующих репаративные процессы в осложненных ранах, а также углубленного изучения их механизмов действия, в том числе с применением морфологических методов исследования. Особый интерес представляют вопросы механизма действия низкоинтенсивного гелий-неонового излучения на биологические объекты. В литературе встречаются отдельные исследования лазерного влияния на различные мягкие ткани (кожа, подкожная клетчатка, скелетная мускулатура и др.). Эти вопросы представляют не только теоретический интерес, но имеют большое практическое значение в медицине, особенно в хирургии.

Изучение сроков заживления поврежденных мягких тканей под влиянием лазерного луча, а также исследование качественных характеристик регенеративных процессов при них, представляют большую актуальность, особенно на открытых участках кожи, когда кроме функционального результата приходится учитывать и косметические аспекты.

В специальной литературе нам не удалось встретить исследований, которые могли бы дать общую и дифференцированную характеристику влияния *низкоинтенсивного лазерного излучения* (НИЛИ) на регенеративные процессы в разных структурах мягких тканей. Между тем, следует отметить, что интерес к лазерным исследованиям заметно возрос в связи с широким проникновением в медицинскую практику методов фотобиологии. На этой основе в довольно короткие сроки значительно расширился диапазон применения лазерного луча при заболеваниях различных систем организма (сердечно-сосудистой, дыхательной, нервной, пищеварительной, опорно-двигательной, мочеполовой и др.). Сводные данные о результатах применения лазерного луча в медицине представлены в ряде обзорных статей, свидетельств-

ующих о высокой диагностической и лечебной эффективности лазерного излучения.

Материалы и методы исследования. Работа проводилась на беспородных белых крысах весом от 100 до 150 граммов. В области нанесения ран на правой боковой поверхности тела предварительно выстригался, а затем выбривался участок волосяного покрова. Место нанесения экспериментального повреждения в каждом опыте у всех животных было постоянным. Раны наносились под эфирным наркозом в стерильных условиях. С помощью остроконечных ножниц удалялся лоскут кожи 2,0 x 2,0 см с подкожной клетчаткой. В эксперименте в качестве источника лазерного излучения использовался аппарат на гелий-неоновой основе ЛГ-111 с длиной волны 0,63 мкм и мощностью на выходе 13 мВт/см². Облучение проводили 2 раза в неделю в течение 10 минут. Диаметр фокусируемого пятна составлял в среднем 2,0 см. По окончании экспериментов в строго определенные сроки (5, 10, 15 и 30 сутки) животных выводили из опыта согласно «Правил проведения работы с использованием экспериментальных животных» и приказу «О гуманном обращении с экспериментальными животными». Материал подвергали стандартной процедуре для электронно-микроскопического исследования, при этом материал префиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида, pH 7,3-7,4 в течение 4 часов. Постфиксировали в 1% растворе OsO₄ на 0,1 М фосфатном буфере (pH 7,4). Дегидратацию материала проводили в батарее с возрастающей концентрации этанола и ацетона. Образцы заключали в заливочную смесь аралдита, аралдита М и эпона-812. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца.

Результаты и их обсуждение. При воздействии на кожную рану НИЛИ к 5 дню после операции наблюдается типичная картина острого экссудативного воспаления. В экссудате доминируют клетки острой фазы – полиморфноядерные и эозинофильные лейкоциты, активные моноциты с крупным ядром, хорошо выраженным ядрышком и многочисленными гранулами умеренной электронной плотности (рис.1). В месте миграции полиморфноядерных лейкоцитов контактирующие участки эндотелиоцитов источаются. *Полиморфноядерные лейкоциты* (ПЯЛ), располагающиеся в просвете расширенных сосудов, более или менее округлой формы, основную массу клетки составляет сегментированное ядро, секреторные гранулы немногочисленны. В цитоплазме мигрировавших в окружающую ткань ПЯЛ увеличивается число секреторных гранул и др. включений. Ультраструктурные исследования показали, что многие из клеток фибробластического ряда характеризовались невысоким уровнем дифференцировки. Доминирующими структурами в их цитоплазме были полисомы, отдельные профили зернистой эндоплазматической сети. Довольно часто встречались центриоли. Они содержали крупные ядра с двумя или более ядрышками. Ультраструктура ядер этих клеток свидетельствовала, что они находятся на разных функциональных стадиях. В ядрах одних клеток преобладает гетерохроматин в виде зернистой плотной массы, сконцентрированный по периферии ядра у ядерной оболочки. Считается, что это малоактивная конденсированная фаза хроматина. В ядрах других клеток преобладает эухроматин в виде нежной зернистости, равномерно распределенной по всей нуклеоплазме. В некоторых участках – обширные поля эритроцитов, среди которых встречаются локальные депозиты фибрина. Фибрина особенно много на границе с тканью, прилежащей к формирующему рубцу. На некотором расстоянии от сосудов депозиты фибрина образуют отчетливую демаркационную границу (рис. 2). Фибрин и нежный материал, который заполняет пространство между клетками, являются, собственно, тем экстраклеточным матриксом, который используется клетками для прикрепления и миграции. Фибрин и фрагменты разрушенных клеток фагоцитируются клетками с отчетливым фенотипом макрофагов (рис. 3). Помимо клеток воспаления, можно видеть немногочисленные мигрирующие фибробласты. Все сосудистые профили, которые встречаются около зоны формирования рубца представляют собой предсуществующие сосуды, преимущественно вены, и сосуды капиллярного типа с активным эндотелием. Нередкой находкой являются эпизоды диapedеза эритроцитов через «дефекты» в стенках расширенных веноулярных сосудов с крупными активными эндотелиальными клетками.

* Санитарная часть №10 ФМБА РФ

** ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН, Москва, ул. Цюрупы, 3

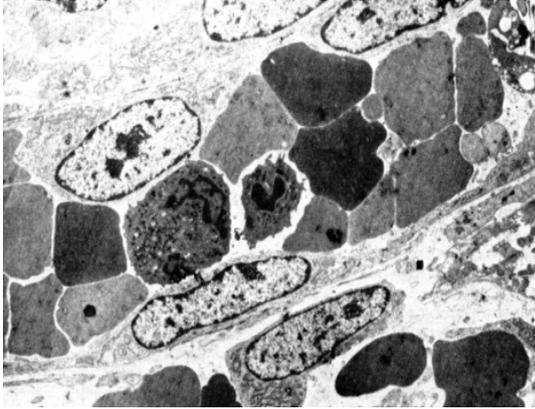


Рис.1. Морфология раны на 5 сутки после нанесения. Электроннограмма; X 1200

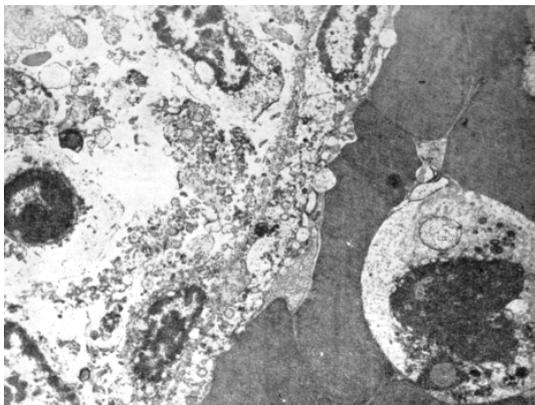


Рис. 2. Ультраструктурные элементы раны на 5 сутки после нанесения. Контрастирование цитратом свинца; X 2500

Эндотелиальные клетки (ЭК) практически всех микрососудов существенно изменяют свой фенотип и показывают признаки активации синтетических функций. Это проявляется в заметном утолщении клеток, увеличении фракции хроматина в их ядрах, более интенсивном, чем в покое, развитии ГЭР и обилии свободных полисом (рис.4). Особенно эти трансформации демонстративны в микрососудах венулярного типа. Исчезает ранее отчетливая разница между толщиной ядродержащей зоны и периферическими отделами цитоплазмы ЭК. Увеличивается клеточная подвижность, о чем можно судить по характерной фестончатой поверхности ядра и цитоплазмы. Базальные поверхности ЭК венул и капилляров становятся извитыми; можно видеть, что внешний контур сосудов вообще приобретает неровные очертания.

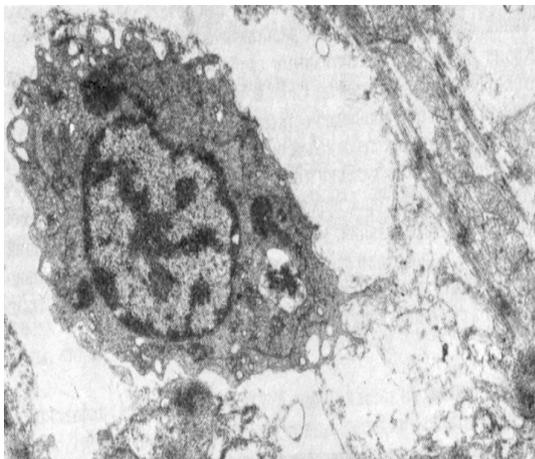


Рис.3. Морфология раны на 5 сутки после нанесения. Макрофагальные клетки в экссудате. Электроннограмма; X 4000

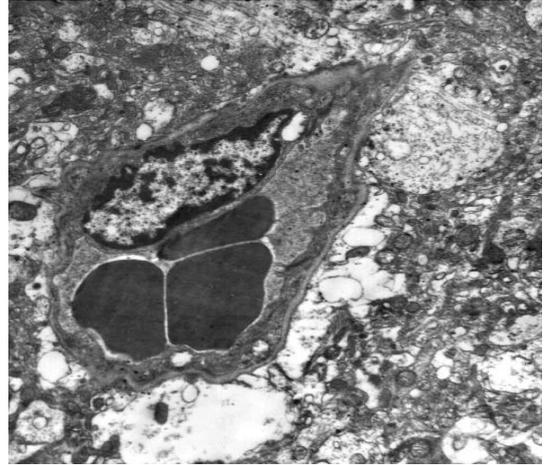


Рис. 4. Ультраструктурные элементы раны Электроннограмма; X 2500

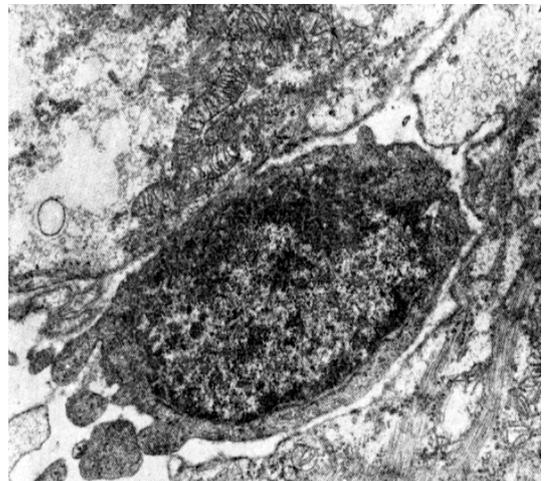


Рис.5. Морфология раны на 10 сутки после нанесения и воздействия НИЛИ. Электроннограмма; X 1200

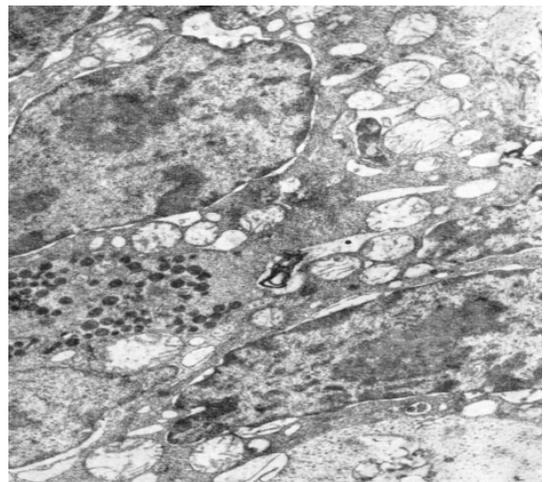


Рис. 6. Ультраструктурные элементы раны на 10 сутки после нанесения и воздействия НИЛИ. Электроннограмма; X 2500

К 10 суткам картина существенно изменяется. Начинает формироваться соединительная ткань в области будущего рубца; в прилежащей зоне – отчетливая картина активно регенерирующей соединительной ткани и ближайших мышц. Наиболее демонстративными процессами на этом сроке регенерации являются интенсивный фибриллогенез и новообразование капилляров. Обращает на себя внимание также широкое представительство клеток моноцитарного ряда. Тонкие коллагеновые фибриллы и

небольшие их пучки, которые располагаются в межклеточных пространствах, не имеют предпочтительной ориентации. Они локализованы, преимущественно, около активных фибробластов – крупных клеток с развитым эндоплазматическим ретикуломом, активным ядром. Большая часть фибробластов сохраняют признаки миграционной активности (рис.5). В популяции клеток моноцитарного ряда становится отчетливой дифференциация на два клеточных фенотипа. Одни клетки приобретают вид типичных макрофагов – с развитым ГЭР, активным ядром, неправильными контурами. В цитоплазме много электронноплотных гранул, первичных лизосом и, эпизодически, вторичных лизосом, содержащих полиморфный материал. На этом сроке и несколько позднее обращают на себя внимание характерные взаимоотношения клеток соединительной ткани (рис. 6). Достаточно часто клетки – макрофаги, фибробласты и тканевые базофилы образуют отчетливые группы или кластеры. В пределах группы клетки связаны адгезионными контактами – близким прилеганием клеточных мембран без явных специализированных структур, типа десмосом.

В формировании контактов участвуют значительная доля клеточной поверхности или протяженные клеточные отростки. Это ничто иное, как морфологическое проявление регуляторных межклеточных взаимодействий, направленных на стимуляцию фибрилlogenеза – процесса, который доминирует в этот период развития соединительной ткани. В ранах, подвергнутых воздействию НИЛИ, наблюдается снижение объема, занимаемого ПЯЛ и бесклеточными зонами. В них наряду с увеличением объема микрососудов в значительно большей степени, чем в контроле, увеличивается объем, занимаемый фибробластами, макрофагами и особенно клетками плазматического ряда. Существенно возрастает относительный объем эозинофилов и тучных клеток, уменьшается площадь неэпителизированной поверхности.

На 15 сутки после облучения раны НИЛИ отличается наиболее интенсивным новообразованием капилляров. За это время, плотность капилляров в единице объема ткани возрастает более чем вдвое (рис. 7). Прослеживается рост новых капилляров от материнских сосудов капилляров и венул, начиная с ранних стадий формирования «почки роста» до полностью сформированного функционирующего капилляра со всеми компонентами стенки. В ткани рубца встречаются единичные растущие или «юные» капилляры. В зоне, прилежащей к рубцу – картина активной соединительной ткани с новообразующимися капиллярами или уже функционирующими микрососудами в стадии созревания и дифференцировки (рис. 8).

К 30 суткам при облучении кожной раны НИЛИ картина напоминает, в целом, развитую соединительную ткань. Однако, признаки ее активности – фибрилlogenез, новообразование капилляров, фагоцитарная активность сохраняются в достаточной степени.



Рис. 7. Морфология раны на 15 сутки после нанесения и воздействия НИЛИ. Электроннограмма; X 2000

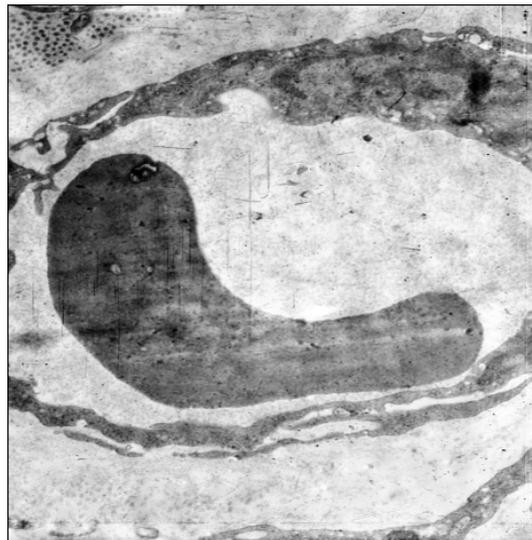


Рис. 8. Ультраструктурные элементы раны на 15 сутки после нанесения и воздействия НИЛИ. Электроннограмма; X 2500

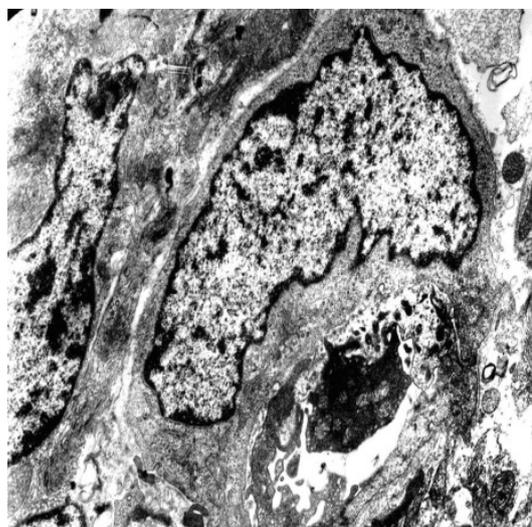


Рис. 9. Морфология раны на 30 сутки после нанесения и воздействия НИЛИ. Электроннограмма; X 2000

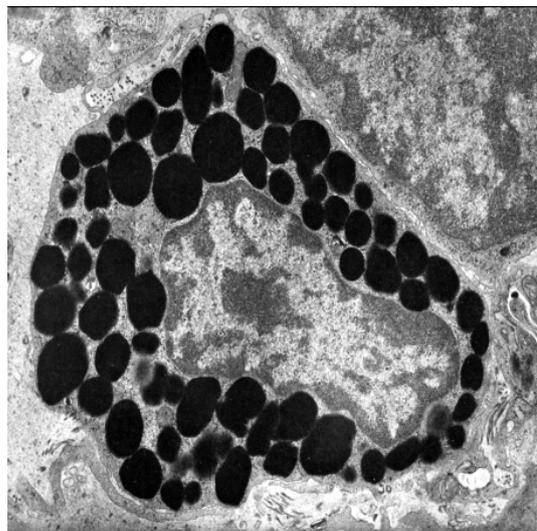


Рис. 10. Ультраструктурные элементы раны на 30 сутки после нанесения и воздействия НИЛИ. Электроннограмма; X 2500

Капилляры имеют просвет, ограниченный 2-3 эндотелиальными клетками с отчетливой зональностью – выдающаяся в про-

свет ядродержащая часть и уплощенная периферическая (рис. 9). Обилие плазмалеммальных везикул, связанных с поверхностями клеток или расположенных «свободно» в цитоплазме, является характерной особенностью зрелых эндотелиоцитов. Ядерно-цитоплазматическое отношение невелико, органеллы мало и сосредоточены они, преимущественно, в парануклеарной зоне цитоплазмы. Межклеточные контакты имеют, обычно, простую конфигурацию. Этот фенотип эндотелия расценивают как дифференцированный или транспортный, типичный для соматических капилляров. Уплощенные тела пероцитов и их циркулярно ориентированные отростки плотно прилегают к эндотелиальной трубке, заключены в дупликатуру базальной пластинки, которая является общей для эндотелия и клеток второго слоя.

Практически только в центральной части раны сохраняются небольшие очаги с большим количеством капилляров, переполненных кровью. Между капиллярами выявляются круглоядерные клетки, большое количество периваскулярных форм тучных клеток (рис. 10)

При развитии капилляров в регенерирующей ране более типичной является структура почки роста. Щелевидный просвет растущей зоны капилляра ограничен крупными активными ЭК синтетического фенотипа. Верхушка почки роста формируют две ЭК с извитой границей лидирующего края. Рядом с этими клетками расположены тела крупных пероцитов, отростки которых простираются в окружающую ткань, опережая лидирующую зону эндотелия. Верхушка почки роста, как правило, «прикрыта» отростками пероцитов в зоне, которая ориентирована в направлении роста. Интересно, что пероциты сохраняют локальные адгезионные связи с эндотелием посредством тонких отростков, прободающих базальную пластинку. Можно видеть также, что отростки пероцитов у верхушки почки роста окружены фрагментами базальной пластинки или, чаще, рыхлым материалом умеренной электронной плотности. Эти депозиты экстраклеточного матрикса плотнее, чем окружающий скудный матрикс новообразованной ткани. Особенно это демонстративно в зоне формирующегося рубца, где, естественно, предсуществующая соединительная ткань отсутствует и образуется *de novo*, по мере миграции сюда фибробластов и вставания капилляров.

Ангиогенез в регенерирующей ране, также, впрочем, как и в иных ситуациях, не ограничивается формированием единичных капиллярных сосудов. Он предусматривает их включение в общую циркуляцию и, следовательно, установление связей между сосудами. Очевидно, что формирование таких связей должно включать некоторые клеточные события, в которых участвуют компоненты капиллярной стенки.

В контрольной группе эффект торможения регенерационного процесса достаточно выражен. Края раны сильно гиперемированы, значительно выдаются над окружающей кожей и имеют неровную поверхность. Образующийся струп имеет вид толстого фрагментированного слоя. Он неплотно прилегает к краям раны и из под него долгое время выделяется серозно-гнойный экссудат. В контрольной группе, образующийся рубец имеет неровную поверхность и значительно выступает над окружающей кожей, заметно деформируя ее.

Выводы. Таким образом, регенерация, как правило, происходит за счет основного клеточного дифферона ткани, однако в тесном взаимодействии с клетками дополнительных дифферонов. Известно, что разные средства стимуляции регенеративных процессов, по-разному изменяли продолжительность и выраженность его стадий, т. е. влияния на внутреннюю структуру процесса, клеточно – тканевой состав регенерата. Заживление раны характеризуется комплексом процессов, специфичных для каждого уровня организации живого. В замещении кожного мышечного дефекта участвует особая структура – «грануляционная ткань». Она является высокоорганизованной развивающейся системой с несколькими источниками происхождения ее клеточных дифферонов и органов структур (кровеносных сосудов). Это позволяет выделить ее в особый тип временно существующей органно – тканевой структуры, осуществляющей регенерацию по заместительному типу в специализированных тканях. Регуляция развития «грануляционной ткани» обеспечивается не только местными клеточными и тканевыми, но и общеорганизменными факторами.

Репаративные процессы в резаной ране кожи под воздействием лазерного излучения проходят все классические стадии, однако продолжительность каждой из них значительно сокращается.

Под влиянием низкоинтенсивного лазерного излучения в ране кожи уменьшается нейтрофильная инфильтрация, что ведет к сокращению сроков очищения ран от некротических тканей.

Лазерная стимуляция изменяет реакцию микроциркуляторного русла, активизируя локальный тканевой кровоток в интактных и регенерирующих тканях за счет включения в кровоток ранее не функционирующих капилляров и более раннего образования новых.

Литература

1. Аничков, Н.Н. Морфология заживления ран / Н.Н. Аничков, К. Г. Волкова, В.Г. Гаршин. – М.: Медгиз, 1951. – 123 с.

MORPHOLOGY OF SKIN WOUNDS UNDER THE INFLUENCE OF LOW INTENSITY HELIUM-NEON LASER

N.V. EREMIN, M.V. MNIKHOVICH

Sanitary unit number 10 of FMBA RF
"Research Institute of Human Morphology," Academy of Medical Sciences, ul. Tsyurupa

The paper studied the effect of low-intensity laser radiation on the state of microcirculation and the cellular microenvironment in experimental Rosanna skin wounds. The study was conducted using descriptive morphology, histology method and vector-borne transmission electron microscope. It is shown that reparative processes in wound sliced the skin under the influence of laser light pass through all the classic stages, but the duration of each of them is greatly reduced. Under the influence of low-intensity laser radiation in the wound skin is reduced neutrophilic infiltration, which leads to a shortening of the cleansing of wounds from necrotic tissues. He - Ne laser stimulates the immune system through the cellular elements of the system of mononuclear phagocytes in the skin - muscle injury. Laser stimulation alters the reaction of microcirculation, enhancing local tissue blood flow in intact and regenerating tissues due to the inclusion in the bloodstream has not previously functioning capillaries and the earlier formation of new ones.

Key words: experiment, skin, burn wound repair processes, low-intensity laser radiation.

УДК: 616.33 – 616.72 – 022

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОСВЕТНОЙ И ПРИСТЕНОЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ ЖЕЛУДКА БОЛЬНЫХ С РЕВМАТОИДНЫМИ И РЕАКТИВНЫМИ АРТРИТАМИ

И.Р. МАВЛЯНОВ, Р.И. МУСТАФИН, Н.Х. ТУХТАЕВА*

При изучении состояния пристеночной и просветной микрофлоры желудка, а также степени обсемененности *Helicobacter pylori* (*H.Pylori*) у больных с ревматоидными и реактивными артритами отмечается избыточный рост как мукозной, так и просветной микрофлоры желудка. У большинства больных высевается *H.Pylori*. Хронический гастрит оказался наиболее часто выявляемым эндоскопическим признаком поражения пищеварительной системы. У больных с заболеваниями суставов имеют место дисбиотические изменения в желудочном биотопе. Дисбиотические изменения в желудке у больных с суставными заболеваниями сопровождаются хеликобактериозом желудка. Между выраженностью дисбиотических изменений в желудке и степенью обсемененности *H.Pylori* существуют прямая связь.

Ключевые слова: микрофлора желудка, дисбиотические изменения в желудке, ревматоидный артрит, реактивный артрит

Расселение микрофлоры, ее инфраструктура, а также выполняемые ее функции в организме хозяина широко освещены в литературе [1,5,6,9,23]. Отношение в этом сообществе имеют филогенетически древнее происхождение и жизненно важны для обеих частей системы организм – микробиота [3,4]. Около 60% микрофлоры заселяет различные отделы *желудочно-кишечного тракта* (ЖКТ) [8, 9, 10]. Микрофлора ЖКТ делится на мукозную (пристеночную) и просветную [8]. По данным литературы при патологии гастродуоденальной зоны из содержимого желудка высеиваются десятки видов различных микроорганизмов [19]. Достаточно малое количество исследований было посвящено изучению состояния микробиоценоза желудка, в особенности мукозной микрофлоры, в норме и при патологии [20]. Изучение состояния *гастродуоденальной зоны* (ГДЗ) и выраженности его поражения при патологии, в частности при *ревматоидном* (РА) и

* Ташкентская медицинская академия, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Фароби, 2