

На правах рукописи

Рейдман Виталина Ринатовна

**Влияние среднеинтенсивного лазерного облучения зон локализации
красного костного мозга на репарацию поврежденного миокарда.**

14.03.03 -патологическая физиология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Москва 2016

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования "Южно-Уральский медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Головнева Елена Станиславовна

Официальные оппоненты:

1) **Юшков Борис Германович** – доктор медицинских наук, профессор, ЗДН РФ, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук, зам. директора по научной работе.

2) **Благонравов Михаил Львович** – доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», кафедра общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова, профессор кафедры.

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится " ____ " _____ 2016 года в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 208.040.08 в ФГБОУ ВО Первый МГУ им. И.М. Сеченова Минздрава России по адресу: 119992, г. Москва, ул.Трубецкая, д.8., стр.2.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ при ФГБОУ ВО Первый МГУ им. И.М. Сеченова Минздрава России по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте www.mma.ru

Автореферат разослан " ____ " _____ 2016 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета д.м.н., профессор

Калюжин Олег Витальевич

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

В России, как и во всех развитых странах мира, первое место среди причин смертности занимают сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ). По оценкам ВОЗ от ССЗ умирает 17,5 миллиона человек ежегодно, что составляет 30% всех случаев смерти в мире [Global status report on noncommunicable diseases 2014, WHO, 2014; Всемирный атлас профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и борьбы с ними. Под ред.: Mendis S, Puska P, Norrving B., 2013].

В последнее десятилетие в кардиологии при инфаркте миокарда, хронической сердечной недостаточности, кардиомиопатии и других тяжелых поражениях сердца успешно начато применение методов кардиомиопластики с использованием различных популяций стволовых клеток (СК) [Повещенко О.В. и др., 2014; Fischer-Rasokat U. et al., 2009; Vrtovec B. et al., 2013]. Один из важных источников СК - кровь человека. В циркулирующих стволовых клетках (ЦСК) в настоящее время выявлено более 30 цитокинов и факторов роста, паракринно влияющих на восстановление поврежденных тканей и заживление ран, ингибирующих апоптоз, являющихся хемоаттрактантами для других СК и стимулирующих пролиферацию эндотелиальных клеток [Majka M. et al., 2001; Mintz P.G. et al., 2014]. Показано, что при ишемических синдромах и тяжелых повреждениях тканей наблюдается дефицит ЦСК, усугубляющийся в процессе старения организма [Шурыгин М.Г. и др., 2014; Haddad F. et al., 2015].

Одним из направлений повышения концентрации ЦСК, является использование различных физических и биологических воздействий стимулирующих их выход из костного мозга в периферическую кровь. Установлено, что воздействие среднеинтенсивного лазерного излучения в инфракрасном и красном диапазоне длин волн на кроветворные органы способствует выходу циркулирующих стволовых клеток из костного мозга в периферическое кровяное русло, где их содержание увеличивается в 6-10 раз. На основании этого был разработан и успешно апробирован в клинике способ лечения критической ишемии конечностей [Головнева Е.С. и др., 2004, 2012]. Очевидно, что повышение концентрации ЦСК может быть использовано для активации разнообразных восстановительных процессов в организме. Остается неизученным воздействие среднеинтенсивного лазерного облучения зон локализации красного костного мозга на стимуляцию репарации и микроциркуляции в поврежденном

миокарде. Не проводилось сравнительной оценки эффективности репарации миокарда после воздействия лазеров, генерирующих излучение в инфракрасной и красной областях спектра.

Цель исследования

Изучить влияние среднеинтенсивного лазерного облучения зон локализации красного костного мозга на репарацию поврежденного миокарда крыс.

Задачи исследования

1. Оценить динамику зон ишемии кардиомиоцитов и сформировавшейся соединительной ткани в миокарде с диффузным и очаговым повреждением после среднеинтенсивного лазерного воздействия на красный костный мозг.
2. Изучить морфофункциональные особенности микроциркуляции в поврежденном миокарде после среднеинтенсивного лазерного воздействия на красный костный мозг.
3. Изучить морфофункциональные характеристики тучных клеток в поврежденном миокарде после среднеинтенсивного лазерного воздействия на красный костный мозг.
4. Определить особенности экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия в поврежденном миокарде после среднеинтенсивного лазерного воздействия на красный костный мозг.
5. Определить особенности активности желатиназ в поврежденном миокарде после среднеинтенсивного лазерного воздействия на красный костный мозг.
6. Провести сравнение репарации миокарда при использовании для облучения зон локализации костного мозга лазеров с длиной волны 980 и 670 нм.
7. Определить динамику содержания CD34⁺/45⁺ клеток и некоторых показателей периферической крови после среднеинтенсивного лазерного облучения зон локализации костного мозга.

Научная новизна

Впервые в эксперименте показана возможность стимуляции репаративных процессов в поврежденном миокарде животных после среднеинтенсивного лазерного воздействия на красный костный мозг. Наблюдаемая нормализация микроциркуляции в поврежденном миокарде происходит на фоне активации тучных клеток, повышения экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия и активности желатиназ, что сопровождается увеличением относительной площади сосудистого русла, снижением индекса Керногана артериальных сосудов, нормализацией микроциркуляции,

уменьшением площади зон ишемии кардиомиоцитов и сформированной соединительной ткани по сравнению с животными без воздействия лазера на костный мозг. Впервые показано, что использование длин волн лазерного воздействия 670 и 980 нм вызывает сходные репаративные изменения в миокарде после облучения зон локализации красного костного мозга. Установлено повышение содержания эритроцитов, гемоглобина и лейкоцитов в периферической крови животных с повреждением миокарда после лазерного воздействия на костный мозг. Впервые описано повышение содержания CD34⁺/45⁺ клеток в периферической крови у больных с инфарктом миокарда после лазерного облучения костного мозга.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты исследования расширяют представления об эффектах лазерного воздействия на красный костный мозг и влиянии повышения концентрации циркулирующих стволовых клеток в крови на процессы репарации в поврежденном миокарде, что проявляется в уменьшении площади ишемических, некротических изменений и коллагеновых волокон соединительной ткани. Восстановлению микроциркуляции в миокарде способствует активация тучных клеток, повышение экспрессии факторов роста, ферментной активности в миокарде, увеличение содержания эритроцитов, гемоглобина, лейкоцитов и стволовых клеток в периферической крови. Эти изменения в совокупности приводят к нормализации сосудистого тонуса, увеличению площади сосудистого русла в миокарде и улучшению кислородтранспортных функций крови. На основании полученных данных возможна разработка неинвазивных методов лечения инфаркта миокарда и ишемических синдромов в кардиологической практике.

Положения, выносимые на защиту.

1. Среднеинтенсивное лазерное воздействие на зоны локализации красного костного мозга приводит в поврежденном миокарде к уменьшению площади ишемических изменений, уменьшению площади коллагеновых волокон соединительной ткани, улучшению микроциркуляции и увеличению площади сосудистого русла на фоне повышения функциональной активности тучных клеток, экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия и активности желатиназ.

2. Выраженность репаративных изменений, наблюдаемых в миокарде после среднеинтенсивного лазерного воздействия на зоны локализации красного костного

мозга, не отличается при использовании длины волны 670 и 980 нм.

3. Среднеинтенсивное лазерное облучение зон локализации красного костного мозга у животных с повреждением миокарда вызывает в периферической крови повышение содержания эритроцитов, лейкоцитов, уровня гемоглобина, у больных с инфарктом миокарда после лазерного облучения в крови отмечается повышение содержания CD 34⁺/45⁺ клеток.

Личный вклад автора

Основная идея, планирование научной работы, включая формулировку рабочей гипотезы, определение методологии и общей концепции диссертационного исследования, формулирование целей и задач, разработка дизайна исследования проведены совместно с научным руководителем Головневой Еленой Станиславовной, доктором медицинских наук, профессором кафедры Нормальной физиологии ГБОУ ВПО ЮУГМУ Минздрава России. Моделирование и терапевтическое воздействие лазером на лабораторных животных, морфологические, морфометрические, биохимические исследования и оценка микроциркуляции выполнены при участии сотрудников ГБУЗ ЦОСМП «Челябинский государственный институт лазерной хирургии». Исследование периферической крови на проточном цитометре проводилось совместно с сотрудниками ГБУЗ «Челябинская областная детская клиническая больница».

Анализ современной отечественной и зарубежной литературы по изучаемой проблеме, статистическая обработка первичных данных, интерпретация и анализ полученных результатов, написание и оформление рукописи диссертации, представление результатов работы в научных публикациях и в виде докладов на всероссийских конференциях осуществлялись соискателем лично.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.03.03 – патологическая физиология. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно – пунктам 2, 8 и 10 паспорта специальности.

Апробация работы.

Основные положения работы представлены на V Всероссийской конференции,

посвященной 100-летию со дня рождения В.Н. Черниговского «Механизмы функционирования висцеральных систем» (Санкт-Петербург, 2007), Всероссийской конференции "Научное наследие акад. Л.А.Орбели. Структурные и функциональные основы эволюции функций, физиология экстремальных состояний" (Санкт-Петербург, 2008), I международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010), Российском научном форуме на Урале с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной медицины» (Екатеринбург, 2014), I и II Национальном конгрессе по регенеративной медицине, (Москва, 2013, 2015).

Апробация диссертации состоялась 17 февраля 2016г. на совместном заседании проблемной комиссии и кафедры нормальной физиологии государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Работа рекомендована к предоставлению в диссертационный совет.

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедр нормальной физиологии, патологической физиологии ГБОУ ВПО "Южно-Уральского медицинского университета" Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Публикации

Соискатель имеет 12 опубликованных работ по теме диссертации, из них 6 публикаций в научных журналах (4 статьи, 1 обзорная статья, 1 тезисы конференции), которые включены в перечень ВАК российских рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертации.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 145 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, главы собственных исследований и обсуждения результатов, заключения, выводов. Библиографический список включает 323 источников: 113 на русском языке, 210 иностранных. Работа содержит 35 таблиц, 5 рисунков.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

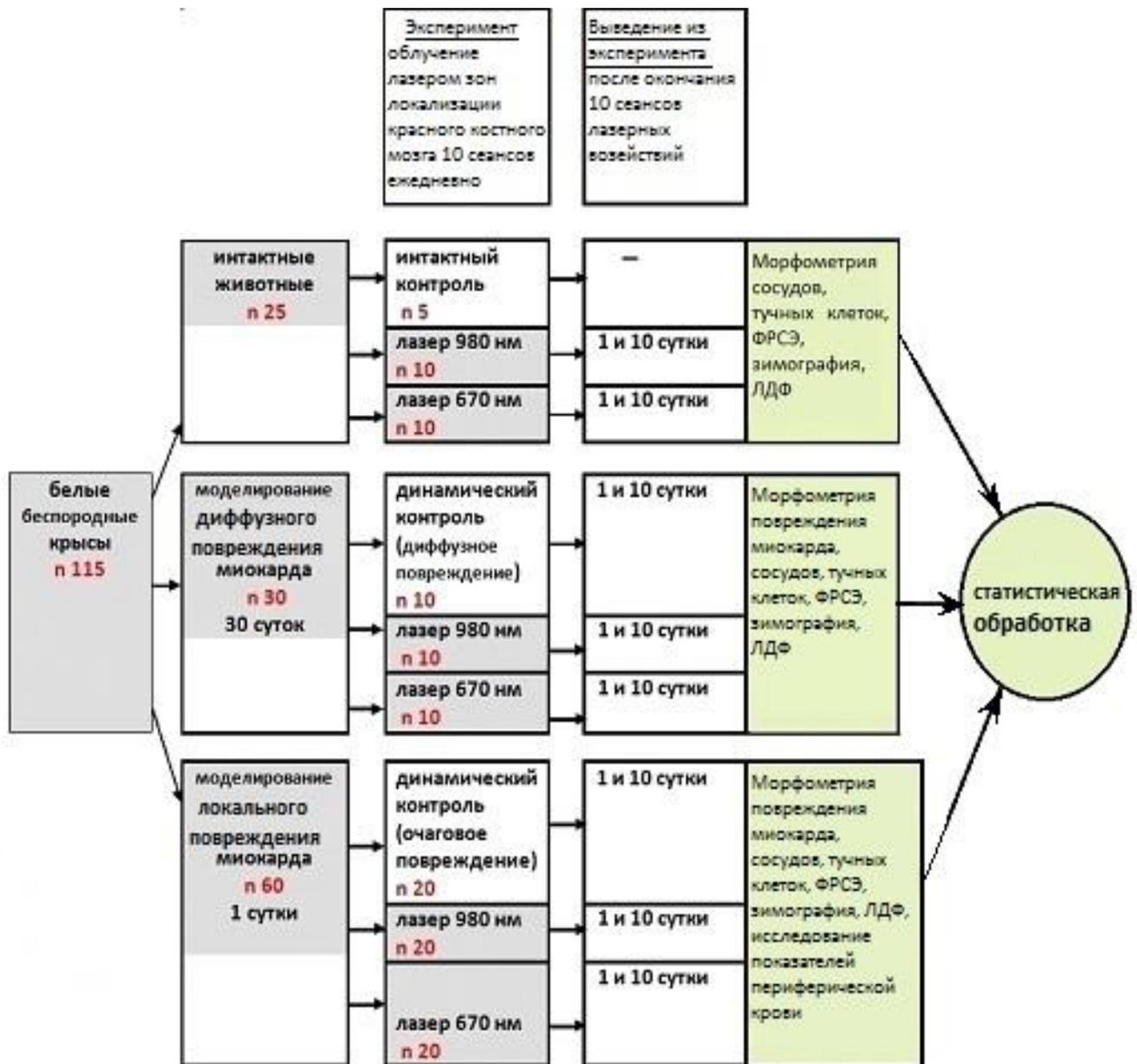


Рисунок 1. Дизайн экспериментального раздела исследования.

Экспериментальный раздел.

Проведено экспериментальное исследование на 115 беспородных половозрелых крысах обоего пола массой 180-220 г. (Рисунок 1). Животные содержались в условиях вивария, при свободном доступе к воде и пище. Моделирование локального повреждения миокарда осуществлялось воздействием лазером, что позволило получать очаг коагуляции мелких сосудов и эпикарда диаметром 0,2 см в бассейне нисходящей коронарной артерии. Очаг повреждения

миокарда формировался в течение суток и увеличивал свой диаметр в 1,5-2 раза. Диффузные ишемические изменения в миокарде крыс получали в условиях хронического гиподинамического стресса (1 месяц) (Рузов И.М., 1990).

В качестве источников лазерного излучения использовали диодные лазеры «ИРЭ-Полус» 980 нм (Россия) и «Лахта» 670 нм (Россия). Лазерное воздействие проводилось ежедневно, в течение 10 суток, на зоны локализации красного костного мозга (бедренные, тазовые кости, пояснично-крестцовый отдел позвоночника, хвост), воздействие осуществлялось через кожу, мощность 1 Вт, по 1 минуте на зону. Выведение животных из опыта проводили через 1 и 10 суток после окончания облучения.

Для оценки морфологии после стандартной гистологической проводки парафиновые срезы окрашивались гематоксилином-эозином, по ГОФПК для выявления фуксинофильных ишемических изменений, по Ван-Гизон для оценки соединительной ткани, толуидиновым синим (рН 2,0) для оценки тучных клеток. Микроскопия осуществлялась на микроскопе Leika DMRXA (Германия). Морфометрические исследования проводились на комплексе Диаморф Цито® (Россия), с помощью программ Диаморф Ипсо®. Подсчитывалась доля площади препарата, занятая сосудами, диаметр сосудов, индекс Керногана (соотношение толщины стенки и диаметра). Определение экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия проводилось иммуногистохимическим методом с использованием антител к VEGF(Sigma) и системы Immu-mark™(ICN).

Оценка показателей микроциркуляции тканей производилась с использованием прибора ЛАКК-01 (Россия) с использованием комплекта программ ООО «Лазма» (Россия).

Прямая зимография желатиназ проводилась в агарозном геле с внедренным желатином, окрашивание геля производилось Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma). Определяли оптическую плотность области лизиса с помощью программы анализа изображений «Imagescope M».

В периферической крови определяли количество эритроцитов и лейкоцитов, гемоглобин, гематокрит, количество ретикулоцитов. Сывороточный эритропоэтин

определяли методом иммуноферментного анализа с использованием реактивов «Вектор-Бест» (Россия).

Клинический раздел.

Для изучения миграции CD34⁺/45⁺ клеток из красного костного мозга в периферическую кровь пробы венозной крови забирались у 15 пациентов с острым инфарктом миокарда до воздействия лазером 980 нм на зоны локализации костного мозга, через час после первого воздействия, через 10 суток после окончания лечения (7 сеансов). Оценка количества CD34⁺/45⁺ клеток осуществлялась на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto II (BD Biosciences) с использованием реактивов CD45⁺-FITC/CD34⁺-PE (BD Biosciences) по стандартизированному протоколу с определением относительного количества клеток.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft Inc, США). Статистическая значимость различий сравниваемых признаков в группах проводилась с помощью U-теста Манна-Уитни (экспериментальный раздел, во всех группах n=5) и теста Вилкоксона (клинический раздел). Данные представлены в виде Me(UQ; LQ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В группе животных с диффузным повреждением миокарда на 10 сутки после окончания лазерного воздействия на костный мозг отмечалось значительное уменьшение площади фуксинофильной дегенерации («ишемии») кардиомиоцитов. Это происходило по всей площади препарата миокарда (как в области верхушки, так и основания желудочков) (Таблица 1). Площадь коллагеновых волокон соединительной ткани в миокарде с диффузным повреждением в группах животных, получивших лазерное воздействие,

Таблица 1.

Относительная площадь ишемических изменений (по ГОФПК) в миокарде с диффузным повреждением после лазерного воздействия на красный костный мозг, (%)

		Без лазерного воздействия	Лазерное облучение 980 нм	Лазерное облучение 670 нм
верхушка	1 сутки	11,2 (8,3; 15,6)	9,2 (7,7; 13,2) $p_1=0,345, p_3=0,401$	9,9 (7,9; 14,3) $p_2=0,345$
	10 сутки	10,5 (8,0; 14,2)	8,1 (6,3; 10,1) $p_1=0,012, p_3=0,529$	8,7 (6,9; 12,1) $p_2=0,009$
основание	1 сутки	14,3 (8,1; 18,1)	11,3 (7,2; 16,2) $p_1=0,346, p_3=0,916$	11,9 (7,9; 16,0) $p_2=0,401$
	10 сутки	13,1 (7,6; 17,1)	10,1 (5,2; 14,1) $p_1=0,008, p_3=0,525$	11,3 (7,4; 16,1) $p_2=0,008$

p_1 - между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 980 нм

p_2 - между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 670 нм

p_3 - между группами с лазерным воздействием 980 и 670 нм

на первые сутки не менялась. На 10 сутки после окончания воздействия происходило ее уменьшение по сравнению с контролем в области основания желудочков сердца. Между лазерами отличий не наблюдалось. Диаметр локального повреждения миокарда после окончания курса лазерного воздействия начинал уменьшаться уже с первых суток наблюдения, на 10 сутки также имелись достоверные отличия от контроля. Разницы между воздействием двух лазеров не отмечалось (Таблица 2). Таким образом, лазерное воздействие на красный костный мозг вызывало ускорение репарации как при диффузном, так и при очаговом повреждении миокарда.

После лазерного воздействия на костный мозг животных с диффузным повреждением миокарда наблюдалось увеличение относительной численной площади сосудистого русла в миокарде на 1 и 10 сутки по сравнению с контрольной группой без лазерного воздействия. (Таблица 3). При локальном повреждении миокарда такого не наблюдалось, что видимо было связано с преобладанием явлений воспалительной гиперемии на изучаемых сроках. После лазерного воздействия на костный мозг при диффузном повреждении отмечалось

Таблица 2

Диаметр локального повреждения миокарда после лазерного воздействия на красный костный мозг, (мм)

	Без лазерного воздействия	Лазерное облучение 980 нм	Лазерное облучение 670 нм
1 сутки	3,1 (2,6; 3,9)	2,6 (2,2; 3,0) $p_1=0,008$, $p_3=0,4$	2,7 (2,3; 3,4) $p_2=0,008$
10 суток	3,0 (2,3; 3,8)	2,2 (2,0; 2,6) $p_1=0,013$, $p_3=0,759$	2,3 (2,1; 3,0) $p_2=0,02$

p_1 - между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 980 нм
 p_2 - между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 670 нм
 p_3 - между группами с лазерным воздействием 980 и 670 нм

Таблица 3

Относительная площадь сосудистого русла в миокарде после лазерного воздействия на красный костный мозг, (%)

	Без лазерного воздействия		Лазерное облучение 980 нм		Лазерное облучение 670 нм	
	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток
интактный миокард	18,2 (13,1; 24,5)		19,3 (14,0; 25,1) $p_1=0,754$ $p_3=0,602$	21,3 (15,1; 29,6) $p_1=0,347$ $p_3=0,917$	20,2 (13,2; 26,4) $p_2=0,401$	22,2 (16,2; 25,5) $p_2=0,401$
диффузное повреждение	13,9 (11,1; 15,5) $p_4=0,174$	14,1 (12,2; 16,8) $p_4=0,174$	22,1 (19,4; 28,5) $p_1=0,009$ $p_3=0,834$ $p_4=0,174$	22,9 (17,3; 25,5) $p_1=0,009$ $p_3=0,347$ $p_4=0,401$	23,5 (19,1; 29,2) $p_2=0,009$ $p_4=0,174$	23,2 (18,2; 28,4) $p_2=0,009$ $p_4=0,294$
локальное повреждение	22,2 (18,9; 25,3) $p_4=0,250$	23,2 (19,1; 26,9) $p_4=0,174$	26,3 (19,9; 32,5) $p_1=0,251$ $p_3=0,106$ $p_4=0,075$	25,1 (19,7; 32,1) $p_1=0,602$ $p_3=0,916$ $p_4=0,174$	25,9 (20,4; 32,9) $p_2=0,294$ $p_4=0,075$	26,1 (20,9; 30,9) $p_2=0,602$ $p_4=0,075$

p_1 - между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 980 нм
 p_2 - между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 670 нм
 p_3 - между группами с лазерным воздействием 980 и 670 нм
 p_4 - между группой интактного контроля и группами с повреждением миокарда

увеличение просвета капилляров и диаметра артериол, диаметр вен не изменялся.

При локальном повреждении эти показатели не менялись. В группе с повреждением миокарда без лазерного воздействия на костный мозг индекс Керногана артерий был достоверно выше, чем в интактном миокарде. После

лазерного воздействия на костный мозг наблюдалось уменьшении индекса Керногана артерий, в группе диффузного повреждения миокарда - на всех сроках наблюдения, а в группе очагового повреждения только на 1 сутки, что могло являться свидетельством ликвидации сосудистого спазма. Индекс Керногана вен не изменялся.

Индекс эффективности микроциркуляции, представляющий соотношение активных медленноволновых и пассивных быстроволновых регуляторных влияний на сосудистую стенку достоверно увеличился после лазерного воздействия на костный мозг в группах животных с локальным повреждением миокарда на 10 сутки, у животных с диффузными повреждениями сердца изменений не было (Таблица 4). В группах животных с поврежденным миокардом

Таблица 4

Динамика индекса эффективности микроциркуляции в миокарде после лазерного воздействия на красный костный мозг

	Без лазерного воздействия		Лазерное облучение 980 нм		Лазерное облучение 670 нм	
	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток
интактный миокард	1,95 (1,81; 2,01)		1,96 (1,78; 1,99) p ₁ =0,529 p ₃ =0,401	1,96 (1,91; 2,02) p ₁ =0,461 p ₃ =0,916	1,98 (1,82; 2,01) p ₂ =0,916	1,98 (1,83; 2,03) p ₂ =0,529
диффузное повреждение	1,72 (1,67; 1,76) p ₄ =0,009	1,77 (1,69; 1,87) p ₄ =0,075	1,78 (1,69; 1,87) p ₁ =0,294 p ₃ =0,976 p ₄ =0,075	1,83 (1,73; 2,19) p ₁ =0,402 p ₃ =0,834 p ₄ =0,916	1,75 (1,68; 1,88) p ₂ =0,529 p ₄ =0,075	1,82 (1,74; 1,99) p ₂ =0,347 p ₄ =0,401
локальное повреждение	1,77 (1,69; 1,86) p ₄ =0,075	1,77(1,69; 1,84) p ₄ =0,075	1,81 (1,72; 1,89) p ₁ =0,347 p ₃ =0,402 p ₄ =0,142	1,92 (1,79; 1,96) p ₁ =0,008 p ₃ =0,751 p ₄ =0,463	1,81 (1,69; 1,87) p ₂ =0,753 p ₄ =0,142	1,87 (1,74; 1,93) p ₂ =0,009 p ₄ =0,464

p₁-между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 980 нм

p₂-между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 670 нм

p₃-между группами с лазерным воздействием 980 и 670 нм

p₄-между группой интактного контроля и группами с повреждением миокарда

наблюдалось снижение показателя микроциркуляции после лазерного воздействия, что свидетельствовало об увеличении вклада капиллярного звена, с более низкой линейной скоростью [Крупаткина А.И., Сидорова В.В., 2005].

В целом, наблюдаемые изменения микроциркуляции видимо были связаны с реакцией артериол на повышение содержания оксида азота, который мог локально синтезироваться в миокарде благодаря тучным и стволовым клеткам [Быков В.Л., 1999; Mannaioni F. et al., 1991; Bidri M. et al., 1997, 2001]. Известно, что лазерное воздействие на ткани повышает уровень NO в крови за счет активации NO-синтазы [Бриль Г.Е. 2000].

Популяция тучных клеток является своеобразным маркером процессов репарации и неоангиогенеза, проходящих в тканях, в том числе и при воздействии лазерного излучения (Epelman S., Mann D.L. 2012.). В первые сутки после окончания лазерного воздействия на костный мозг мы не обнаружили признаков непосредственного влияния лазерного облучения на тучные клетки миокарда, которое могло бы проявиться в виде экзоцитоза гранул и повышении индекса дегрануляции. Но снижение оптической плотности тучных клеток (Таблица 5) свидетельствовало об активности мерокринового типа секреции, за счет которого мастоцитами могут выделяться как медиаторы, так и ряд цитокинов, не связанных с гепарансульфатом. Индекс дегрануляции на 10 сутки достоверно повышался. Значительное снижение интегральной оптической плотности тучных клеток, выраженное во всех группах наблюдения, на этом сроке являлось следствием усиления экзоцитоза гранул. На 10 сутки после лазерного облучения в миокарде нами отмечалось достоверное увеличение количества мастоцитов. Усиление дегрануляции и увеличение содержания тучных клеток в миокарде является косвенным признаком успешно протекающих процессов репарации и неоангиогенеза. Известно, что чрезмерная активность ренин-ангиотензиновой системы, наблюдаемая при ССЗ, тормозит хоуминг тучных клеток в миокард. И наоборот, миграции мастоцитов способствуют клетки лейкоцитарного ряда, стволовые клетки и тучные клетки, присутствующие в зонах повреждения миокарда. [Ерохина И.Л.и др., 2009]. Активация тучных клеток приводит

попаданию содержащихся в их гранулах и цитоплазме цитокинов, ферментов и факторов роста в окружающие ткани [Кондашевская М.В., 2010.; Allakhverdi Z. et.al. 2013].

Таблица 5

Динамика интегральной оптической плотности тучных клеток в миокарде после лазерного воздействия на красный костный мозг, (у.е.)

	Без лазерного воздействия		Лазерное облучение 980 нм		Лазерное облучение 670 нм	
	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток
интактный миокард	10640 (8346; 12579)		9444 (8541; 10200) $p_1=0,601$ $p_3=0,465$	8891 (8237; 10748) $p_1=0,347$ $p_3=0,465$	9672 (8483; 9475) $p_2=0,601$	8977 (8291; 9947) $p_2=0,347$
диффузное повреждение	8946 (8132; 10342) $p_4=0,464$	8954 (8222; 10348) $p_4=0,464$	7852 (6539; 8085) $p_1=0,009$ $p_3=0,602$ $p_4=0,028$	7243 (6831; 7372) $p_1=0,009$ $p_3=0,602$ $p_4=0,009$	7877 (6498; 8047) $p_2=0,009$ $p_4=0,028$	7462 (6042; 7724) $p_2=0,009$ $p_4=0,016$
локальное повреждение	8653 (8245; 10348) $p_4=0,464$	8751 (8248; 10399) $p_4=0,464$	7439 (7121; 8171) $p_1=0,028$ $p_3=0,464$ $p_4=0,028$	7939 (6931; 8072) $p_1=0,016$ $p_3=0,754$ $p_4=0,047$	7443 (6835; 7583) $p_2=0,017$ $p_4=0,047$	7541 (6811; 7943) $p_2=0,016$ $p_4=0,028$

p_1 -между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 980 нм

p_2 -между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 670 нм

p_3 -между группами с лазерным воздействием 980 и 670 нм

p_4 -между группой интактного контроля и группами с повреждением миокарда

По литературным данным известно, что для успешной репарации в тканях должна быть достигнута адекватная концентрация факторов роста, их рецепторов и активация протеолитических ферментов, что усиливает пролиферативную активность клеток, их миграцию и способности к дифференцировке [Kim S. et al. 2013]. Фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) является главным регулятором процессов взаимодействия ферментов и других факторов роста в процессе неоангиогенеза. По нашим данным лазерное облучение красного костного мозга приводило повышению экспрессии VEGF в поврежденном

миокарде, что отмечалось на 1 и 10 сутки (Таблица 6), при этом между лазерами разницы не было. В интактном миокарде изменений экспрессии VEGF не наблюдалось. Источниками VEGF в поврежденном миокарде после лазерного воздействия на костный мозг могли являться стволовые клетки, тучные клетки, лейкоциты и клетки сосудистой стенки [Theoharides T.C. et.al., 2010; Ekström K. et.al., 2012].

Таблица 6

Экспрессия VEGF в миокарде после системного лазерного воздействия, (у.е.)

	Без лазерного воздействия		Лазерное облучение 980 нм		Лазерное облучение 670 нм	
	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток
интактный миокард	11,6 (7,8; 15,1)		14,4 (9,6; 19,9) p ₁ =0,347 p ₃ =0,917	15,1 (10,3; 17,2) p ₁ =0,294 p ₃ =0,347	14,5 (9,9;19,4) p ₂ =0,347	14,9 (9,7; 16,8) p ₂ =0,347
диффузное повреждение	16,1 (11,5; 18,3) p ₄ =0,175	15,7(14,7; 18,4) p ₄ =0,075	29,2 (19,9; 36,1) p ₁ =0,009 p ₃ =0,894 p ₄ =0,009	28,3 (21,3; 35,3) p ₁ =0,009 p ₃ =0,916 p ₄ =0,009	25,1 (20,1; 33,5) p ₂ =0,009 p ₄ =0,009	25,2 (19,2; 38,4) p ₂ =0,009 p ₄ =0,009
локальное повреждение	17,1 (13,1; 18,8) p ₄ =0,05	16,2(11,3; 19,1) p ₄ =0,174	29,8 (21,6; 39,9) p ₁ =0,009 p ₃ =0,347 p ₄ =0,009	25,5 (19,8; 32,7) p ₁ =0,009 p ₃ =0,347 p ₄ =0,009	25,5 (20,9; 39,4) p ₂ =0,009 p ₄ =0,009	27,4 (20,1; 35,4) p ₂ =0,009 p ₄ =0,009

p₁-между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 980 нм

p₂-между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 670 нм

p₃-между группами с лазерным воздействием 980 и 670 нм

p₄-между группой интактного контроля и группами с повреждением миокарда

Лазерное облучение костного мозга приводило к повышению желатинолитической активности в поврежденном миокарде, что отмечалось на 1 и 10 сутки (Таблица 7). Активность протеаз примерно одинаково изменялась как при диффузном, так и при локальном повреждении. Источниками протеаз являются все мигрирующие клетки - лейкоциты, фибробласты, клетки сосудистых стенок, тучные клетки. Дегрануляция тучных клеток могла оказывать прямое

воздействие на локальный протеолиз, за счет проэнзимов ММП 2 и ММП 9 и химазы, способной активировать эти ферменты при совместном выделении во внеклеточный матрикс [Frossi B. et.al., 2004; Galli S.J. et.al.. 2005.]. Стволовые клетки также синтезируют протеазы системы плазмина и ММП 2 и 9 [Loffredo S.et.al., 2014].

Таблица 7

Активность желатиназ в миокарде после лазерного воздействия, (у.е.)

	Без лазерного воздействия		Лазерное облучение 980 нм		Лазерное облучение 670 нм	
	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток	1 сутки	10 суток
интактный миокард	145,6 (136,8;152,4)		149,4 (137,6; 159,9) p ₁ =0,464 p ₃ =0,601	139,1 (132,4; 157,1) p ₁ =0,916 p ₃ =0,347	148,5 (139,9; 163,4) p ₂ =0,401	142,6 (134,7; 161,2) p ₂ =0,916
диффузное повреждение	165,9 (149,5; 178,3) p ₄ =0,117	155,8 (145,7; 181,3) p ₄ =0,117	189,2 (184,2; 193,1) p ₁ =0,009 p ₃ =0,528 p ₄ =0,009	185,1 (183,3; 198,2) p ₁ =0,009 p ₃ =0,916 p ₄ =0,009	185,6 (180,1; 193,1) p ₂ =0,009 p ₄ =0,009	190,2 (189,2; 196,2) p ₂ =0,009 p ₄ =0,009
локальное повреждение	172,9 (167,1; 182,3) p ₄ =0,009	169,9 (154,3; 179,9) p ₄ =0,011	189,4 (185,6; 192,1) p ₁ =0,009 p ₃ =0,529 p ₄ =0,009	184,1 (180,7; 192,3) p ₁ =0,028 p ₃ =0,600 p ₄ =0,009	190,5 (185,9; 199,6) p ₂ =0,009 p ₄ =0,009	185,9 (180,3; 190,4) p ₂ =0,028 p ₄ =0,009

p₁-между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 980 нм

p₂-между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием 670 нм

p₃-между группами с лазерным воздействием 980 и 670 нм

p₄-между группой интактного контроля и группами с повреждением миокарда

Исследования миграции CD34⁺ клеток из красного костного мозга в периферическую кровь под действием лазерного излучения показали, что через 1 час после воздействия происходило увеличение содержания этих клеток в крови не менее чем в 2-3 раза (Таблица 8). У 50% больных наблюдалось увеличение содержания CD34⁺ клеток до 10 раз. Спустя 10 суток после окончания лазерной терапии (7 сеансов) достоверных отличий содержания CD34⁺ клеток в крови от

показателей до воздействия не отмечалось, что свидетельствует об отсутствии долговременного эффекта от лазерного облучения костного мозга.

Таблица 8.

Динамика содержания CD34⁺/45⁺ клеток в периферической крови больных острым инфарктом миокарда после лазерного воздействия на зоны локализации красного костного мозга.

	N, количество проб крови	Содержание CD34 ⁺ /45 ⁺ клеток, %	P, в сравнении с контролем (критерий Вилкоксона)
Контроль (до лазерного воздействия)	15	0,09 (0,03;0,12)	
Через 1 час после лазерного воздействия	15	0,18 (0,09;0,35)	P=0,009
Через 10 суток после окончания лазерной терапии	7	0,15 (0,06; 0,19)	P=0,07

Известно, что при лазерном воздействии на костный мозг перестраивается микроокружение стволовых клеток, происходит расширение просвета сосудов костного мозга, что сказывается на усилении миграции клеток в периферическую кровь. [Кравченко Т.Г., Головнева Е.С, 2008). На фоне усиления миграции стволовых клеток возможно кратковременное повышение их пролиферации (Ogon U., 2011). Эти факторы могут являться определяющими в увеличении концентрации циркулирующих стволовых клеток в крови. Под действием лазерного облучения не только CD34⁺, но и другие клетки из костного мозга мигрируют в кровь. По нашим данным при воздействии лазера 980 нм на костный мозг животных с локальным повреждением, содержание эритроцитов крови достоверно увеличивалось на 1 сутки и оставалось повышенным на 10 сутки, абсолютное содержание ретикулоцитов в крови также росло с первых суток (Таблица 8). Одновременно с повышением количества эритроцитов происходил рост гемоглобина и гематокрита. Содержание эритропоэтина в сыворотке крови на первые сутки было достоверно сниженным при воздействии лазера. Содержание лейкоцитов в периферической крови животных достоверно возрастало на первые сутки, и возвращалось к исходным значениям на 10 сутки

Таблица 8.

Динамика некоторых показателей периферической крови после лазерного воздействия на красный костный мозг

		Гемоглобин, г/л	Эритроциты, $\times 10^{12}/л$	Ретикулоциты, ‰	Эритропоэтин МЕ/л	Лейкоциты, $\times 10^9/л$
Локальное повреждение миокарда	1 сутки	150 (142;153)	6,35 (6,29;6,80)	18 (17;20)	4,223 (4,021; 4,435)	8,25 (8,11; 10,02)
	10 сутки	151 (144; 153)	6,45 (6,32;6,85)	17 (16;20)	4,313 (4,120; 4,699)	8,73 (8,31; 11,5)
Локальное повреждение миокарда +лазерное воздействие 980 нм	1 сутки	168 (163;179) $p_1 = 0,009$ $p_2 = 0,174$	7,65 (6,92;7,94) $p_1 = 0,009$ $p_2 = 0,401$	24 (21;29) $p_1 = 0,014$ $p_2 = 0,916$	3,339 (2,098; 3,347) $p_1 = 0,009$ $p_2 = 0,075$	15,32 (15,0;17,2) $p_1 = 0,009$ $p_2 = 0,251$
	10 сутки	159 (158;162) $p_1 = 0,009$ $p_2 = 0,600$	7,39 (6,93;7,75) $p_1 = 0,009$ $p_2 = 0,174$	19 (18;20) $p_1 = 0,289$ $p_2 = 0,394$	4,562 (4,312; 4,834) $p_1 = 0,347$ $p_2 = 0,465$	10,05 (8,45;11,98) $p_1 = 0,028$ $p_2 = 0,753$
Локальное повреждение миокарда +лазерное воздействие 670 нм	1 сутки	159 (158;171) $p_1 = 0,009$	7,65 (7,00;8,75) $p_1 = 0,009$	26 (20;32) $p_1 = 0,058$	3,735 (3,349; 3,928) $p_1 = 0,028$	14,61 (11,9;15,95) $p_1 = 0,028$
	10 сутки	152 (143;169) $p_1 = 0,754$	8,40 (7,15;11,6) $p_1 = 0,009$	18 (16;20) $p_1 = 0,743$	4,892 (4,311; 6,012) $p_1 = 0,174$	10,15 (8,25;11,75) $p_1 = 0,754$

p_1 - между группами без лазерного воздействия и с лазерным воздействием

p_2 - между группами после лазерного воздействия 970 нм и 670 нм

Заключение

Лазерное воздействие на зоны локализации костного мозга служит триггерным моментом активации его разнообразных клеточных популяций – стволовых, созревающих, зрелых клеток и клеток стромы (Рисунок 2). Благодаря усилению миграции клеток из костного мозга происходит изменение состава



Рисунок 2. Механизмы влияния лазерного облучения зон локализации красного костного мозга на репарацию поврежденного миокарда.

периферической крови, как со стороны лейкоцитарного звена, так и со стороны эритроцитарного звена. Повышение количества эритроцитов и содержания гемоглобина должно влиять на увеличение кислородтранспортных возможностей

крови и способствовать протеканию репаративных процессов. Увеличение содержания циркулирующих стволовых клеток в крови позволяет повысить их хоуминг в зоны поврежденного миокарда, где эти клетки могут паракринно воздействовать на регуляцию сосудистого тонуса, пролиферацию, неоангиогенез и выживаемость кардиомиоцитов в ишемизированных зонах, за счет непосредственного выделения факторов роста и ферментов и воздействия на синтетические возможности других клеточных популяций. Возможность стволовых клеток влиять на тучные клетки, являющихся в свою очередь регуляторами тонуса и пролиферации клеток микроциркуляторного русла, проявляется в активации дегрануляции мастоцитов, увеличении их количества в миокарде.

Начиная с первых суток после окончания лазерного воздействия на костный мозг, в поврежденном миокарде отмечается повышение экспрессии фактора сосудистого эндотелия и желатиназной активности, что является базой для неоангиогенеза в миокарде. Отсутствие подобных изменений в интактном миокарде, свидетельствует о хоуминге в поврежденную ткань клеток - источников этих биологически активных веществ, главными из которых по нашему мнению являются стволовые и тучные клетки, а также клетки лейкоцитарного ряда, участвующие в воспалении.

Наблюдаемая нормализация микроциркуляции на фоне увеличения площади сосудистого русла, артериального кровотока и повышения кислородтранспортных возможностей крови позволяет минимизировать явления ишемии у животных, получавших лазерную терапию. Процессы репарации миокарда проходят в условиях достаточной обеспеченности тканей кислородом и питательными веществами, сохраняя баланс между пролиферацией фибробластов и максимально возможным сохранением структуры миокарда. В результате в группе животных, облученных лазером, происходит достоверное уменьшение площади ишемических изменений кардиомиоцитов и соединительной ткани при диффузном повреждении миокарда и очага некроза при локальном повреждении.

Выводы

1. После окончания среднеинтенсивного лазерного воздействия на костный мозг с первых суток наблюдается достоверное уменьшение очага некроза при локальном повреждении, а с 10 суток уменьшение площади ишемических изменений кардиомиоцитов и коллагеновых волокон соединительной ткани при диффузном повреждении миокарда.
2. Реакция сосудов микроциркуляторного русла поврежденного миокарда на среднеинтенсивное лазерное облучение костного мозга проявляется в виде увеличения относительной площади сосудистого русла, увеличения просвета капилляров, снижения индекса Керногана артериальных сосудов начиная с первых суток наблюдения. При этом происходит восстановление функциональной регуляции микроциркуляции, что отражается в снижении значений показателя микроциркуляции для диффузного и локального повреждения миокарда на 1 и 10 сутки и приросте индекса флаксомоций микроциркуляции для локального повреждения на 10 сутки.
3. Среднеинтенсивное лазерное воздействие на зоны локализации костного мозга приводит к повышению функциональной активности тучных клеток в поврежденном миокарде: на первые сутки после облучения снижается интегральная оптическая плотность, на 10 сутки происходит усиление экзоцитоза гранул, увеличение количества и дальнейшее снижение оптической плотности мастоцитов.
4. После среднеинтенсивного лазерного воздействия на зоны локализации костного мозга происходит усиление экспрессии фактора роста сосудистого эндотелия в поврежденном миокарде на всех сроках наблюдения.
5. После среднеинтенсивного лазерного воздействия на костный мозг в поврежденном миокарде наблюдается повышение активности желатиназ на 1 сутки и 10 сутки наблюдения.
6. Среднеинтенсивное лазерное облучение зон локализации костного мозга у больных с острым инфарктом миокарда вызывает повышение миграции CD34⁺/45⁺ клеток в периферическую кровь, где их содержание увеличивается в 2-3 раза. К 10 суткам после окончания облучения содержание CD34⁺/45⁺ клеток не отличается от контроля.

7. У животных с локальным повреждением миокарда после среднеинтенсивного лазерного облучения зон локализации костного мозга в периферической крови в первые сутки отмечается увеличение содержания эритроцитов, ретикулоцитов, гемоглобина, лейкоцитов, на 10 сутки повышено только количество эритроцитов.

8. Выраженность репаративных изменений, наблюдаемых в миокарде после среднеинтенсивного лазерного воздействия на зоны локализации костного мозга, не отличается при использовании лазеров с длиной волны 670 и 980 нм.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1 **Талипова В.Р.**, Головнева Е.С., Влияние системного применения высокоинтенсивного лазерного излучения на репарацию сердечной мышцы после экспериментальной ишемии // Механизмы функционирования висцеральных систем. Материалы V Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения В.Н. Черниговского: сб. науч. работ. – СПб, 2007. - С. 90-91.

2.**Талипова В.Р.**, Головнева Е.С., Волкова Э.Г. Влияние системного применения высокоинтенсивного лазерного излучения на уровень CD 34+ клеток периферической крови у пациентов с острым инфарктом миокарда // Научное наследие академика Л.А.Орбели. Структурные и функциональные основы эволюции функций, физиология экстремальных состояний: сб. материалов всеросс. конф. – СПб, 2008. - С. 31-32.

3.**Талипова В.Р.**, Головнева Е.С., Волкова Э.Г. Разработка нового терапевтического немедикаментозного способа лечения инфаркта миокарда // **Медицинский вестник Башкортостана.** - 2009. - Т.4(2). - С.129-131.

4.**Талипова В.Р.**, Головнева Е.С., Гужина А.О., Кравченко Т.Г. Системное высокоинтенсивное лазерное облучение в лечении пациентов с ишемическими синдромами // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: сб. трудов первой международной науч.-практ. конф. - СПб, 2010. - С.173-175.

5. **Талипова В.Р.**, Головнева Е.С., Гужина А.О., Кравченко Т.Г. Применение системного высокоинтенсивного лазерного облучения в лечении пациентов с

ишемическими синдромами /Тезисы конференции// **Лазерная медицина.**-2011. - т.15.,вып.2. - С.52.

6. Головнева Е.С., Рейдман В.Р., Гужина А.О., Кравченко Т.Г. Влияние среднеинтенсивного лазерного облучения зон локализации красного костного мозга на репаративные процессы в ишемизированных тканях // Материалы I Национального конгресса по регенеративной медицине. - М., 2013. - С. 63.

7. **Рейдман В.Р.**, Головнева Е.С. Репарация миокарда с экспериментальными ишемическими изменениями после среднеинтенсивного лазерного облучения зон локализации костного мозга // Материалы научно-практической патолого-анатомической конференции Южного Урала с участием патологоанатомов других регионов России и СНГ, посвященной 30-летию основания Челябинского областного патолого-анатомического бюро. – Челябинск, 2014. – С. 16-17.

8. **Рейдман В.Р.**, Головнева Е.С., Кравченко Т.Г. Динамика репаративных процессов в миокарде после лазерного облучения зон локализации красного костного мозга // **Лазерная медицина.** – 2014. – Т.18, Вып. 2. – С. 36-39.

9. **Рейдман В.Р.**, Головнева Е.С., Омеляненко А.Г. Возможности репарации поврежденного миокарда после лазерного облучения зон локализации костного мозга // **Вестник уральской медицинской академической науки.** – 2014. – Т.3 (49). – С. 133-134.

10. Козель А.И., Головнева Е.С., Кравченко Т.Г. **Рейдман В.Р.** Новые аспекты клеточной терапии ишемических заболеваний сердца /Обзорная статья // **Вестник новых медицинских технологий.**- 2015. -Т.22, - №3 – 165-171.

11. Головнева Е.С., **Рейдман В.Р.** Реакция тучных клеток миокарда после лазерного облучения зон локализации красного костного мозга // **Российский иммунологический журнал.**- 2015.-Т.9 (18), № 2 (1),- С.776-778.

12. Головнева Е.С., **Рейдман В.Р.** Экспрессия фактора роста сосудистого эндотелия в миокарде после лазерного облучения зон локализации костного мозга // Материалы II Национального конгресса по регенеративной медицине. - М., 2015. - С. 53.

Список сокращений:

ОИМ - острый инфаркт миокарда	ГОФПК - окраска гематоксилин -основной
СК - стволовые клетки	фуксин -пикриновая кислота
ФРСЭ (VEGF) -фактор роста сосудистого	ЛДФ -лазерная доплер флуометрия
эндотелия	ММП - матриксные металлопротеиназы