

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ЖЕЛАТИНАЗ И РЕАКЦИЙ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ В ТКАНЯХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ДЕСНЫ КРЫСЫ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ИНФРАКРАСНОГО ДИАПАЗОНА

*Е.Р. Гиниатуллина, Е.С. Головнева, Р.У. Гиниатуллин, Т.Г. Кравченко
ОГУЗ ЦОСМП «Челябинский государственный институт лазерной хирургии», г. Челябинск*

На беспородных половозрелых крысах с помощью биохимического и морфологического методов исследованы динамика активности желатиназ и реакций кровеносных сосудов в слизистой оболочке десны после воздействия инфракрасного лазерного излучения с длиной волны 970 нм и мощностью 0,5 Вт в непрерывном режиме. Анализ результатов количественных исследований показал достоверное увеличение активности желатиназ, диаметра сосудов и занимаемой ими площади на разных сроках эксперимента по сравнению контрольной группой, а также наличие сильной прямой корреляционной связи между активностью ферментов и показателями сосудов.

Ключевые слова: низкоинтенсивное лазерное излучение, слизистая оболочка десны, кровеносные сосуды, желатиназы.

Введение. Принято считать, что применение низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) инфракрасного диапазона в клинической практике определяется спектром его действия. Глубоко проникая в ткани, НИЛИ данного спектра приводит к активации физиологических процессов, как в условиях нормы, так и патологии [2]. Вместе с тем, многие вопросы, касающиеся физиологии адаптационных процессов, развивающихся в слизистой оболочке десны (СОД) на воздействие НИЛИ, в частности с длиной волны 970 нм и мощностью 0,5 Вт, остаются неизученными.

Из данных литературы известно, что желатиназы играют важную роль при адаптивных реакциях тканей на лазерное воздействие [3]. Желатиназы представляют собой цинксодержащие протеолитические ферменты, способные к специфическому гидролизу всех основных белков экстрацеллюлярного матрикса, что необходимо для миграции различных клеток и участия их в активации реактивности кровеносных сосудов [5, 6]. Следовательно, уровень активности желатиназ в биологических тканях может являться одним из показателей функционального состояния сосудистого русла.

Цель работы – изучить динамику активности желатиназ и реакций кровеносных сосудов в СОД крысы после воздействия НИЛИ с длиной волны 970 нм и мощностью 0,5 Вт.

Методика. Исследование проведено на 30 здоровых лабораторных половозрелых крысах обоего пола массой 210–250 г. опыты проводили в соответствии с приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г. об обеспечении принципов гуманного

обращения с животными. Весь материал был разделен на две группы: 1-я – опытная (25 крыс), 2-я – контрольная (5 крыс). Все эксперименты проводили под внутримышечным введением золетила (2 мг/кг массы животного). Крысам 1-й серии опытов проводили однократное, дистанционное в непрерывном режиме лазерное облучение СОД в области левых и правых нижних моляров. Применяли излучение диодного лазера «ИРЭ-Полус» (Россия) с длиной волны 970 нм, мощностью 0,5 Вт и экспозицией 30 с с обеих сторон.

Важно отметить, что указанные режимы лазерного излучения применяются в стоматологической практике [2, 4]. У животных 2-й группы лазерное облучение не проводилось. У крыс 1-й группы через 1 мин, на 1, 3, 5, 7-е сутки после облучения, а также у крыс 2-й группы проводили биопсию в области левых и правых нижних моляров с помощью специального биопсийного форцепта, снабженного шипчиками («Karl Storz», Germany). При этом диаметр биоптата составлял до 0,3 см. Один из биоптатов использовался для зимографического, другой – для гистологического исследования.

Суммарная активность желатиназ оценивалась методом прямой зимографии [7]. Гомогенат биоптата СОД в буфере (20 mM Ca Cl₂; 150 mM Na Cl; 0,01 % Triton X-100; 50 mM Tris – Cl, pH 6,8) наносили пробами по 10 мкл на предварительно подготовленный гель агарозы 1 % (ICN) на кальциевом буфере (20 mM Ca Cl₂; 150 mM NaCl; 50 mM Tris – CL, pH 7,4) с добавлением 0,2 % желатина. Затем гели инкубировали при температуре 37 °C

в течение 16 часов, фиксировали 20 % уксусной кислотой и окрашивали 0,1 % раствором Coomassie Brilliant Blue R-250. Окрашенные зимограммы сканировали, на изображении определяли яркость области лизиса с помощью программы анализа изображения «Imagescope M».

Биоптаты СОД фиксировались в 10 % нейтральном растворе формалина, обезжизивались в спиртах возрастающей крепости, заливались в парафин. С парафиновых блоков готовились серийные срезы, которые окрашивались гематоксилином и эозином для количественной оценки кровеносных сосудов. С помощью компьютеризированной системы анализа цветового изображения и программы «Imagescope M» (Россия) под световым микроскопом («Leica», Germany) при увеличении в 400 раз подсчитывалась доля площади (%) среза, занятая кровеносными сосудами, и определялся их диаметр (мкм). Обработка цифровых данных проводилась методом вариационной статистики с применением U-теста Манна-Уитни [1]. Различия между сравниваемыми показателями считали достоверными при $p < 0,05$. Для изучения взаимосвязи между параметрами производился расчет коэффициента ранговой корреляции Спирмена. Степень корреляции считалась сильной при величине коэффициента корреляции от 0,8 до 1,0.

Результаты исследования и их обсуждение.

Количественные зимографические исследования биоптатов СОД показали (см. таблицу), что через 1 мин на 1, 3, 5-е сутки после лазерного воздействия активность желатиназ достоверно увеличилась по сравнению с контрольной группой. Кроме того, активность данных ферментов на 5 и 7-е сутки после лазерного облучения была значительно выше по отношению к предыдущему сроку наблюдения.

Наряду с этим морфометрическое исследование гистологических препаратов СОД показало, что диаметр кровеносных сосудов через 1 мин, на

1-е и 3-и сутки после лазерного облучения существенно увеличился, а на 5 и 7-е сутки не отличался по сравнению с контрольной группой.

Кроме этого, через 1 мин и на 1-е сутки после лазерного воздействия регистрировалось значительное увеличение площади, занимаемой сосудами, в тканях СОД по сравнению с контрольной группой. Причем на 1-е и 3-и сутки отмечалось увеличение исследованного показателя, как и диаметра сосудов, по сравнению с предыдущим сроком опыта.

Путем вычисления коэффициента корреляции Спирмена нами были выявлены сильные положительные корреляционные связи между активностью желатиназ и диаметром сосудов через 1 мин и на 1-е сутки после лазерного облучения ($r = 0,85$ и $r = 0,81$ соответственно). В эти же сроки отмечена сильная прямая корреляционная связь между активностью желатиназ и площадью, занимаемой сосудами ($r = 0,85$ и $r = 0,86$ соответственно).

Результаты нашего исследования согласуются с данными литературы о последовательности развития биологических эффектов в ответ на действие НИЛИ [2]: поглощение энергии фотона внутриклеточными компонентами → локальный нагрев тканей → изменение концентрации Ca^{2+} в тканях → стимуляция Ca^{2+} – зависимых адаптационных реакций: повышение синтеза и активности ферментов, активация метаболизма клеток и повышение их функциональной активности, активизация микроциркуляции и других реакций. Исходя из изложенного, становится понятным повышение функциональной активности желатиназ и реактивности кровеносных сосудов в тканях СОД крыс после воздействия НИЛИ инфракрасного диапазона.

Заключение. Таким образом, через 1 мин, на 1, 3, 5, 7-е сутки после однократного воздействия НИЛИ с длиной волны 970 нм, мощностью 0,5 Вт и экспозицией 30 с на СОД крысы, в облученных

Количественная характеристика активности желатиназ,
диаметра и площади кровеносных сосудов в тканях СОД после лазерного облучения (M ± m)

Исследованный показатель	КГ (n=5)	Сроки наблюдения				
		1 мин (n = 5)	1 сутки (n = 5)	3 сутки (n = 5)	5 сутки (n = 5)	7 сутки (n = 5)
Активность желатиназ, усл. ед.	145,6 ± 1,16	161,8 ± 1,95*	157,0 ± 2,07*	158,4 ± 0,74*	152,6 ± 2,24***	145,6 ± 2,24**
Диаметр сосудов, мкм	23,3 ± 0,3	35,3 ± 0,3*	30 ± 0,2***	24,2 ± 0,49**	23,9 ± 0,8	21,6 ± 2,03
Площадь, занимаемая сосудами, %	24,1 ± 0,4	36,1 ± 0,3*	28,8 ± 0,5***	21,3 ± 0,86***	21,4 ± 0,51*	21,2 ± 0,37*

Примечание: КГ – контрольная группа; n – число животных; * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой; ** $p < 0,05$ по сравнению с предыдущим сроком наблюдения.

тканях регистрируется достоверное повышение активности желатиназ, что сопровождается увеличением диаметра кровеносных сосудов и занимаемой ими площади на ранних сроках опытов по сравнению с контролем. Наличие прямой сильной корреляционной связи между показателями активности желатиназ и кровеносных сосудов (диаметр и их площадь) позволяют рассматривать эти данные как взаимосвязано развивающиеся адаптационные реакции в тканях СОД, способствующие эффективному действию НИЛИ инфракрасного диапазона при использовании его в клинической стоматологии.

Литература

1. Автандилов, Г.Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г. Автандилов. – М.: Медицина, 2002. – 238 с.
2. Амирханян, А.Н. Лазерная терапия в стоматологии / А.Н. Амирханян, С.В. Москвин. – М.; Тверь: Триада, 2008. – 72 с.
3. Кравченко, Т.Г. Реакция отдельных компонентов кроветворного микроспружения на воздействие высокоинтенсивного лазерного излучения в неповреждающих режимах: автореф. дис. ...

канд. мед. наук / Т.Г. Кравченко. – Челябинск, 2008. – 22 с.

4. Сравнительная оценка воздействия на микроциркуляцию низкоинтенсивного импульсного и непрерывного лазерного излучения красного и инфракрасного диапазонов в комплексной терапии хронического пародонтита / Е.Н. Кречина, В.В. Маслова, А.В. Шидова, С.В. Москвин // Лазерная медицина. – 2009. – Вып. 2. – Т. 13. – С. 22–26.

5. Human mast cell – derived gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) is regulated by inflammatory cytokines: role in cell migration / N. Girolamo, I. Indoh, N. Jackson et al. // J. Immunol. – 2006. – Vol. 177, № 4. – P. 2638–2650.

6. Bellosta, S. Raloxifene inhibits matrix metalloproteinases expression activity in macrophages and smooth muscle cells / S. Bellosta, R. Baetta, M. Canavesi et al. // Pharmacol. Res. – 2007. – Vol. 56, № 2. – P. 160–167.

7. Tyagi, S. Temporal expression of extracellular matrix metalloproteinases and tissue plasminogen activator in the development of collateral vessels in the canine model of coronary occlusion / S. Tyagi, S. Kumar, S. Cassat // Can. J. Physiol. Pharmacol. – 1996. – Vol. 74. – P. 983–995.

Поступила в редакцию 15 сентября 2010 г.