

“Утверждаю”

проректор по научной работе СГМУ

проф. **Л.М. Огородова**

12 мая 1998 года

**Отчет
о иммуностропных свойствах излучения
аппарата для светодиодной терапии “Дюна-Т”
(экспериментальные данные)**

Влияние излучения аппарата “Дюна-Т” на функциональное состояние естественных факторов иммунитета исследовали в эксперименте на неинбредных белых мышах-самцах массой тела 22-24 г. Общее количество животных, использованных в эксперименте, 50 особей.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Животные подвергались воздействию излучения светодиодного аппарата “Дюна-Т”, работающего в постоянном режиме. Облучению подвергалась область 3-4 шейного позвонка, площадь облучения 1 см², энергия излучения – 0,69 Дж/см². Зона облучения выбрана по той причине, что здесь расположены рефлексогенные точки, раздражение которых влияет на работу органов грудной клетки, в том числе и центрального органа иммунитета тимуса, и селезенки. Светодиод прибора располагался на расстоянии 1 см от поверхности кожного покрова, время воздействия – 5 минут ежедневно в течение 10 дней. Энергия излучения прибора на единицу площади зависит от времени воздействия, и с этим показателем может быть связана реакция иммунной системы на светодиодное раздражение. В связи с этим экспериментально была подобрана указанная выше доза излучения, названная эффективной, которая в данном случае может регулироваться (изменяться) только длительностью воздействия прибора на указанную область.

ПОДБОР ЭФФЕКТИВНОЙ ДОЗЫ ИЗЛУЧЕНИЯ ПРИБОРА

В основу данного исследования положен принцип формирования адаптационных реакций организма в ответ на различные физические воздействия, описанный Гаркави Л.Х., Квакиной Е.Б., Уколовой М.А. 1979г. Воздействие на организм человека или животных физических факторов часто рассматривается как стрессирующий агент, а потому со стороны иммунной системы следует ожидать реакции, свойственные реакциям “стресс”, т.е. снижения числа лейкоцитов и лимфоцитов в крови, снижение числа ядросодержащих клеток в лимфоидных органах, в частности, в тимусе, выброса в кровь гормонов коры надпочечников типа кортизона, что в свою очередь может привести к снижению функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Если при проведении физиотерапевтических процедур в организме у больного развивается такая реакция, положительного эффекта от проводимой терапии не наблюдается. В такой ситуации физические характеристики процедуры воздействия должны быть изменены индивидуально до реакции организма “активация” или “тренировка”. Эту реакцию можно регистрировать по клеточному составу периферической крови, определяя показатель “К” (соотношение лимфоцит/нейтрофил).

В нашем варианте эксперимента удобно менять физические параметры излучения прибора, меняя время облучения. Подбор эффективной (рабочей) дозы был проведен на группе мышей-самцов массой тела 22-24г., разделенных на 3 группы по 10 особей в каждой:

- 1 время воздействия 1 мин;
- 2 время воздействия 5 мин;
- 3 время воздействия 10 мин.

Через сутки после облучения животных, у последних забирались крови из хвостовой вены. В крови определялось количество лейкоцитов, просчитывалась формула крови, вычислялся коэффициент “К”. Полученные показатели сравнивались с показателями у этих же мышей до воздействия излучения аппарата “Дюна-Т”.

Результаты эксперимента вынесены в Таблицу 1. Полученные экспериментальные данные позволили в качестве эффективной дозы выбрать дозу, равную энергии излучения 0,69 Дж/см², получаемую экспериментальными животными за время облучения 5 минут. Используя эту дозу облучения, у животных получили умеренное увеличение в крови лейкоцитов и лимфоцитов при неизменном коэффициенте “К” – адаптационная реакция организма “тренировка”. Именно эта доза была использована в качестве рабочей в последующих экспериментах для определения иммуностропных свойств излучения аппарата для фотодиодной терапии “Дюна-Т”.

СХЕМА ЭКСПЕРИМЕНТА

Животные были разделены на 2 группы по 10 особей в каждой группе:

1 группа – контрольные мыши – животные оставшиеся без каких-либо воздействий в условиях вивария;

2 группа – опытные животные, подвергавшиеся воздействию излучения прибора для фототерапии “Дюна-Т”; каждое опытное животное облучалось в течение 5 минут ежедневно в течение 10 суток; по окончании физиопроцедур (на 11-е сутки) животных забивали декапитацией; параллельно с опытными животными забивались животные контрольной группы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для определения реакций иммунной системы в ответ на действующий раздражитель были выбраны следующие показатели:

1. число лейкоцитов крови при заборе последней из тела животных и формулу крови определяли общепринятым в гематологии методом;
2. число В-лимфоцитов в крови животных определяли методом ЕАС-розеткообразования (Д.К. Новиков, В.И. Новикова, 1979);
3. число нормальных антителообразующих клеток селезенки (АОК) определяли методом Cunningham, 1965;
4. нормальные антитела (АТ) в сыворотке крови определяли по наличию в последней нормальных гетерогемагглютининов при двукратном разведении сыворотки;
5. в перитонеальном экссудате определяли число макрофагов, экспрессирующих Fcγ – рецепторы (Kang J., Brooks L., Jarway J., 1977) С3В –рецепторы (И.С.Фрейдлин, 1984);
6. в макрофагах перитонеального экссудата определяли число лизосом по суммарному показателю люминесценции – СПЛ% (И.С. Фрейдлин, 1984);
7. естественную цитотоксичность клеток селезенки, тимуса, перитонеального экссудата (киллинг-эффект) определялся спектрофотометрическим методом (Зимин Ю.А., Чуканов С.В., Каганов Б.С., 1983) в нашей модификации (А.С.Саратиков, Т.П. Новожеева, Г.В. Потапова и соавт., 1987);
8. подсчет числа кариоцитов в гомогенатах селезенки, тимуса, перитонеальном экссудате проводили в камере Горяева по методике подсчета лейкоцитов крови;
9. фагоцитарную активность нейтрофилов крови определяли с культурой Staph aureus – 209 (Д.К. Новиков, В.И. Новикова, 1979) вычисляя число активных нейтрофилов (АН), поглотительную активность нейтрофилов (ПС), завершенность фагоцитоза (ЗФ);

Изучение вышеперечисленных показателей было обусловлено необходимостью решить следующие задачи:

1. исключить стрессирующее воздействие излучаемого физического воздействия на организм;
2. определить возможное воздействие излучения прибора “Дюна-Т” на В-клеточное звено иммунитета;
3. охарактеризовать состояние рецепторного аппарата макрофагов, что даст возможность судить о способности иммунокомпетентных клеток распознавать в организме антиген и вступать в кооперативные взаимодействия с прочими клетками иммунной системы в процессе иммунного ответа, который может быть усилен или ослаблен физическим воздействием.
4. охарактеризовать изменение показателей фагоцитарной активности макро- и микрофагов под влиянием физического воздействия, что может сказаться на возможности последних принимать участие в фагоцитозе бактериальных агентов и принимать участие в элиминации иммунных комплексов.

Полученные экспериментальные данные обработаны непараметрическим методом статистики по критерию Манна-Уитни для двух независимых выборок (Поллард Дж., 1982).

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе клеточного состава периферической крови животных следует отметить, что после десятикратного воздействия на организм излучения светодиодного аппарата “Дюна-Т” статистически значимых различий в абсолютном содержании основных клеточных форм не выявлено при сравнительной оценке показателей контрольной и опытной групп животных (Таблица 2). Отсюда следует, что многократное применение этой физиопроцедуры в эффективной дозе не оказывает стрессирующего воздействия на организм, что может свидетельствовать о сбалансированности адаптационных реакций в последнем.

Показателем стрессирующего влияния на организм физических воздействий может служить снижение клеточности лимфоидных органов, в частности, снижение числа ядродержащих клеток в тимусе. При анализе клеточного состава лимфоидных органов опытных животных можно отметить, что после воздействия излучения аппарата “Дюна-Т” у экспериментальных животных не отмечено снижения клеточности селезенки и тимуса. В вилочковой железе наблюдается даже тенденция к увеличению числа кариоцитов. Однако, у всех экспериментальных животных отмечено

значительное снижение числа ядросодержащих клеток в перитонеальном экссудате (Таблица 3). Этот факт можно толковать, как следствие угнетения скорости миграции иммунокомпетентных клеток. Вряд ли это явление следует расценивать как отрицательное. В организме опытных животных, которые подвергались только лишь воздействию излучения прибора “Дюна-Т”, нет явных патологических очагов, куда могли бы мигрировать активные иммунокомпетентные клетки. Потому можно считать, что эти клеточные элементы остаются в иммунокомпетентных органах и тканях, где протекают естественные защитные реакции, связанные с ежедневным попаданием в организм чужеродных агентов (антигенов и ксенобиотиков).

Высказанное выше предположение подтверждается и тем, что у опытных животных в крови снижается число В-лимфоцитов (Таблица 4) – предшественников антителообразующих клеток. При определении этих клеток в селезенке опытных животных отмечено их незначительное увеличение. Как следствие активности антителообразующих клеток, в крови опытных животных отмечено незначительное увеличение титра нормальных гетероагглютининов (АТ) по сравнению с контролем. Исходя из изложенного выше, можно предполагать, что в присутствии антигенного стимула положительное влияние светодиодной терапии на В-клеточное (гуморальное) звено иммунитета проявит себя в более мощном синтезе специфических антител.

Изучение функционального состояния клеточных элементов лимфоидных органов и тканей опытных животных позволило сделать ряд интересных заключений. При анализе феномена естественной цитотоксичности иммунокомпетентных клеток лимфоидных органов следует отметить увеличение этого показателя среди клеток селезенки, тимуса и перитонеального экссудата (Таблица 5). С феноменом естественной цитотоксичности (киллинг-эффектом) связывают противоопухолевую и противовирусную защиту. В связи с этим, полученные в эксперименте результаты дают возможность предполагать, что использование светодиодной терапии в эффективной дозировке может дать положительный результат при терапии в случаях опухолевых и вирусных заболеваний.

Интересна реакция фагоцитирующих клеток у экспериментальных животных в ответ на многократное воздействие излучения прибора для светодиодной терапии “Дюна-Т”. Необходимо отметить, что в периферической крови опытных животных незначительно снижается абсолютное количество моноцитов – предшественников макрофагов. Как упоминалось раньше, в перитонеальном экссудате опытных животных на фоне воздействия испытуемого раздражителя, снижается число дросодержащих клеток, в том числе и макрофагов, экспрессирующих C_{3b} -рецепторы. Незначительно снижается здесь же и число макрофагов, экспрессирующих $Fc\gamma$ -рецепторы. Если допустить, что абсолютное количество ядросодержащих клеток в перитонеальном экссудате опытных животных снижается за счет миграции их в иммунокомпетентные органы (тимус, селезенку, лимфоузлы, Пейеровы бляшки и т.д.), то можно считать, что в эти же органы мигрируют и макрофаги, несущие C_{3b} -рецепторы. Этим можно объяснить увеличение индекса цитотоксичности (ИЦТ) клеток лимфоидных органов, т.к. макрофагам свойственен этот феномен, помимо прочих функций, в том числе и функции фагоцитоза. Но это предположение можно проверить, изучив цитологический состав лимфоидных органов опытных и контрольных животных.

Необходимо отметить, что в макрофагах перитонеального экссудата у опытной группы животных на фоне эксперимента найдено снижение количества лизосом в клетках – весьма важной структурной единицы внутриклеточных образований, с которыми связана фагоцитарная активность. Подобное явление, скорее всего, можно объяснить тем, что среди клеток перитонеального экссудата на фоне эксперимента остаются макрофаги, экспрессирующие $Fc\gamma$ -рецепторы. Макрофаги, экспрессирующие C_{3b} -рецепторы покидают перитонеальную жидкость, мигрируя в лимфоидные органы. Именно через эти рецепторы опосредуется иммунная адгезия, иммунный фагоцитоз, а также усиление секреции лизосомных гидролиз. Данные по изучению влияния излучения аппарата “Дюна-Т” на состояние рецепторного аппарата и содержания лизосом в макрофагах приведены в Таблице 6.

В периферической крови опытных животных на фоне многократного воздействия излучения прибора “Дюна-Т” отмечено увеличение числа активных нейтрофилов, при этом общее число нейтрофилов в крови практически не меняется (Таблица 6). Увеличивается также и поглотительная активность нейтрофилов. Что касается фазы завершенности нейтрофильного фагоцитоза, то можно говорить о тенденции к увеличению этого показателя в крови опытных животных по сравнению с контролем. Таким образом, судя по данным изложенным выше, воздействие на организм излучения прибора для светодиодной терапии “Дюна-Т” приводит к стимуляции нейтрофильного фагоцитоза и возможному перераспределению в организме макрофагальных элементов.

Механизм действия излучения аппарата для светодиодной терапии на функциональное состояние иммунной системы может быть уточнен при применении последнего на фоне развития различных патологических процессов в эксперименте (иммунизация, опухолевый рост, адьювантный артрит и т.д.)

ВЫВОДЫ:

1. Курсовое применение аппарата для светодиодной терапии в эффективной дозе на интактных животных судя по реакции иммунной системы не вызывает стрессового воздействия на организм.
2. Курсовое применение аппарат для светодиодной терапии в эффективной дозе умеренно стимулирует гуморальное звено естественного иммунитета.
3. Курсовое применение аппарат для светодиодной терапии в эффективной дозе стимулирует естественные эффекторные клеточные элементы: клетки-киллеры, нейтрофильные фагоциты.

Изменение соотношения лимфоцит/нейтрофил
в крови опытных животных
под влиянием излучения аппарата для фототерапии "Дюна-Т"
в зависимости от длительности воздействия.

№ п/п	Показатели	До воздействия n=10	К	После воздействия 1 мин	К
1	Лейкоциты * 10 ⁹	7,9 ± 1,9	1,5 ± 0,4	7,8 ± 1,3	1,9 ± 0,4 p > 0,05
2	Лимфоциты * 10 ⁹	4,0 ± 0,9		4,4 ± 0,7	
3	Нейтрофилы * 10 ⁹	2,9 ± 0,8		2,3 ± 0,4	
		До воздействия n=10		После воздействия 5 мин	
1	Лейкоциты * 10 ⁹	7,5 ± 1,7	1,5 ± 0,3	8,4 ± 1,8	1,5 ± 0,3 p > 0,05
2	Лимфоциты * 10 ⁹	4,4 ± 1,0		4,8 ± 1,2	
3	Нейтрофилы * 10 ⁹	2,8 ± 0,5		3,1 ± 0,4	
		До воздействия n=10		После воздействия 10 мин	
1	Лейкоциты * 10 ⁹	6,3 ± 1,2	1,1 ± 0,2	5,6 ± 1,6	2,2 ± 0,2 ** p < 0,05
2	Лимфоциты * 10 ⁹	3,2 ± 0,5		3,6 ± 0,6	
3	Нейтрофилы * 10 ⁹	2,9 ± 0,7		1,6 ± 0,4	

Таблица 2.

Влияние излучения прибора для светотерапии "Дюна-Т" на клеточный состав периферической крови опытных животных.

№ п/п	Показатели	Контрольные животные n=10	Опытные животные n=10
1	Лейкоциты * 10 ⁹	3,0 ± 1,6	3,3 ± 0,9 p > 0,05
2	Нейтрофилы * 10 ⁹	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,05 p > 0,05
3	Моноциты * 10 ⁹	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,05 p > 0,05
4	Лимфоциты * 10 ⁹	1,4 ± 0,4	1,6 ± 0,5 p > 0,05

Таблица 3.

Влияние излучения прибора для светотерапии "Дюна-Т" на клеточность иммунокомпетентных органов и тканей опытных животных

№ п/п	Показатели	Контрольные животные n=10	Опытные животные n=10
1	Клеточность селезенки * 10 ⁶	170,3 ± 25,6	159,3 ± 26,4 p > 0,05
2	Клеточность тимуса * 10 ⁶	122,3 ± 24,3	166,2 ± 44,9 p > 0,05
3	Клеточность перитонеального экссудата * 10 ⁶	18,1 ± 4,2	13,7 ± 2,5 ** p < 0,05

** Знак статистически достоверной разницы с контролем.

Таблица 4.

Влияние излучения прибора для светотерапии "Дюна-Т"
на показатели гуморального иммунитета опытных животных.

№ п/п	Показатели	Контрольные животные n=10	Опытные животные n=10
1	В-лимфоциты крови, %	$7,6 \pm 3,7$	$2,6 \pm 1,6^{**}$ $p < 0,05$
2	АОК селезенки, %	$7,1 \pm 1,5$	$8,7 \pm 0,9$ $p > 0,05$
3	Нормальные АТ Т-I/Ig2	$2,4 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,4^{**}$ $p > 0,05$

АОК –антителообразующие клетки

АТ – антитела

** Знак статистически достоверной разницы с контролем.

Таблица 5.

Влияние излучения прибора для светотерапии "Дюна-Т"
на естественную цитотоксичность клеток
лимфоидных органов опытных животных

№ п/п	Показатели	Контрольные животные n=10	Опытные животные n=10
1	ИЦТ клеток селезенки, %	$9,1 \pm 6,0$	$11,0 \pm 2,6$ $p > 0,05$
2	ИЦТ клеток тимуса, %	$0,78 \pm 0,1$	$6,3 \pm 2,0^{**}$ $p < 0,05$
3	ИЦТ клеток перитонеального экссудата, %	$4,9 \pm 2,3$	$12,4 \pm 2,5^{**}$ $p < 0,05$

ИЦТ – индекс цитотоксичности

** Знак статистически достоверной разницы с контролем.

Влияние излучения прибора для светотерапии "Дюна-Т"
на активность фагоцитирующих клеток органов опытных животных

№ п/п	Показатели	Контрольные животные n=10	Опытные животные n=10
1	Моноциты крови * 10 ⁹	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,05 p > 0,05
2	Макрофаги, эксп. С _{3в} -рецепторы, %	70,4 ± 12,0	18,6 ± 4,9** p < 0,05
3	Макрофаги, эксп. Fcγ –рецепторы, %	54,6 ± 7,9	49,9 ± 7,2 p > 0,05
4	Лизосомы макрофагов (СПЛ, %)	54,6 ± 10,8	38,5 ± 6,3** p = 0,05
5	Нейтрофилы крови * 10 ⁹	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,3 p > 0,05
6	Активн.нейтрофилы, %	16,7 ± 6,6	25,1 ± 5,0** p < 0,05
7	Поглот.активн.нейтрофилов	3,2 ± 1,5	6,1 ± 2,9** p < 0,05
8	Завершенность фагоцитоза, %	30,1 ± 5,7	38,0 ± 5,0 p 0,05

СПЛ – суммарный показатель люминисценци

** Знак статистически значимой разницы с контролем.