

А.В. БУРАВСКИЙ<sup>1</sup>, Е.В. БАРАНОВ<sup>1</sup>, С.И. ТРЕТЬЯК<sup>1</sup>, З.Б. КВАЧЕВА<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ МОНОХРОМАТИЧЕСКОГО ПОЛЯРИЗОВАННОГО СВЕТОДИОДНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»<sup>1</sup>,  
ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»<sup>2</sup>,  
Республика Беларусь

**Цель.** Определить физические параметры поляризованного светодиодного излучения (ПСИ), которые обеспечивают стимуляцию пролиферативной активности (ПА) фибробластов кожи человека в культуре.

**Материал и методы.** В контрольной группе культивированные фибробласты кожи человека (ФКЧ) не облучали. В 16 опытных группах на монослойные культуры клеток действовали монохроматическим ПСИ, раздельно или последовательно используя длины волн  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм и  $\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$  мкм. Учет результатов – митотической активности (МА) и ПА – проводили через 24-48 часов после облучения; морфологию культур клеток оценивали прижизненно с использованием фазово-контрастной микроскопии.

**Результаты.** Наиболее выраженная стимуляция МА отмечалась в культурах опытных групп, подвергшихся воздействию ПСИ с  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм при плотности энергии облучения (ПЭО) 10 Дж/см<sup>2</sup> и 15 Дж/см<sup>2</sup>: митотический индекс через 24 часа после облучения составил 29,7±3,10% и 63,0±4,44% соответственно, что было достоверно больше, чем в контроле. В результате оценки морфологии и накопления клеток в этих группах через 48 часов после облучения было выявлено увеличение плотности насыщения клеток в монослой за счет прироста их количества в 1,6 раза при ПЭО 10 Дж/см<sup>2</sup> и в 2,0 раза при ПЭО 15 Дж/см<sup>2</sup>, что свидетельствует о повышении ПА культивируемых ФКЧ при указанных параметрах фото-воздействия. В других опытных группах было отмечено статистически достоверное уменьшение МА по отношению к группе контроля либо отсутствие различий.

**Заключение.** Проведенное исследование подтвердило возможность фоторегуляторного стимулирующего действия монохроматического ПСИ на пролиферацию ФКЧ в культуре при определенных параметрах облучения.

*Ключевые слова:* фибробласты кожи человека, монослойные культуры клеток, морфология культур клеток, фазово-контрастная микроскопия, митотическая активность, поляризованное светодиодное излучение, пролиферативная активность

**Objectives.** To determine the physical parameters of a polarized light-emitting diode radiation (PLEDR) providing the stimulation of the proliferative activity (PA) of the human dermal fibroblast proliferation (HSF) in the cell culture.

**Methods.** Cultivated human dermal fibroblasts had not been radiated in the control group. Monolayer cell cultures in 16 experimental groups were radiated with monochromatic PLEDR, separately or sequentially using wavelengths  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$   $\mu\text{m}$  и  $\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$   $\mu\text{m}$ . The study of the mitotic and proliferative activity was carried out in 24-48 hours after the exposure; the morphology of the cells had been evaluated intravitaly under a phase-contrast microscopy.

**Results.** The most pronounced stimulation of mitotic activity (MA) was observed in the experimental groups after PLEDR with the wavelength of  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$   $\mu\text{m}$  at radiant energy density (RED) 10 J/cm<sup>2</sup> and 15 J/cm<sup>2</sup>: the mitotic index 24 hours after radiation was 29,7±3,10% and 63,0±4,44%, respectively, being reliably higher than in control. In 48 hours after radiation the evaluation of morphological changes and accumulation of cells in these groups had been revealed the “saturation cell density” increase in the monolayer due to their number growth at 1.6 folds in RED 10 J/cm<sup>2</sup> and at 2.0 folds in RED 15 J/cm<sup>2</sup> justifying increasing of proliferative activity (PA) cultured fibroblasts under the indicated photo-radiation parameters. In other experimental groups statistically significant reduction of MA or lack of difference towards the control group were observed.

**Conclusion.** The conducted research has confirmed the monochromatic PLEDR possibility to stimulate HSF proliferation in culture under the specific exposure parameters.

*Keywords:* human skin fibroblasts, monolayer cell culture, the morphology of the cell cultures, phase contrast microscopy, mitotic activity, polarized light-emitting diode radiation, proliferative activity

Novosti Khirurgii. 2015 May-Jun; Vol 23 (3): 247-255

**Influence of Monochromatic Polarised Light-Emitting Diode Radiation on the Proliferation of Cultivated Human Dermal Fibroblasts**

A.V. Buravsky, E.V. Baranov, S.I. Tretyak, Z.B. Kvacheva

### Введение

Проблема лечения пациентов с раневыми дефектами кожи и мягких тканей различного

гене́за не теряет своей актуальности. Современные принципы лечения этой патологии предусматривают комплексный подход, включающий не только устранение этиопатогене-

тических факторов (адекватную хирургическую обработку и санацию, коррекцию гемодинамических нарушений, аутодермопластику и т.д.), но и системную терапию по показаниям (антимикробные препараты, нормализация гликемии и обменных процессов, улучшение микроциркуляции и реологических свойств крови и т.д.), а также полноценное местное лечение [1, 2].

Наибольшие трудности в клинической практике возникают при лечении пациентов с обширными и хроническими ранами, особенно при наличии суб- и декомпенсированной фоновой и сопутствующей патологии. Это связано как с системными нарушениями обменных процессов, так и с низким раневым репаративным потенциалом. Поэтому в ряде случаев указанные выше хирургические методы лечения в комплексе с системной терапией либо не обеспечивают быстрой реконвалесценции пациентов, либо вообще не гарантируют полное заживление раневого дефекта. В таких ситуациях не вызывает сомнения необходимость дополнения лечения методами, направленными на стимуляцию развития и созревания грануляционной ткани, а также эпителизации раны [3, 4].

Согласно современным представлениям, одна из ключевых ролей в течении раневого процесса и регенерации раневых дефектов кожи и мягких тканей принадлежит фибробластам. Состояние и функция основных внеклеточных компонентов соединительной ткани, в том числе коллагеновых, эластических, ретикулярных волокон и межклеточного матрикса зависят от функциональной активности фибробластов. Фибробласты кожи синтезируют и выделяют в окружающую среду большое количество биологически активных веществ: эпидермальный фактор роста (EGF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста кератиноцитов (KGF), компоненты внеклеточного матрикса — гликозаминогликаны (ГАГ), гиалуроновую кислоту (ГК), хондроитинсульфат, цитокины, ферменты и др. Эти клетки играют значительную роль во взаимодействии эпителия и соединительной ткани, а также стимулируют неоваскуляризацию и лимфоангиогенез [5, 6].

Таким образом, важнейшие функции в раневом процессе и регенерации кожи и мягких тканей позволяют рассматривать дермальные фибробласты в качестве точки приложения для изучения воздействия и влияния различных факторов, потенциально способных стимулировать репарацию повреждений.

В настоящее время для стимуляции реге-

нерации широко используются методы, основанные на действии физических факторов, в том числе и фототерапия. Вектор исследований направлен на изучение особенностей репарации повреждений, поиск способов активации раневого процесса и ускорения смены его фаз [1, 3, 7]. В современной литературе приведено много информации об использовании различных вариантов излучения видимого и ближнего инфракрасного спектральных диапазонов для улучшения условий заживления раневых дефектов [8, 9, 10]. Помимо низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), исследователи все чаще обращают внимание на применение для стимуляции раневых репаративных процессов некогерентного света, одним из вариантов которого является монохроматическое поляризованное светодиодное излучение (ПСИ). Это обусловлено появлением светодиодных излучателей высокой мощности и отсутствием существенных различий в биологических эффектах, индуцируемых НИЛИ и ПСИ [8, 11, 12]. Однако, несмотря на отдельные совпадения взглядов и подходов (например, важность поляризации света), в публикациях разных авторов часто фигурируют противоречивые сведения, особенно в отношении параметров и режимов воздействия.

Анализ приведенных выше данных диктует необходимость проведения дальнейших исследований, направленных на оценку влияния излучения с различными физическими характеристиками на тканевую и клеточную репарацию. Основными параметрами, инициирующими фотобиологические эффекты и требующими изучения, представляются длина волны и поляризация, а также плотность энергии облучения (ПЭО), которая является производной от плотности мощности и длительности действия излучения. Можно предположить, что низкие дозы световой энергии не оказывают существенного влияния на пролиферативную активность (ПА) клеточных элементов, а высокоэнергетичное воздействие, напротив, способно вызывать гибель клеток [13, 14]. В то же время гипотетически существует «терапевтическое окно» — такой диапазон ПЭО, в пределах которого возможно усиление пролиферативной и митотической активности (МА) клеток, ответственных за тканевую регенерацию.

**Цель** исследования: определить физические параметры монохроматического поляризованного светодиодного излучения (длина волны, плотность энергии облучения), которые обеспечивают стимуляцию пролиферативной активности фибробластов кожи человека в культуре.

## Материал и методы

### Условия культивирования фибробластов кожи человека

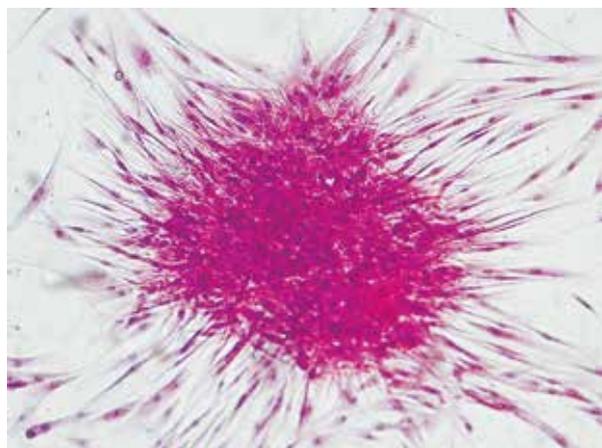
Культуру дермальных фибробластов готовили по методике, основой которой являлся модифицированный метод эксплантов [5].

Эксплантация кожного лоскута размерами не более 2,0×0,5 см (для последующего получения клеточной культуры) выполнялась в асептических условиях из области операционной раны передней брюшной стенки с информированного согласия пациента во время проведения планового хирургического вмешательства. Далее полученный эксплант кожи измельчали до фрагментов 0,2-0,3 см, которые помещали в стерильные пластиковые чашки Петри (Greiner), вносили ростовую среду (DMEM с добавлением 10% сыворотки плодов коров (HyClone), содержащую антибиотик — гентамицин в концентрации 100 мкг/мл), инкубировали в термостате с 5% содержанием CO<sub>2</sub> при температуре +37°C. Замену среды производили через каждые 3 дня. Очаговый рост клеток по периметру кожных фрагментов наблюдался в среднем на 10-12 сутки (рис. 1).

Полноценный монослой фибробластоподобных клеток формировался вокруг эксплантов через 14 – 20 суток. На этом этапе проводили пересев фибробластов в новые флаконы (субкультивирование). Для перевода клеток в суспензию монослой обрабатывали 0,25% раствором трипсина с 0,025% раствором Версена (в соотношении 1:3) по общепринятой методике. Для посева культуры применяли суспензию с концентрацией клеток 150 тыс./мл.

В экспериментах использовали культуры 3-4-го пассажей в логарифмической фазе ро-

**Рис. 1. Очаговый рост фибробластов по периметру фрагмента кожи. Окраска гематоксилин и эозин, Ув. ×200.**



ста (через двое суток роста *in vitro* после посева), выращенные на покровных стеклах на дне стеклянных флаконов (площадь стекла соответствовала дну флакона). Перед постановкой эксперимента (облучением) производили замену ростовой среды на поддерживающую среду (питательная среда с 2% содержанием сыворотки).

### Условия облучения клеток (режимы) и схема постановки эксперимента

В качестве источника монохроматического ПСИ с длинами волн  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм и  $\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$  мкм в эксперименте использовали комплекс фототерапевтический «Ромашка» (КФТ), работающий на базе светодиодных излучателей высокой мощности (ГНУ «Институт физики им. Б.И. Степанова» НАН РБ, НПК «Люзар», Беларусь). Конструктивные характеристики аппарата позволяют выбирать необходимую номинальную плотность мощности излучения (мВт/см<sup>2</sup>), а также устанавливать длительность облучения (в минутах, секундах) [15].

Эксперимент был разделен на 17 групп исследований – 16 опытных и контрольную. В контрольной группе культивированные фибробласты кожи человека (ФКЧ) не облучали.

В опытных группах во всех сериях исследований фотовоздействие проводили монохроматическим ПСИ с фиксированной номинальной плотностью мощности 200 мВт/см<sup>2</sup>.

В 7-ми опытных группах использовали излучение с длиной волны  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм, в других 7-ми группах – с длиной волны  $\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$  мкм, и еще в 2-х группах культуры клеток облучали поочередно обеими длинами волн в разной последовательности.

На монослойные культуры клеток действовали светодиодным излучением (через среду) в непрерывном режиме; длительность облучения составляла от 33 секунд до 990 секунд при использовании  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм, и от 28 секунд до 825 секунд с длиной волны  $\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$  мкм. Выбор определенной продолжительности фотовоздействия в каждой группе обеспечивал достижение расчетных величин ПЭО, Дж/см<sup>2</sup> (таблица 1).

В каждой экспериментальной группе использовали не менее 2-х флаконов с культурой, при этом выполняли 3-кратную постановку опыта в идентичных условиях. Культуры ФКЧ опытных групп (после фотовоздействия), а также контрольные культуры фибробластов помещали в термостат при температуре +37°C.

Таблица 1

| Структура эксперимента      |   | Плотность энергии облучения в группах, Дж/см <sup>2</sup>   |   |   |   |    |    |    |
|-----------------------------|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Группы культур фибробластов | Условия воздействия   | 0   |   |   |   |    |    |    |
| Контроль                    | Без облучения   |   |   |   |   |    |    |    |
| Опытные                     | Облучение<br>$\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$<br>мкм                       | 1   | 3 | 5 | 10  | 15 | 20 | 30 |
|                             | Облучение<br>$\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$<br>мкм                      | 1   | 3 | 5 | 10  | 15 | 20 | 30 |
|                             | Облучение<br>$\lambda_1$ и $\lambda_2$ в разной<br>последовательности | Сначала $\lambda_2$ с ПЭО<br>5 Дж/см <sup>2</sup> , затем $\lambda_1$<br>с ПЭО 5 Дж/см <sup>2</sup> |   |   | Сначала $\lambda_1$ с ПЭО 5<br>Дж/см <sup>2</sup> , затем $\lambda_2$<br>с ПЭО 5 Дж/см <sup>2</sup> |    |    |    |

Примечание: при вычислении плотности энергии учитывали зависимость плотности мощности монохроматического ПСИ от расстояния между источником излучения КФТ и покровным стеклом с монослоем ФКЧ

### Методы учета и анализа результатов

Учет результатов проводили через 24-48 часов после облучения. Морфологию культур клеток оценивали прижизненно с использованием фазово-контрастной микроскопии (Nicon TS-100, Japan,  $\times 100$ ,  $\times 200$ ,  $\times 400$ ).

Для определения МА через 24 часа покровные стекла с монослойными культурами клеток (контрольные и опытные) извлекали из флаконов, фиксировали в 96% спирте, окрашивали гематоксилином и эозином. Далее готовили постоянные препараты клеток: обезвоживали в спиртах повышающейся концентрации, затем просветляли в ксилоле и заключали в бальзам на предметных стеклах.

Митотическую активность определяли по количеству делящихся клеток (суммарно всех фаз деления), приходящихся на 1000 просчитанных в полях зрения микроскопа, и выражали в промилле (‰). В каждой из групп (контрольной и опытных) учитывали не менее 3000 клеток. Анализ и запись изображений культур фибробластов проводили с использованием инвертированного микроскопа (фазовый контраст) Nicon TS-100 (Japan), совмещенного с компьютером. Использовали увеличение в 200-400 крат. Пролиферативную активность фибробластов в группах оценивали по скорости деления ФКЧ (т.е. по МА через 24 часа после облучения), а также по приросту количества клеток в монослое через 48 часов после облучения.

Статистическая обработка результатов исследования была выполнена с использованием метода описательной статистики, оценка достоверности разности сравниваемых интенсивных показателей осуществлялась по критерию Стьюдента. Выявление зависимости доза-эффект выполняли методом корреляционного анализа Пирсона. Выравнивание ряда осуществляли методом математического прогнозирования с построением полиномиального тренда. Данные представлены в виде  $M \pm m$ . Достоверным считали результат при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты

Контрольная культура ФКЧ 3-4 пассажа на 3-и сутки после пересева (то есть через 24 часа после облучения монослойных культур фибробластов опытных групп – срок учета результатов эксперимента) была представлена морфологически однородной популяцией веретеневидных клеток с длинными отростками (рис. 2А). Митотическая активность ФКЧ контрольной группы в эти сроки составила  $11,2 \pm 1,91\%$ .

Сравнительное изучение результатов эксперимента в опытных группах показало разные уровни МА клеток после фотовоздействия. При использовании воздействия ПСИ с длиной волны  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм и расчетными значениями ПЭО 1 Дж/см<sup>2</sup>, 3 Дж/см<sup>2</sup> и 5 Дж/см<sup>2</sup> не было выявлено статистически достоверных различий уровней МА в культурах ФКЧ по сравнению с сериями контрольной группы, а также выраженных морфологических изменений (таблица 2).

Наиболее выраженная стимуляция МА отмечалась в опытных культурах, подвергшихся воздействию ПСИ с  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм при плотностях энергии облучения 10 Дж/см<sup>2</sup> и 15 Дж/см<sup>2</sup>: митотический индекс через 24 часа после облучения составил  $29,7 \pm 3,10\%$  и  $63,0 \pm 4,44\%$  соответственно, что было достоверно больше, чем в контроле (таблица 2, рис. 2Б). В результате оценки морфологии и накопления клеток в культурах этих опытных групп через 48 часов после облучения было выявлено увеличение плотности насыщения клеток в монослое за счет прироста их количества в 1,6 раза при ПЭО 10 Дж/см<sup>2</sup> и в 2,0 раза при ПЭО 15 Дж/см<sup>2</sup> по сравнению с контрольной культурой. Полученные результаты свидетельствуют о повышении пролиферативной активности культивируемых ФКЧ после фотовоздействия ПСИ с длиной волны  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм при достижении плотности энергии облучения 10

Уровни МА фибробластов после воздействия ПСИ с длиной волны  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм при разных расчетных значениях ПЭО

| Плотность энергии облучения в группах, Дж/см <sup>2</sup> | Митотическая активность (%) в группах, $M\pm m$ | Достоверность различий (по отношению к контролю) |
|---|---|--|
| Контроль (0)  | 11,2±1,91                                       | —  |
| 1   | 12,3±2,02                                       | *  |
| 3   | 13,3±2,09                                       | *  |
| 5   | 15,0±2,22                                       | *  |
| 10  | 29,7±3,10                                       | p<0,01   |
| 15  | 63,0±4,44                                       | p<0,001  |
| 20  | 10,7±1,88                                       | *  |
| 30  | 6,3±1,45  | p<0,05   |

Примечание: \* — отсутствие различий (p>0,05)

и 15 Дж/см<sup>2</sup>. При облучении клеточных культур монохроматическим ПСИ с ПЭО 20 Дж/см<sup>2</sup> и той же длиной волны статистически достоверного угнетения МА в сравнении с группой контроля зафиксировано не было (таблица 2). Однако имели место морфологические изменения в культурах ФКЧ, которые выражались в снижении плотности насыщения клеток и нарушении архитектоники монослоя,

а также изменении морфологии самих клеток — деформации, округления контуров и укорочении отростков (рис. 2В).

В опытной группе с ПЭО 30 Дж/см<sup>2</sup> и  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм наблюдался значительный цитотоксический эффект, который характеризовался полной дезорганизацией монослоя, округлением и деструкцией клеток, фрагментацией и разрушением ядер (рис. 2Г).

Рис. 2. Морфология клеток в культуре ФКЧ. Окраска гематоксилином и эозином, Ув. ×400.

А — 4 пассаж, 3-и сутки роста *in vitro* (контроль); Б — через 24 часа после воздействия ПСИ с  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм и ПЭО 10 Дж/см<sup>2</sup>; В — через 24 часа после воздействия ПСИ с  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм и ПЭО 20 Дж/см<sup>2</sup>; Г — через 24 часа после воздействия ПСИ с  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм и ПЭО 30 Дж/см<sup>2</sup>

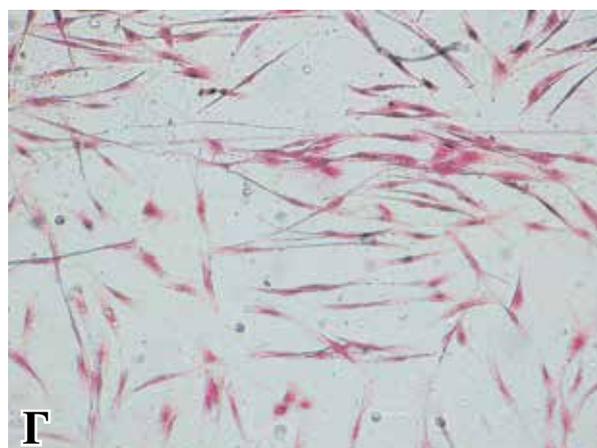
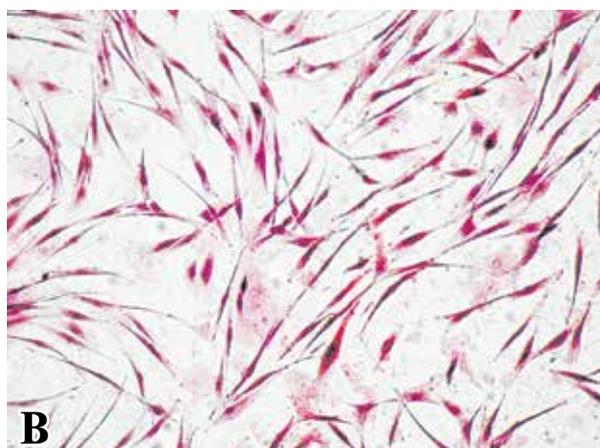
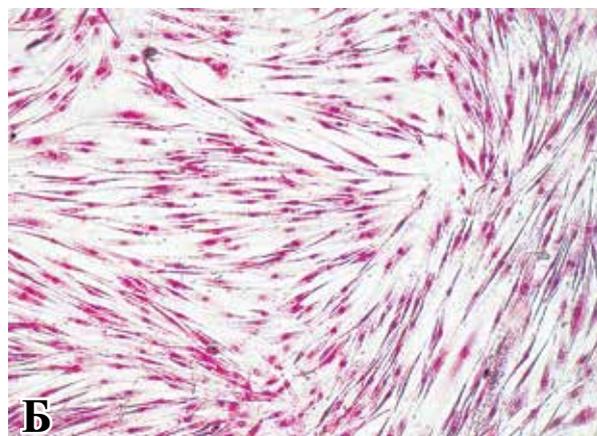
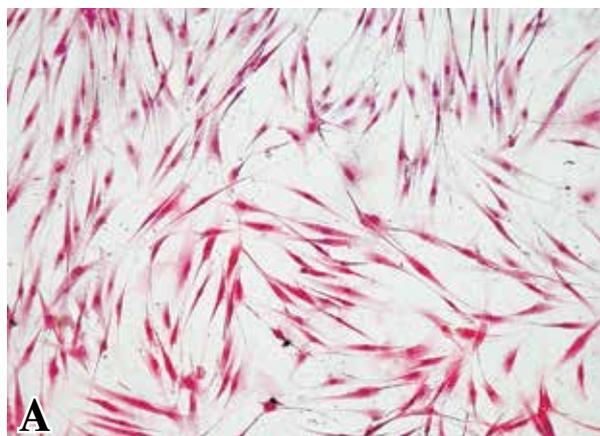
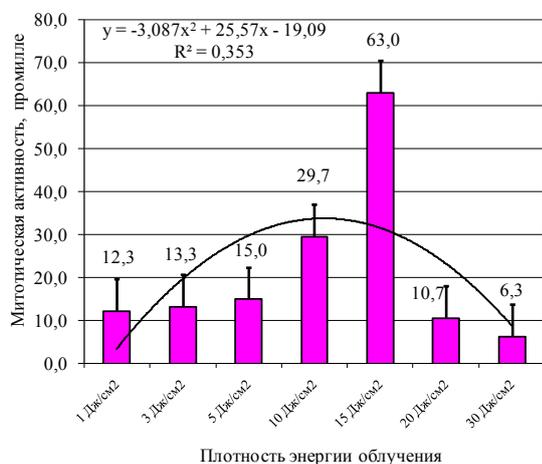


Таблица 3

**Зависимость митотической активности фибробластов кожи человека от плотности энергии фотовоздействия**

| Интервал ПЭО, Дж/см <sup>2</sup> | Динамика МА в группах (М), | Корреляция       |
|----------------------------------|----------------------------|------------------|
| 1-15                             | 12,3-63,0                  | r=0,948; p<0,01  |
| 15-30                            | 63,0-6,3                   | r=-0,799; p<0,05 |



**Рис. 3. Профиль митотической активности культивированных ФКЧ в экспериментальных группах при использовании ПСИ с  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм, %**

Анализ результатов исследования выявил статистически достоверное наличие сильной прямой корреляционной связи между интенсивностью фотовоздействия ПСИ с  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм и уровнем митотической активности ФКЧ в диапазоне плотностей энергии облучения 1 – 15 Дж/см<sup>2</sup>, а также сильной обратной корреляционной связи в диапазоне ПЭО 15 – 30 Дж/см<sup>2</sup> (таблица 3).

Таким образом, результаты проведенных исследований показали разнонаправленное влияние монохроматического поляризованного светодиодного излучения с  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм на митотическую активность культивированных фибробластов кожи человека в зависимости от плотности энергии облучения (рис. 3). Полученная при статистическом анализе линия тренда оказалась сопоставимой с кривыми

«доза – эффект» для действия различных физических факторов на биологические системы.

При использовании в эксперименте монохроматического поляризованного светодиодного излучения с длиной волны  $\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$  мкм в диапазоне ПЭО 1 – 20 Дж/см<sup>2</sup> не было выявлено статистически достоверного увеличения митотической активности клеток в культурах ФКЧ по сравнению с МА контрольной группы. В результате фотовоздействия ПСИ с данной длиной волны при плотности энергии облучения 30 Дж/см<sup>2</sup> было зафиксировано статистически достоверное уменьшение МА в сравнении с группой контроля (таблица 4).

Анализ данных, полученных в опытных группах при сочетанном использовании обеих длин волн ПСИ –  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм и  $\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$  мкм – в разной последовательности, не показал статистически достоверных изменений митотического индекса в культурах ФКЧ по сравнению с группой контроля (таблица 5).

### Обсуждение

В основе методики локальной фототерапевтической терапии (ФРТ) лежит эффект регулирующего действия низкоинтенсивного поляризованного излучения ближнего ультрафиолетового, а также видимого и ближнего инфракрасного спектральных диапазонов на функциональную активность клеток и тканей (биосинтетическую активность, МА, активность процессов репарации повреждений генетического аппарата, активность иммуно-

Таблица 4

**Уровни МА фибробластов после воздействия ПСИ с длиной волны  $\lambda_1=(0,405\pm 0,015)$  мкм при разных расчетных значениях ПЭО**

| Плотность энергии облучения в группах, Дж/см <sup>2</sup> | Митотическая активность (%) в группах, М±m | Достоверность различий (по отношению к контролю) |
|---|--|--|
| Контроль (0)  | 11,2±1,91                                  | —  |
| 1   | 9,7±1,79                                   | *  |
| 3   | 8,7±1,69                                   | *  |
| 5   | 11,7±1,96                                  | *  |
| 10  | 14,3±2,17                                  | *  |
| 15  | 11,7±1,96                                  | *  |
| 20  | 9,7±1,79                                   | *  |
| 30  | 5,0±1,29                                   | p<0,05   |

Примечание: \* – отсутствие различий (p>0,05)

**Уровни МА фибробластов после сочетанного воздействия  
ПСИ длинами волн  $\lambda_1=(0,630\pm0,03)$  мкм и  $\lambda_2=(0,405\pm0,015)$  мкм**

| Плотность энергии облучения в группах, Дж/см <sup>2</sup>                                     | Митотическая активность (%) в группах, М±m | Достоверность различий (по отношению к контролю) |
|---|--|--|
| Контроль (0)  | 11,2±1,91                                  | —  |
| Сначала $\lambda_2$ с ПЭО 5 Дж/см <sup>2</sup> , затем $\lambda_1$ с ПЭО 5 Дж/см <sup>2</sup> | 10,0±1,82                                  | *  |
| Сначала $\lambda_1$ с ПЭО 5 Дж/см <sup>2</sup> , затем $\lambda_2$ с ПЭО 5 Дж/см <sup>2</sup> | 13,0±2,07                                  | *  |

Примечание: \* — отсутствие различий (p>0,05)

компонентных клеток) [3, 9, 10, 11].

В СССР первые исследования биостимулирующего действия первоначально некогерентного поляризованного излучения красной области спектра, а впоследствии низкоинтенсивного лазерного излучения красной области спектра (гелий-неоновый лазер) были изложены в работах В.М. Инюшина (1965) и Д.Л. Корытного (1967). Полученные данные свидетельствовали о том, что поляризованный некогерентный красный свет и поляризованный лазерный свет стимулируют заживление кожной раны, а также оказывают влияние на приживление пересаженных кожных лоскутов [11]. В 1971 году проф. Е. Mester (Медицинский университет им. Земельвейса, г. Будапешт, Венгрия) сообщил о биостимулирующем и терапевтическом эффектах НИЛИ красной области спектра (использовалось излучение гелий-неонового лазера) при локальном воздействии на раневые дефекты. Важное значение в реализации биологических эффектов придавалось поляризации излучения. В экспериментах с лимфоцитами было показано, что некогерентное, но линейно-поляризованное излучение красной области оказывает почти такое же действие, как и излучение гелий-неонового лазера, и поляризация света является ключевым фактором этого эффекта [3].

Первичный механизм биологической активности когерентного и некогерентного света до настоящего времени остается предметом дискуссий. Результаты ряда медико-биологических исследований показали, что действие НИЛИ на ткани организма животных и человека вызывает изменение активности важнейших ферментов метаболизма, проницаемости мембран клеток, скорости синтеза белков, ДНК, РНК, деления клеток, регенерации тканей, репарации повреждений генетического аппарата клеток, активности иммунной системы. По версии одних авторов, лазерное излучение взаимодействует непосредственно с молекулами белков-ферментов. По версии других исследователей, НИЛИ индуцирует образование активных форм кислорода, кото-

рые обладают весьма высокой биологической активностью и (по известным и изученным механизмам) модифицируют пространственную структуру ферментов и мембран клеток. В большинстве случаев высказываемые гипотезы основываются на предположении о существовании специфических фоторецепторов, поглощение фотонов которыми инициирует те или иные фотохимические реакции, что и является начальной стадией рассматриваемого механизма. Рядом исследователей была выдвинута гипотеза о существовании нефотохимических, то есть нерезонансных механизмов биологического действия как когерентного, так и некогерентного излучения [11].

В организме человека фотохимические реакции и нерезонансные механизмы биологического действия линейно-поляризованного излучения реализуются в транскутанную фотомодификацию компонентов крови и эндотелия в сосудах микроциркуляторного русла, структурные изменения мембран эритроцитов, улучшение их реологических и транспортных свойств. Улучшение микроциркуляции и активация миграции полиморфноядерных лейкоцитов и лимфоцитов в рану способствуют ускорению заключительных фаз раневого процесса — пролиферации, дифференцировки фибробластов и репаративной регенерации. Вызываемые излучением конформационные перестройки элементов дермы активируют иммуногенез в коже и локальную гуморальную регуляцию обменных процессов [3, 11, 12]. В отдельных публикациях приводятся сведения и о непосредственном регуляторном действии поляризованного излучения на митотическую и пролиферативную активность клеток, ответственных за течение раневых репаративных процессов. По данным ряда исследователей, линейно-поляризованное монохроматическое излучение способно оказывать регуляторное (не повреждающее) действие на скорость деления клеток животного в монослое [13, 14].

Спорными остаются вопросы выбора излучения, а также параметров и режимов фотоздействия при проведении локальной

ФРТ. В доступной тематической литературе конкретные значения плотности мощности и плотности энергии облучения указываются не всегда. Приводятся сведения об успешном использовании поляризованного монохроматического излучения (НИЛИ и ПСИ) с длинами волн от 600 до 1000 нм и плотностью мощности от 1 до 40 мВт/см<sup>2</sup>. Данные о плотности энергии облучения за сеанс еще более разнообразны – от 0,05 до 15–20 Дж/см<sup>2</sup>. В иностранных публикациях основное значение в реализации стимулирующих фотобиологических эффектов ФРТ с аналогичными длинами волн придается поляризации света и плотности энергии облучения – приводятся значения ПЭО от 2 до 30 Дж/см<sup>2</sup> [9, 11, 12]. Однако, по данным других авторов, фотовоздействие НИЛИ с длиной волны 636 нм уже при достижении ПЭО 16 Дж/см<sup>2</sup> вызывает значимые повреждения ДНК раневых фибробластов и их гибель [14].

Методика локальной ФРТ предусматривает использование поляризованного излучения и направлена на стимуляцию регенерации тканей во вторую и третью фазу раневого процесса [3, 10]. Последовательное и поэтапное проведение локальной фототерапии с учетом состояния раны позволяет ускорить смену фаз и сократить сроки течения раневого процесса, уменьшить продолжительность и улучшить результаты лечения. В то же время многие литературные данные и сведения нуждаются в дальнейшем уточнении, экспериментальном подтверждении и клинической аргументации. Несмотря на широкое использование методов лечения, основанных на физических факторах воздействия, применению светодиодного излучения для проведения локальной фототерапии уделяется недостаточно внимания.

### Выводы

1. В исследованиях *in vitro* монохроматическое поляризованное светодиодное излучение с длиной волны  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм в зависимости от плотности энергии фотовоздействия способно вызывать как стимуляцию, так и угнетение митотической активности фибробластов кожи человека в монослойной культуре, либо не оказывать существенного влияния на митотический индекс. Таким образом, биологические эффекты поляризованного светодиодного излучения являются дозозависимыми и могут быть разнонаправленными.

2. Определены физические параметры светодиодного излучения, результатом действия которых является стимуляция пролиферации

фибробластов кожи человека *in vitro*. В заданных условиях эксперимента статистически достоверное увеличение митотической и пролиферативной активности культивированных ФКЧ было отмечено после облучения монохроматическим светодиодным светом с длиной волны  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм при значениях плотности энергии облучения 10 Дж/см<sup>2</sup> и 15 Дж/см<sup>2</sup>.

3. Анализ результатов исследований показал, что энергия фотовоздействия 30 Дж/см<sup>2</sup> как при использовании поляризованного светодиодного излучения с длиной волны  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм, так и  $\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$  мкм вызывала статистически достоверное уменьшение митотической активности.

4. Облучение монослойных культур фибробластов кожи человека монохроматическим поляризованным светодиодным излучением с длиной волны  $\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$  мкм и плотностью энергии в диапазоне 1 – 20 Дж/см<sup>2</sup>, а также сочетанное последовательное использование  $\lambda_1=(0,630\pm 0,03)$  мкм и  $\lambda_2=(0,405\pm 0,015)$  мкм не приводило к статистически достоверным изменениям значений митотического индекса по отношению к контрольной группе.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Абаев Ю. К. Раневая инфекция в хирургии : учеб. пособие / Ю. К. Абаев. – Минск : Беларусь, 2003. – 293 с.
2. Хирургические инфекции кожи и мягких тканей. Российские национальные рекомендации / С. Ф. Багненко [и др.]. – М. : БОРГЕС, 2009. – 90 с.
3. Применение поляризованного некогерентного излучения в комплексном лечении пациентов с раневыми дефектами кожи и мягких тканей, трофическими язвами, ожогами и пролежнями / С. И. Третьяк [и др.]. – Минск : БГМУ, 2012. – 30 с.
4. Сравнительная оценка методов стимуляции заживления линейных асептических ран / П. И. Толстых [и др.] // Лазерная медицина. – 2009. – Т. 13, № 2. – С. 34–39.
5. Юдинцева Н. М. Особенности организации цитоскелета у фибробластов нормальной, рубцовой и эмбриональной кожи человека, распластанных на белках внеклеточного матрикса / Н. М. Юдинцева, М. И. Блинова, Г. П. Пинаев // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 10. – С. 861–867.
6. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани / И. А. Шурыгина [и др.] // Сиб. мед. журн. – 2012. – № 3. – С. 8–12.
7. Физиотерапия : нац. рук. / С. Г. Абрамович [и др.] ; под ред. Г. Н. Пономаренко. – М. : ГЭОТАР, 2009. – 864 с.
8. Гончаров В. П. Отдаленные результаты амбулаторного лечения некоторых хронических хирургических заболеваний низкоинтенсивным лазерным и светодиодным излучением / В. П. Гончаров, Г. Р.

Абусева // Амбулатор. хирургия. — 2008. — № 1. — С. 54–55.

9. Medenica L. The use of polarised polychromatic non-coherent light alone as a therapy for venous leg ulceration / L. Medenica, M. Lens // J Wound Care. — 2003 Jan. — Vol. 12, № 1. — P. 37–40.

10. The effect of polarised light on wound healing / S. Monstrey [et al.] // Eur J Plast Surg. — 2002. — Vol. 24. — P. 377–82.

11. Регуляторная биологическая активность и эффективность лечебного действия низкоинтенсивного лазерного излучения и излучения сверхъярких светодиодов / В. А. Мостовников [и др.] // Лазерно-опт. технологии в биологии и медицине : материалы междунар. конф., Минск, 14–15 окт. 2004 г. : в 2 т. / под ред. А. Н. Рубинова [и др.]. — Минск, 2004. — Т. 1. — С. 40–61.

12. Yeh N. G. Light-emitting diodes — their potential in biomedical applications [ElectronIc resource] / N. G. Yeh, C. H. Wu, T. C. Cheng // Renewable and Sustainable Energy Reviews. — 2010. — Vol. 14. — P. 2161–66. — Mode of access: <http://www.elsevier.com/locate/rser.2010.02.015>. — Date of access: 10.04.2013.

13. Воздействие низкоинтенсивного монохроматического света на клетки культуры фибробластов

кожи L929 / Е. А. Шейко [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2006. — Т. 141, № 6. — С. 689–91.

14. Mbene A. B. DNA damage after phototherapy in wounded fibroblast cells irradiated with 16 J/cm<sup>2</sup> [ElectronIc resource] / A. B. Mbene, N. N. Houreld, H. Abrahamse // J of Photochem and Photobiol B: Biol. — 2009. — Vol. 94. — P. 131–37. — Mode of access: <http://www.elsevier.com/locate/jphotobiol.2008.11.002>. — Date of access: 25.02.2013.

15. Комплекс многоцветный фототерапевтический "Ромашка" : рук. по эксплуатации : ТУ ВУ 100217336.006 РЭ / Ин-т физики им. Б. И. Степанова НАН Беларуси. — 20 с.

#### Адрес для корреспонденции

220116, Республика Беларусь,  
г. Минск, пр. Дзержинского, д. 83,  
УО «Белорусский государственный  
медицинский университет»,  
2-я кафедра хирургических болезней,  
тел. моб. +375 29 622-57-81,  
e-mail: buravskyav@mail.ru,  
Буравский Александр Владимирович

#### Сведения об авторах

Буравский А.В., ассистент 2-й кафедры хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Баранов Е.В., к.м.н., доцент 2-й кафедры хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Третьяк С.И., член-корреспондент НАН Беларуси,

д.м.н., профессор, заведующий 2-й кафедрой хирургических болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Квачева З.Б., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии клетки ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси».

*Поступила 18.05.2015 г.*