14.03.09 – клиническая аллергология, иммунология

##### На правах рукописи

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени доктора

биологических наук

Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы и факторы мукозального иммунитета

Гизингер Оксана Анатольевна

##### Челябинск, 2010

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Одним из ведущих направлений современной иммунологии является поиск средств и способов избирательного воздействия на отдельные этапы развития иммунного ответа (Покровский В.И., 1994; Долгушин И.И., Бухарин О.В., 2001; Ильина Н.И., 2005; Тотолян А.А., 2007). Перспективным подходом к решению данной проблемы может являться применение физических воздействий в качестве немедикаментозных стимуляторов клеточного и гуморального звеньев иммунитета (Купин В.И.,1995; Баранов В.Н., 1998; Клебанов Г.К., 2000).

Клинические и экспериментальные исследования, проведённые в последнее десятилетие, свидетельствуют о возможности модуляции иммунных реакций организма при воздействии на него таких физических факторов, как лазерное излучение. В стратегическом плане заслуживает внимание изучение потенциала физиотерапевтических лечебных воздействий и оценка их влияния на факторы врождённого иммунитета с учётом выбора рациональных параметров воздействий (Гладких С.П., 1996; Конопля А.И.,1998; Буйлин В.А., 2001; Москвин С.В., 2005; Неймак Б.А, 2005; Ефремов А.В., 2005). Использование низкоинтенсивного лазерного излучения стало в последние годы одним из распространённых компонентов комплексной терапии воспалительных заболеваний (Ляшенко В.А., 1998; Калинина С.Н., 2004; Лукьянов Н.В., 2004; Павлов В.Н., 2004; Jansen E.D.,1997; Selman S. N., 1998). В настоящее время принято считать, что низкоинтенсивное лазерное излучение (НИЛИ) весьма эффективно при различных патологических процессах, в том числе для коррекции локальной и системной иммунной недостаточности (Васильев А.П., 1999; Сафаров Р.М., 2000).

В успешном решении вопросов, связанных с эффективностью лазеротерапии, большая роль отводится рационально подобранным параметрам излучения. Однако, применяемые в эксперименте и клинической практике физиотерапевтические подходы могут оказывать на иммунную систему больных различные по силе и по направленности эффекты, что, соответственно вызывает значительные сложности в вопросах их применения. Практически отсутствует адекватное экспериментальное обоснование применяемых доз воздействия (Соловьёва В.И., 2001; Полунина Т.Е., 2002; Москвин С.В., 2005). Остаются неясными вопросы влияния лазера на нейтрофилы и факторы мукозального иммунитета при воспалительном процессе. Такое положение затрудняет развитие указанного направления иммунокоррекции и делает его достаточно актуальным для дальнейшего изучения. Моделирование иммунного ответа на действие лазерного излучения в эксперименте позволит установить пороговые значения, наиболее эффективные для их локального и системного воздействия (Ларюшин А.И.,1997; Горяйнов И.И.,1998; Каплан М.А., 1998; Золотарёва Т.А., 2000; Козель А.И., 2000). Указанные обстоятельства определили цель и направления настоящего исследования.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании морфофункциональных, цитохимических, биохимических характеристик нейтрофильных гранулоцитов изучить дозозависимые эффекты лазеров низкой интенсивности с постоянной и переменной генерацией импульса и оценить возможности лазеротерапии для коррекции факторов врождённого иммунитета.

ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Проанализировать действие различных частот, доз излучения, времени экспозиции низкоэнергетического лазерного излучения с переменной генерацией импульса на реактивность нейтрофилов донорской крови in vitro
2. В экспериментальных исследованиях изучить влияние дозы излучения, времени экспозиции низкоэнергетического лазерного излучения с постоянной генерацией импульса на функциональную активность нейтрофилов донорской крови.
3. Провести сравнительный анализ действия различных параметров низкоэнергетического лазерного излучения с постоянной и переменной генерацией импульса на функции нейтрофилов, выделенных их донорской крови.
4. Исследовать биохимический, цитокиновый состав и выявить особенности состояния нитроксидергической системы, уровень дефенсинов супернатантов нейтрофилов периферической крови, облучённых лазером низкой интенсивности с переменной и постоянной генерацией импульса.
5. Определить характер нарушений клеточного, гуморального звеньев иммунной системы, нитроксидергических особенностей периферической крови женщин при воспалительных заболеваниях нижнего отдела урогенитального тракта, вызванных хламидиями, и проанализировать динамику изменений исследуемых показателей при внутрисосудистом лазерном облучении крови.
6. Изучить влияние лазера низкой интенсивности на морфологический состав и функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов в очаге воспалительной реакции при заболеваниях нижнего отдела репродуктивного тракта, вызванных хламидиями.
7. Провести сравнительный анализ влияния локальных лазерных воздействий при постоянной и переменной генерации импульса на динамику клеточных и гуморальных факторов местной противоинфекционной защиты репродуктивного тракта.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА

В экспериментальных исследованиях установлены закономерности действия различных параметров низкоинтенсивного лазерного излучения с постоянной и переменной генерацией импульса на морфофункциональные, цитохимические, биохимические характеристики нейтрофильных гранулоцитов, выделенных из периферической крови доноров. Экспериментально обоснована возможность оптимизации применения лазерных воздействий за счёт изменения параметров излучения.

Показано, что воздействие лазером низкой интенсивности с постоянной и переменной генерацией импульса влияет на секреторный, бактерицидный и фагоцитарный потенциал нейтрофильных гранулоцитов. Выявлен однонаправленный характер их изменений, которые зависели от дозы излучения и времени экспозиции.

В работе дана сравнительная оценка биохимического и цитокинового состава супернатантов нейтрофилов, выделенных из периферической крови доноров, облучённых лазером низкой интенсивности с переменной и непрерывной генерацией импульса. Прослежены изменения в уровне секреции неактивированными и активированными лазерным излучением нейтрофилами крови доноров уровня дефенсинов, провоспалительных цитокинов (ИЛ-1α, ИЛ-1β, ИЛ-8, ФНО-α), глюкозы, макроэлементов (Са2+, Мg2+). Выявлены особенности состояния нитроксидергической системы супернатантов нейтрофилов, интактных и активированных лазером низкой интенсивности. Показано, что эти изменения имеют однонаправленный характер, степень выраженности которых различна.

Проанализировано влияние внутривенного лазерного излучения на иммунореактивность организма и определено положительное влияние данного вида излучений на динамику иммунологических, биохимических показателей, состояния нитроксидергической систем периферической крови женщин.

Проведен сравнительный анализ влияния лазерного излучения на функции нейтрофилов и факторы мукозального иммунитета в комплексной терапии урогенитального хламидиоза. Выявлен однонаправленный характер изменений факторов местной противоинфекционной защиты при локальном применении лазерного излучения с постоянной и переменной генерацией импульса, сопровождающийся нормализацией количества нейтрофилов в очаге воспаления и восстановлением их функциональной активности.

Впервые установлена высокая эффективность локального и системного лазерного воздействия при постоянной и переменной генерации импульса в комплексном лечении больных с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта, оказывающих иммуномодулирующее влияние на функциональную активность нейтрофилов в очаге воспалительной реакции.

Разработан «Способ локальной иммунокоррекции инфекционно-воспалительных заболеваний урогенитального тракта женщин, вызванных микроорганизмами, передаваемыми половым путём». Приоритетная справка от 15 мая 2009 года. Заявка на изобретение № 2009117799.

ТЕРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Полученные данные о влиянии различных режимов лазерного излучения низкой интенсивности на морфофункциональные, цитохимические, биохимические характеристики нейтрофильных гранулоцитов, биохимическом составе особенностях состояния нитроксидергической системы супернатантов нейтрофилов периферической крови, облучённых лазером низкой интенсивности с переменной и постоянной генерацией импульса, имеют существенное значение в понимании проблемы регулирующего влияния лазерных воздействий на нейтрофильные гранулоциты и факторы мукозального иммунитета в условиях in vitro и in vivo.

Практическое значение работы состоит в установлении возможности восстановления функциональной активности нейтрофилов и иммунореактивности организма путём системного и локального воздействия лазера низкой интенсивности. Полученные результаты открывают перспективу для проведения дальнейших испытаний использования лазеров низкой интенсивности с целью иммунокоррекции при воспалительных заболеваниях репродуктивного тракта.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. В экспериментальных условиях воздействие лазером низкой интенсивности приводит к усилению функциональных возможностей нейтрофильных гранулоцитов, которые проявляются в усилении их микробоцидного потенциала, выраженность данных изменений имеет дозозависимый эффект, зависящий от режима генерации импульса.

2. При исследовании in vitro действия низкоинтенсивного лазерного излучения с постоянной и переменной генерацией импульса на функциональную активность нейтрофилов периферической крови доноров выявлено стимулирующее влияние лазеров низкой интенсивности генерирующих излучение с длиной волны 0,63 мкм, частотой 100Гц дозой излучения 0,56 Дж/см2, времени экспозиции 12,5 мин

3. Супернатанты нейтрофилов периферической крови доноров содержат провоспалительные цитокины (ИЛ-1α, ИЛ-1β, РАИЛ, ИЛ-8, ФНО-α), растворимые антимикробные факторы (оксид азота, дефенсины, бактерицидный/индуцирующий протеин), глюкозу, ионы кальция, магния. Индукция нейтрофилов крови лазерным излучением с постоянной и переменной генерацией импульса приводит к усилению их секреции, степень выраженности которой зависит от режима генерации импульса и биоэффективных доз воздействия.

4. У пациенток с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта выявлено угнетение иммунореактивности организма, что проявляется изменениями клеточных и гуморальных факторах иммунитета, состояния нитроксидергической системы, нормализация которых наступала при комплексной терапии с применением внутрисосудистого лазерного облучения крови.

5. Сравнительный анализ локальной иммунокоррекции с применением лазерного излучения с переменной и постоянной генерацией импульса при воспалительных заболеваниях нижнего отдела репродуктивного тракта, вызванных хламидиями определил однонаправленный, позитивный характер влияний данных физических воздействий на факторы местной противоинфекционной защиты репродуктивного тракта. Наиболее выраженные изменения иммунологической активности происходили при использовании лазерного излучения с переменной генерацией импульса.

ВНЕДРЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

##### Методы системного и локального воздействия лазерным излучением больных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта внедрены в практику работы Государственного лечебно-профилактического учреждения здравоохранения «Челябинский областной кожно-венерологический диспансер», консультационно-диагностического центра ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия»; Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедрах: дерматовенерологии, аллергологии и иммунологии, микробиологии, вирусологии иммунологии ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ

Основные положения диссертации доложены: на научной конференции «Актуальные проблемы практической медицины» (г. Челябинск 2004, 2005, 2006, 2007), Международном конгрессе по иммунореабилитации (г. Москва, 2005), IV конференции иммунологов Урала (г.Уфа, 2005), «Международном конгрессе по иммунореабилитации» (г.Москва, 2005), конференции, посвященной 25-летию ЦНИЛ ЧелГМА «Новые лабораторные технологии в диагностике и лечении заболеваний человека» (Челябинск, 2006), V конференции иммунологов Урала (Оренбург, 2006), Всероссийском форуме с международным участием им. академика В.И.Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г. Санкт-Петербург, 2006), научно –практической конференции «Актуальные вопросы дерматовенерологии» (г. Челябинск, 2006), юбилейной научно-практической конференции, посвящённой 60-летию дерматологической службы области «Достижения и перспективы развития дерматовенерологии» (г. Челябинск, 2007), конференции, посвящённой 60-летию клиники ЧелГМА «Актуальные вопросы теоретической и практической медицины» (Челябинск, 2007), научно-практических конференциях Челябинской областной общественной организации врачей – лаборантов (г. Челябинск, 2005, 2006, 2007, 2008), 2-м Российско-чешском медицинском форуме с международным участием (г. Челябинск, 2006), Научно-практической конференции «Магнитные поля и здоровье человека» (Курск, 2007), VII конференции иммунологов Урала (г. Ижевск, 2007), материалах VI итоговой научно-практической конференции молодых учёных (г. Челябинск, 2008), VI конференции иммунологов Урала (г. Оренбург, 2008), ХIII объединённом всероссийском иммунологическом форуме с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» (г.Санкт-Петербург, 2009), VII конференции иммунологов Урала «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической аллергологии и иммунологии» (г. Архангельск, 2009) Всероссийском съезде дерматовенерологов (г. Казань, 2009), Научно-практической конференции Центрального федерального округа Российской Федерации с международным участием (г.Тверь, 2009)

ПУБЛИКАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 44 печатных работы.

ОБЪЁМ И СТРУКТУРА ДИСЕРТАЦИИ.

Диссертация изложена на 354 страницах машинописного текста, содержит 71 таблицу и 12 рисунков. Состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы исследования», 5 глав собственных исследований, обсуждения полученных результатов и выводов. Библиография включает в себя 395 литературных источников, в том числе 270 отечественных и 125 зарубежных

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальный этап исследования

В соответствии с задачами были исследованы функциональная активность нейтрофильных гранулоцитов (НГ) донорской крови при действии на них, в условиях in vitro, лазерного излучения с различными дозами. Для получения нейтрофилов использовали 15,0 мл гепаринизированной (10-15 ЕД/мл гепарина фирмы «Гедеон- Рихтер», Hungery) периферической крови, которую с целью осаждения эритроцитов отстаивали в стерильной пробирке с добавлением 10% раствора желатина в соотношении 10:1 при температуре + 37 ºС в течение минут. Нейтрофилы выделяли из лейкоцитарной взвеси в двойном градиенте плотности стерильных растворов фиколла-верографина (Parmacia, Sweden, Spofa, CSSR). Плотность верхнего слоя градиента составляла 1.075-1.077, а нижнего 1.093-1.095 (Wong L., 1975). Объём каждого градиента равнялся 1,5 мл. Количество нейтрофилов доводили до концентрации 5 х10 6 клеток\мл.

Было изучено два вида низкоинтенсивного лазерного излучения (постоянная и переменная генерацию импульса). При облучении нейтрофилов использовали лазерный излучатель «Мустанг-2000». Воздействие на нейтрофилы проводили в кювете со светопоглощающими стенками таким образом, чтобы мощность лазерного излучения, на уровне дна кюветы, измеренная с помощью дозиметра («Анод», Россия), соответствовала выбранным дозам. Доза облучения, рассчитанная с учётом частоты следования импульса от 20 до 2500Гц, мощности излучения, диаметра светового пятна лежала в интервале значений 0,0018-1,1 Дж\см2. Используемые режимы чаще всего применяются в экспериментальной и клинической практике (Александрова О.Ю., 2003). Для проведения эксперимента нейтрофилы облучали при постоянной длине волны 0,63 мкм. Световое поле для облучения взвеси НГ конфигурировали таким образом, чтобы в любой точке зоны облучения значение отклонения плотности светового потока было не более чем на 10%, что обеспечивало практически одинаковые условия для равномерного облучения суспензии НГ. Равномерность распределения светового потока производили при помощи люксметра («Mastech» модель M S6610) в отн. ед (Люкс). Для исследования влияния ЛО с переменной генерацией импульса были выбраны следующие частоты: 20 Гц, 100 Гц, 500 Гц, 2500 Гц, которые подбирали таким образом, чтобы обеспечить равные дозовые нагрузки при всех режимах воздействия при проведении эксперимента.

Функциональную активность интактных и облучённых лазером низкой интенсивности нейтрофилов определяли по способности клеток к поглощению частиц латекса, лизосомальной активности (Фрейдлин И.С., 1984), показателям НСТ-теста (Маянский А.Н., Виксман М.Е., 1979).

Выделение секреторных продуктов полиморфноядерных лейкоцитов, выделенных из крови здоровых доноров и стимулированных лазерным излучением низкой интенсивности, проводили с помощью метода, разработанного И.И. Долгушиным и А.В. Зурочкой (Долгушин И.И., Зурочка А.В., 1992).

С целью подробного исследования продуктов секреции интактных и облучённых нейтрофилов мы определяли их биохимический и цитокиновый состав. При изучении биохимического состава продуктов секреции полиморфноядерных лейкоцитов мы исследовали содержание глюкозы, макроэлементов (Са2+, Мg2+), продуктов метаболизма оксида азота, содержания НАДФ-оксидазы в нейтрофилах. Количественное определение глюкозы осуществляли с помощью набора «Глюкоза-ФКД» на биохимическом анализаторе Roki (Ольвекс диагностикум, Санкт-Петербург). Содержание кальция и магния в супернатантах нейтрофилов проводили унифицированным калориметрическим методом на биохимическом анализаторе Roki (Ольвекс диагностикум, Санкт-Петербург). Определение оксида азота, нитратов, нитритов в супернатантах нейтрофилов, проводилось фотометрическим способом (Емченко Н.Л. с соавт., 1994 г.), в модификации Э.Н. Коробейниковой (2002 г). Определение активности фермента НАДФН-оксидазы в нейтрофилах было исследовано спектрофотометрическим способом на спектрофотометре Shimadzu (Япония).

При оценке цитокинового состава супернатантов нейтрофилов определяли наличие в них следующих провоспалительных цитокинов: ИЛ-1α, ИЛ-1β, РАИЛ 1, ИЛ-8, ФНО-α. С этой целью использовали соответствующие тест-системы ООО «Цитокин»(г. Санкт-Петербург), основанные на "сендвич-методе" твёрдофазного ИФА с применением пероксидазы хрена в качестве индикаторного фермента (Кетлинский С.А., Калинина К.М., 1998). Определение дефенсинов, бактерицидного белка BPI в сыворотке супернатантах интактных и активированных НИЛИ нейтрофилов определяли с помощью набора реактивов «HNP1-3» (HyCult biotechnology», Нидерланды) с использованием метода основанного на двухсайтовом твёрдофазном ИФА.

Исследование влияния лазерного излучения на функции нейтрофилов и факторы мукозального иммунитета репродуктивного тракта in vivo

За период с 2005 по 2008 год нами проведено открытое, краткосрочное, простое, "слепое" рандомизированное исследование влияния лазеротерапии на состояние клеточных и гуморальных факторов местной и системной противоинфекционной защиты у 80 здоровых и 386 женщин с заболеваниями нижнего отдела репродуктивного тракта, находившимся на обследовании и лечении в Государственном лечебно-профилактическом учреждении здравоохранения «Челябинский областной кожно-венерологический диспансер», консультативно-диагностическом центре ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия». План исследования соответствовал положениям Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (ВМА) последнего пересмотра (г. Эдинбург, Шотландия, 2000 г.), с учётом разъясняющего примечания п.29, одобренного Генеральной ассамблеей ВМА (Вашингтон, 2002) и был одобрен этическим комитетом ГОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Возраст 80 здоровых женщин составил 26,5±0,95, средний возраст инфицированных женщин -27,2 ±2,08 лет. 386 женщин с монохламидийной и хламидийно-микоплазменной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта сопоставимые по возрасту, гинекологическому анамнезу, отсутствию соматической патологии, однонаправленным изменениям системного и локального иммунного статуса были разделены согласно принципу адаптивной рандомизации следующим образом: Первую группу больных составили 100 женщин с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта. Обнаружение ДНК возбудителей выполнялась с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием диагностических тест-систем ООО «Литех», г. Москва. Диагноз ставился врачом-дерматовенерологом в соответствии с международной статистической классификацией болезней МКБ-10 (2000). Всем женщинам с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта поводилась базисная терапия согласно методическим рекомендациям по диагностике и лечению наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путём («Методические материалы по диагностике и лечению наиболее распространенных инфекций, передаваемых половым путём; протоколы ведения больных» ГУ ЦНИКВИ МЗ РФ; Москва; 2008). Схема лечения включала антибактериальную, десенсебилизирующую терапию, протеолитические ферменты, местно антисептики.

Пациенткам второй группы, состоящей из 100 женщин, наряду с базисной была местно применена лазеротерапия с использованием аппарата «МУСТАНГ-2000» (режим постоянной генерации импульса). Длина волны излучения 0,632 мкм, постоянный режим генерации импульса, время облучения 10 минут. Курс лечения составил 10 ежедневных процедур

В третью группу вошли 106 женщин, которым в комплексе с базисной терапией были предложены локальные физиотерапевтические процедуры с применением НИЛИ с переменной генерацией импульса аппаратом «МУСТАНГ - 2000» . Аппарат имеет Сертификат соответствия Госстандарта России, выданной Органом по сертификации ИМН ВНИИИМТ и соответствует ГОСТ Р50444-92, ГОСТ Р50267.0-92(МЭК 601-1-88), ГОСТ Р500267.0.2-95(МЭК601-1-2-93), ГОСТ Р50723-07. Сеансы лазерного излучения проводились в амбулаторных условиях, в специально оборудованном кабинете согласно «Санитарным нормам и правилам устройства и эксплуатации лазеров» № 5804-91. Положение больной при проведении локальной лазеротерапии - лёжа в гинекологическом кресле или на кушетке на спине, ноги согнуты в тазобедренных суставах и разведены (Александрова О.Ю., 2003). Процедура локальной лазеротерапии проводилась при помощи специальной разовой насадки, которая рассеивала исходящее из терминала аппарата лазерное излучение во все стороны. Длина волны излучения 0,632 мкм, переменный режим генерации импульса время облучения 10 минут.

Курс лечения составил 10 процедур и занимал один межменструальный промежуток. Лечение с применением низкоинтенсивного лазерного излучения осуществлялось согласно методическим рекомендациям УГМАДО г. Челябинска (2000г.), использование лазеротерапии при лечении хламидийной инфекции нижнего отдела репродуктивного тракта рекомендовано МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (2000г.). Методики использования лазеротерапии сертифицированы Роспотребнадзором и предложены к включению в комплекс лечебных мероприятий при лечении инфекционно- воспалительных заболеваниях урогенитального тракта, вызванных ИППП; ГОСТ Р50444-04, ГОСТ Р50267.0-04(МЭК 601-1-88), ГОСТ Р500267.0.2-95(МЭК601-1-2-04), ГОСТ Р60725-04 выданной Органом по сертификации ИМН ВНИИИМТ.

В отдельную группу вошли 80 женщин, которым наряду с базисным лечением, было проведено внутрисосудистое лазерное облучение крови (ВЛОК) аппаратом «МУЛАТ». Положение больной при проведении лазеротерапии - лёжа на кушетке, на спине. Процедура лазеротерапии проводилась при помощи одноразовых стерильных световодов с иглой (КИВЛ-01(ОС-2), путем венопункции в локтевую или подключичную вену вводят иглу тонким стерильным световодом ОС-2 (НПЛЦ «Техника», г. Москва), через который происходит облучение протекающей крови. Длина волны излучения 0,632 мкм, мощность излучения 1мВт, постоянный режим генерации импульса время облучения 40 минут. Курс лечения составил 7 ежедневных процедур (Руководство по использованию аппарата «МУЛАТ», 2008).

Все исследования проводились на основании информированного добровольного письменного согласия обследуемых. Критерии включения: наличие хламидийной инфекции нижнего отдела репродуктивного тракта женщин. Критерии исключения: наличие тяжёлой соматической патологии (ИБС, стенокардии, гипертонической болезни, острых и обострение хронических заболеваний, онкозаболеваний, аутоиммунной патологии), гормональных нарушений, беременности, лактации, наличии сопутствующих венерических заболеваний, ВИЧ инфекции, других инфекций, передающихся половым путём, включая папилломавирусную, герпетическую, цитомегаловирусную инфекции, несогласие пациенток на участие в исследовании.

Комплексное обследование больных с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта включало сбор анамнеза, осмотр, комплекс инструментальных методов исследования, включающих ультразвуковое исследование половых органов осуществлялось на ультразвуковом сканере Aloka SSD-680, цитологическое исследование мазков с экзо- и эндоцервикса; биопсию шейки матки с последующим гистологическим исследованием полученного материала (Прилепская В.Н., Кондриков Н.И. и соавт., 2000), кольпоскопию с оценкой состояния слизистой оболочки нижней трети цервикального канала,

Бактериологическое исследование на наличие гонококков и трихомонад, проводилось согласно методическим рекомендациям МЗ РФ «О совершенствовании контроля за заболеваниями, передающимися половым путем» (Приказ МЗ РФ № 286 от 07.12.93 г.). Культуральной диагностике предшествовало бактериоскопическое исследование материала из заднего свода влагалища и цервикального канала. Микроскопии подвергались окрашенные по Граму и метиленовым синим мазки. Определение грибов рода Candida проходило с использованием среды Сабуро и 5 % кровяного агара. Диагностическим повышенным титром грибов рода Candida была концентрация 103 КОЕ / мл и выше.

Оценка локального и системного иммунного статуса, была проведена до начала лечения и на его заключительном этапе. Материалом для исследования служили периферическая кровь и цервикальный секрет.

При иммунологическом обследовании в периферической крови определяли общее количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу, содержание лимфоцитов, несущих рецепторы CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, CD34, CD95, CD HLA-DR у здоровых и женщин с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта по методике имунофенотипирования в модификации С.В. Сибиряка и соавт.(1997) с использованием моноклональных антител серии ИКО: анти- CD3, анти- CD4, анти- CD8, анти- CD16, анти- CD25, анти- CD34, анти- CD95,анти- CD HLA-DR («Медбиоспектр», Москва). Функциональную активность нейтрофилов слизи и периферической крови изучали по способности клеток к поглощению частиц латекса, лизосомальной активности (Фрейдлин И.С., 1984), показателям НСТ-теста (Маянский А.Н., Виксман М.Е., 1979).

Определение содержания цитокинов (ИЛ-1α, ИЛ-1β, РАИЛ1, ИЛ-8, ФНО-α, ИФН-γ), концентрацию IgА, IgМ, IgG, дефенсинов, белка ВРI сыворотки крови и в цервикальном секрете проводилось с использованием соответствующих тест-систем для иммуноферментного анализа (ООО «Цитокин» г. Санкт-Петербург; ООО «Стибиум», г. Санкт-Петербург; ООО «Вектор-Бест», г. Новосибирск; «Hycult biotechnology», Нидерланды). Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов в периферической крови и цервикальном секрете устанавливали с помощью метода, предложенного В. Гашковой с соавт. (1978).Уровень общей гемолилитической активности комплемента (СН50) определяли методом титрования по 50% гемолизу. Содержание компонентов комплемента в сыворотке крови определяли методом молекулярного титрования (Красильников А.П.,1984). Содержание оксида азота и его метаболитов в сыворотке крови и цервикальном секрете определяли фотометрическим способом (Емченко Н.Л. с соавт., 1994 г.), в модификации Э.Н. Коробейниковой (2002 г). Исследование липидного спектра крови: общий холестерин (ОХС), холестерин липопротеинов низкой плотности (ХС ЛПНП), холестерин липопротеинов высокой плотности (ХС ЛПВП), триглицериды (ТГ) проводилось ферментным способом на автоматическом биохимическом анализаторе «Cobas intesra 400 plus» (Швецария). Вычисление уровня ХС ЛПНП проводилось по формуле W. Freidwald (1972): ХС ЛПНП=ОХС-ТГ/2,2- ХС ЛПВП

Данные, обработанные методами вариационной статистики, выражали в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки. О достоверности различий средних величин судили с помощью непараметрических критериев: Манна-Уитни (U), Колмогорова-Смирнова (КS). Статистические процедуры, используемые для анализа качественных признаков, включали построение таблиц сопряженности и вычисление точного критерия Фишера (односторонний вариант) При проведении множественных сравнений использовали поправку Бонферрони (Гланц С., 2004; Сергиенко В.И., 2000). Результаты исследования обрабатывались на ПЭВМ с использованием пакета прикладных программ «Statistica for Windows», полученные данные выражали в Международной системе единиц (Липперт Г., 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Этап исследования in vitro

Для решения поставленной цели, в экспериментальной модели было изучено влияние низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ) на нейтрофилы, выделенные из периферической крови доноров, и их секреторные продукты. Выбор донорских нейтрофилов в качестве клеток мишеней ЛО (лазерного облучения) был обусловлен с одной стороны, их полифункциональной ролью в поддержании защитной реакции организма, а с другой, доступностью, и, в определённом смысле простотой исследования отдельных показателей их функциональной активности (Прозорова С.Г., 1998; Чичук Т.В.,1999; Юдина О.М., 2007). В соответствии с поставленной задачей, была исследована функциональная активность нейтрофилов донорской крови при действии на них, в условиях in vitro, различных доз лазерного излучения (ЛО), биохимический состав супернатантов интактных и облучённых лазером нейтрофилов.

Было изучено два режима низкоинтенсивного лазерного излучения (постоянная и переменная генерацию импульса). Для проведения экспериментальных исследований был использован лазерный излучатель «МУСТАНГ-2000» (НПЛЦ «Техника», г. Москва). В серии опытов, в аналогичных условиях выделенные из крови доноров нейтрофилы подвергали лазерному облучению суспензию, температура взвеси нейтрофилов составила 370C. Для проведения ЛО нейтрофилов в силиконизированную кювету со светоизолированными стенками вносился 1 мл раствора Хенкса, содержащего 105 нейтрофилов. Клетки облучали сверху при постоянной длине волны 0,63 мкм, поскольку по данным С.В Москвина (2004) длина волны 0,63 мкм соответствует на ионном уровне зоне адсорбции основных метаболитов НГ в световом спектре излучения лазера (Ben-Her E., 1993). Доза облучения взвеси нейтрофилов, рассчитанная с учётом частоты следования импульса от 20 до 2500Гц лежала в интервале значений 0,0018-1,1Дж\см2. Время экспозиции 5-ти кратно увеличивалось-30 сек, 2,5 мин, 12,5 мин. Интактные нейтрофилы подвергали темновой инкубации при аналогичных условиях, но без ЛО.

Для исследования функциональной активности НГ интактных и облучённых лазером с постоянной и переменной генерацией импульса, биохимических особенностей супернатантов нейтрофилов были использованы иммунологические методы: определение лизосомальной фагоцитарной, активности нейтрофилов по НСТ-тесту, и биохимические методы - исследование активности НАДФ-оксидазы нейтрофилов, цитокинового профиля, содержания макроэлементов и глюкозы в супернатантах нейтрофилов.

Анализ дозозависимых эффектов действия ЛО с переменной генерацией импульса показал стимулирующее влияние излучений при длине волны 0,63 мкм, частоте 100 Гц, и дозой воздействия 0,56Дж\см2. При данных параметрах нами отмечено максимальное усиление факторов кислородзависимой микробоцидной системы и фагоцитарной активности НГ. Лизосомальная активность нейтрофилов в ответ на стимуляцию лазером при повышении дозы излучения с от 0,0018 Дж\см2 до 0,56Дж\см2 снижалась; наблюдаемый процесс связан с тем, что активированные лазером нейтрофилы частично или полностью утрачивают свои гранулы, подвергаются дегрануляции или экзоцитозу, что не противоречит данным А.И. Козеля и Г.К. Попова по данной проблеме (Козель А.И., Попов Г.К., 2000) (таблица 1).

Поскольку наряду с ЛО при переменных воздействиях также используются излучения с постоянной генерацией импульса, следующей задачей исследования было изучение влияния дозы, времени экспозиции лазерного излучения с постоянной генерацией импульса на функциональную активность нейтрофилов донорской крови.

По мнению С.В.Москвина данный вид излучения обладает не менее высокой селективностью действия на биологические объекты, чем НИЛИ с переменной генерацией импульса (Москвин С.В., 2000). Условия выделения и дизайн проведения эксперимента были аналогичны модели, использованной нами при исследовании влияния излучения с переменной генерацией импульса.

Таблица 1.

Сравнительный анализ дозозависимого влияния НИЛИ с переменной генерацией импульса с частотой 100Гц, при длине волны 0,63 мкм, экспозиции 12,5 мин. на функциональную активность нейтрофилов периферической крови доноров (М±m)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатели | Дозы облучения в Дж/см2 | | | | | | |
| 0,018 | 0,036 | 0,072 | 0,14 | 0,28 | 0,56 | 1,1 |
| Показатель люминесценции лизосом,  у.е | 451.3±14.57\* | 294.3±12.51\*,\*\* | 224.3±11.54\*,\*\* | 224.6±11.59\*,\*\* | 195.6±11.51\*,\*\* | 156.6±11.52\*,\*\* | 206.6±11.50\*,\*\* |
| Активность лизосом, % | 95.21±1.25\* | 68.21±1.25\*,\*\* | 44.21±1.12\*,\*\* | 60.2±1.16\*,\*\* | 49.2±1.12\*,\*\* | 38.2±1.13\*,\*\* | 78.2±1.12\*,\*\* |
| НСТ- спонтанная, % | 43.88±1.59\* | 53.55±1.44\*,\*\* | 61.1±1.41\*,\*\* | 67.1±1.24\*,\*\* | 72.1±1.34\*,\*\* | 96.1±1.42\*,\*\* | 30.1±1.41\*,\*\* |
| НСТ- спонтанная, у.е | 0.48±0.05\* | 0.65±0.05\*,\*\* | 0.78±0.02\*,\*\* | 0.82±0.01\*,\*\* | 0.88±0.01\*,\*\* | 0.98±0.01\*,\*\* | 0.50±0.01\*,\*\* |
| НСТ-индуцированная,  % | 67.86±1.45\* | 73.86±1.42\*,\*\* | 74.86±1.32\*,\*\* | 83.86±1.34\*,\*\* | 93.86±1.31\*,\*\* | 99.86±1.22\*,\*\* | 43.86±1.23\*,\*\* |
| НСТ-индуцированная, у.е | 0.79±0.03\* | 0.82±0.03\*,\*\* | 0.75±0.02\*,\*\* | 0.81±0.01\*,\*\* | 0.88±0.01\*,\*\* | 0.96±0.01\*,\*\* | 0.52±0.01\*,\*\* |
| Функциональный резерв нейтрофилов | 2.49±0.13\* | 1.30±0.13\*,\*\* | 1.18±0.11\*,\*\* | 1.15±0.11\*,\*\* | 1.25±0.11\*,\*\* | 1.1±0.12\*,\*\* | 1.43±0.12\*,\*\* |
| Активность фагоцитоза,% | 64.19±1.54\* | 75.19±1.53\*,\*\* | 85.19±1.32\*,\*\* | 89.19±1.21\*,\*\* | 94.19±1.30\*,\*\* | 98.19±1.31\*,\*\* | 44.19±1.31\*,\*\* |
| Интенсивность фагоцитоза | 2.16±0.11\* | 3.13±0.12\*,\*\* | 3.62±0.11\*,\*\* | 3.66±0.15\*,\*\* | 3.81±0.10\*,\*\* | 4.01±0.13\*,\*\* | 1.62±0.14\*,\*\* |

Примечание: \*-достоверность различий показателей по отношению к неактивированным нейтрофилам, \*\*-достоверность различий показателей разных групп, использован критерий Мана-Уитни

Таблица 2

Сравнительный анализ дозозависимого влияния НИЛИ с постоянной генерацией импульса при длине волны 0,63 мкм, экспозиции 12,5 мин. на функциональную активность нейтрофилов периферической крови доноров(М±m)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатели | Дозы облучения в Дж/см2 | | | | | | |
| 0,018 | 0,036 | 0,072 | 0,14 | 0,28 | 0,56 | 1,1 |
| Показатель люминесценции лизосом,у.е | 300.19±12.12\* | 259.19±10.14\*,\*\* | 249.19±12.22\*,\*\* | 230.19±10.21\*,\*\* | 229.19±11.16\*,\*\* | 201.19±11.04\*,\*\* | 181.19±13.02  \*,\*\* |
| Активность лизосом, % | 90.08±1.02\* | 79.08±1.03\*,\*\* | 72.08±1.01\*,\*\* | 69.08±1.03\*,\*\* | 63.05±1.03\*,\*\* | 56.08±1.04\*,\*\* | 48.05±1.03  \*,\*\* |
| НСТ- спонтанная, % | 35.59±1.25\* | 42.59±1.22\*,\*\* | 44.59±1.20\*,\*\* | 54.59±1.22\*,\*\* | 64.59±1.23\*,\*\* | 88.59±1.19\*,\*\* | 98.59±1.20  \*,\*\* |
| НСТ- спонтанная, у.е | 0.39±0.01\* | 0.47±0.03\*,\*\* | 0.58±0.03\*,\*\* | 0.62±0.04\*,\*\* | 0.69±0.03\*,\*\* | 0.76±0.04\*,\*\* | 0.89±0.01  \*,\*\* |
| НСТ-индуцированная,  % | 58.13±1.41\* | 69.13±1.44\*,\*\* | 79.13±1.41\*,\*\* | 82.13±1.42\*,\*\* | 89.13±1.43\*,\*\* | 95.13±1.44\*,\*\* | 99.13±1.41  \*,\*\* |
| НСТ-индуцированная, у.е | 0.67±0.03\* | 0.79±0.01\*,\*\* | 0.88±0.02\*,\*\* | 0.91±0.02\*,\*\* | 0.94±0.03\*,\*\* | 0.96±0.01\*,\*\* | 0.98±0.03  \*,\*\* |
| Функциональный резерв нейтрофилов | 2.27±0.11\* | 1.65±0.10\*,\*\* | 1.79±0.11\*,\*\* | 1.79±0.13\*,\*\* | 1.41±0.12\*,\*\* | 1.10±0.14\*,\*\* | 1.02±0.11  \*,\*\* |
| Активность фагоцитоза,% | 54.85±1.21\* | 66.85±1.20\*,\*\* | 72.85±1.21\*,\*\* | 80.85±1.23\*,\*\* | 86.85±1.20\*,\*\* | 95.85±1.24\*,\*\* | 98.85±1.22  \*,\*\* |
| Интенсивность фагоцитоза | 1.78±0.09\* | 2.1±0.09\*,\*\* | 2.31±0.09\*,\*\* | 2.51±0.09\*,\*\* | 2.55±0.09\*,\*\* | 2.65±0.09\*,\*\* | 2.75±0.09  \*,\*\* |

Примечание: \*-достоверность различий показателей по отношению к неактивированным нейтрофилам, \*\*-достоверность различий показателей разных групп, использован критерий Мана-Уитни

Исследование in vitro различных параметров ЛО с постоянной генерацией импульса позволил выявить оптимальную дозу, при которой зарегистрировано максимальное усиление функциональной активность НГ. Такими параметрами являются доза излучения 1,1 Дж/см2, время экспозиции 12,5мин (20-кратное увеличение времени экспозиции от первоначального) (таблица2).

Анализ полученных результатов показал, что при импульсном режиме излучения доза, необходимая для максимальной активации клетки (0,056Дж\см2) ниже значений, позволяющей достичь аналогичного эффекта при ЛО с постоянной генерацией импульса (1,1Дж\см2). Тем не менее, изменения функциональной активности клеток имели одинаковую динамику, направленную в сторону усиления активности нейтрофила, независимо от режима следования импульса. Результаты наших исследований коррелируют с мнением И.И. Горяйнова (Горяйнов И.И.,1998), о том, что действие кванта света на разных режимах излучения имеет сходное биостимулирующее действие на клетку, т. е истинная природа фотоакцепторов квантов света оказывается не имеющей решающего значения, ибо их количество и многообразие вполне может уравнивать (усреднять) вторичные эффекты лазерных воздействий.

Наиболее значительные изменения зарегистрированы нами при анализе влияния НИЛИ с переменной и постоянной генерацией импульса на процессы внутриклеточной бактерицидности НГ. Можно предположить, что это данный процесс связан со стимуляцией лазерным излучением активности, локализованных в гранулах цитоплазмы НГ ферментов гексозомонофосфатного шунта, в частности НАДФ•H-оксидазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, отвечающей за редукцию НСТ (Маянский А.Н., 2006).

Для изучения правильности нашего предположения проведено измерение активности фермента НАДФ•Н-оксидазы, которой принадлежит ключевая роль в развитии респираторного взрыва, поскольку данный фермент осуществляет транспорт электронов от НАДФ цитозоля к молекулярному кислороду, а НИЛИ может являться физическим стимулятором выработки данного фермента (таблица 3).

Результаты исследований подтверждают наше предположение о том, что НИЛИ стимулирует выработку локализованных в гранулах цитоплазмы нейтрофилов фермента - НАДФ•Н оксидазы, поскольку нами зарегистрировано достоверное усиление выработки данного фермента более выраженное при облучении взвеси НГ с лазером с переменной генерацией импульса при дозе излучения 0,56 Дж/см2

Таблица 3

Влияние лазерного излучения с постоянной и переменной генерацией импульса на выработку НАДФН-оксидазы нейтрофилами, выделенными из крови доноров (М±m)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Доза лазерного  излучения  Дж\см2 | Скорость НАДФН-оксидазной реакции пмоль/мин х106клеток | | |
| Неактивированные  нейтрофилы | Нейтрофилы, активированные ЛО с постоянной  генерацией  импульса | Нейтрофилы, активированные ЛО с переменной генерацией  импульса |
| 0,018 | 1.03±0.16 | 1.93±0.18  \*,\*\*\* | 2.13±0.12  \*,\*\* |
| 0,036 | 1.80±0.11 | 2.81±0.11  \*,\*\*\* | 3.08±0.21  \*,\*\* |
| 0,072 | 2.72±0.25 | 3.75±0.25  \*,\*\*\* | 4.07±0.15  \*,\*\* |
| 0,14 | 3.01±0.31 | 3.79±0.31  \*,\*\*\* | 4.17±0.30  \*,\*\* |
| 0,28 | 4.11±0.15 | 5.31±0.15  \*,\*\*\* | 5.99±0.10  \*,\*\* |
| 0,56 | 4.51±0.13 | 5.29±0.23  \*,\*\*\* | 6.21±0.19  \*,\*\* |
| 1,1 | 4.61±0.33 | 5.91±0.13  \*,\*\*\* | 6.95±0.10  \*,\*\* |

Примечание: \*-достоверность различий показателей по отношению к неактивированным нейтрофилам, \*\*-достоверность различий показателей по отношению к НГ, облучёнными с постоянной генерацией импульса, \*\*\*- достоверность различий показателей по отношению к НГ, облучёнными с переменной генерацией импульса С учетом поправки Бонферрони критический уровень р составил 0,003. U-критерий Мана- Уитни.

Для изучения секреторной функции нейтрофилов был проанализирован цитокиновый состав (таблица 4), содержание высокомолекулярных пептидов-дефенсинов и бактерицидного протеина BPI (таблица 5), биохимический состав супернатантов нейтрофилов (таблица 6). В результате проведённых исследований нами было выявлено, что нейтрофилы, полученные из периферической крови доноров и инкубированные в термостате в течение 30 мин. при температуре 37ºС в растворе Хенкса выделяют глюкозу, метаболиты азота, ионы кальция, магния, ИЛ-1α, ИЛ-1β, РАИЛ1, ИЛ-8, ФНО-α. Появление этих продуктов в супернатантах неактивированных нейтрофилов обусловлено, возможно, секреторной дегрануляцией клеток, происходящей при инкубации нейтрофилов не в физиологических условиях in vitro. Поэтому термин «неактивированные нейтрофилы» мы можем принимать лишь условно, как выделенные без индуктора секреции клеток, т.е. без лазерного излучения. Уровни изучаемых цитокинов в супернатантах неактивированных нейтрофилов доноров достоверно отличались от содержания в секреторных продуктах, выделенных после активации нейтрофилов лазерным излучением с постоянной и переменной генерацией импульса. Эти изменения имели однонаправленный характер, степень выраженности которых была различной.

Таблица 4

Содержание цитокинов в супернатантах нейтрофилов неактивированных и активированных лазерным излучением с постоянной и переменной генерацией импульса (М±m)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Цитокины | Супернатанты  неактивированных  нейтрофилов | Параметры излучения | |
| Супернатанты  нейтрофилов  активированные  ЛО с постоянной  генерацией  импульса | Супернатанты  нейтрофилов  активированных  ЛО с переменной  генерацией  импульса |
| ИЛ-1α, пг/мл | 51.42±0.29 | 59.83±0.54  \*, \*\*\* | 62.43±4.41  \*,\*\* |
| ИЛ-1β, пг/мл | 14.28±0.12 | 20.36±0.87  \* ,\*\*\* | 24.47±12.21  \*, \*\* |
| РАИЛ-1,пг/мл | 99.36±2.42 | 99.67±1.92 | 100.98±2.10  \* |
| ИЛ-8, пг/мл | 44.48±1.39 | 69.8±1.88  \*, \*\*\* | 136.8±21.71  \*, \*\* |
| ФНО -α, пг/мл | 2.21±0.45 | 4.24±0.75  \*, \*\*\* | 6.31±0.33  \*, \*\* |

Примечание: \*-достоверность различий показателей по отношению к неактивированным нейтрофилам, \*\*-достоверность различий показателей по отношению к НГ, облучённых лазером с постоянной генерацией импульса, \*\*\*- достоверность различий показателей по отношению к НГ, облучённых лазером с переменной генерацией импульса С учетом поправки Бонферрони критический уровень р составил 0,003. U-критерий Мана- Уитни.

Анализ цитокинового состава показал достоверно более высокое содержание провоспалительных цитокинов ИЛ-1α, ИЛ-1β, РАИЛ1, ИЛ-8, ФНО-α в супернатантах нейтрофилов крови доноров, облучённых лазером с переменной генерацией импульса (таблица 4). Возможно, данный вид излучений является стимулирующим фактором, приводящим к достоверно, по сравнению с неактивированными и активированными НИЛИ с постоянной генерацией импульса НГ доноров более выраженной секреции преформированных цитокинов. Помимо этого, в секреторных продуктах нейтрофилов были обнаружены высокомолекулярные пептиды, обладающие иммунотропной активностью-дефенсины и бактерицидный/индуцированный протеин BPI (таблица 5).

Таблица 5

Содержание дефенсинов и белка BPI в супернатантах нейтрофилов неактивированных и активированных лазерным излучением с постоянной и переменной генерацией импульса (М±m)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Пептидные продукты нейтрофилов | Супернатанты  неактивированных  нейтрофилов | Параметры излучения | |
| Супернатанты  нейтрофилов  активированные  ЛО с постоянной  генерацией  импульса | Супернатанты  нейтрофилов  активированных  ЛО с переменной  генерацией  импульса |
| Дефенсины, пг/мл | 4.47±0.95 | 4.78±0.59  \*, \*\*\* | 6.47±0.45  \*,\*\* |
| BPI, пг/мл | 0.67±0.20 | 0.75±0.22  \*, \*\*\* | 0.99±0.33  \*,\*\* |

Примечание: \*-достоверность различий показателей по отношению к неактивированным нейтрофилам, \*\*-достоверность различий показателей по отношению к НГ, облучённых лазером с постоянной генерацией импульса, \*\*\*- достоверность различий показателей по отношению к НГ, облучённых лазером с переменной генерацией импульса С учетом поправки Бонферрони критический уровень р составил 0,003. U-критерий Мана- Уитни.

Результаты исследования биохимического состава секреторных продуктов неактивированных и стимулированных лазерным излучением нейтрофилов показали следующее (таблица 6). Продукты метаболизма оксида азота (NO) присутствовали как в супернатантах нейтрофилов интактных, так активированных ЛО НГ. Содержание метаболитов азота в супернатантах облучённых лазером нейтрофилов увеличилось в 3,7 раза по сравнению с содержанием продуктов метаболизма оксида азота с супернатантах интактных НГ. Более чем на 50% увеличилось содержание нитратов и нитритов в секреторных продуктах нейтрофилов, облучённых лазером низкой интенсивности.

Таблица 6

Биохимический состав в супернатантах нейтрофилов неактивированных и активированных лазерным излучением с постоянной и переменной генерацией импульса

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Компоненты | Супернатанты  неактивированных  нейтрофилов | Параметры излучения | |
| Супернатанты  нейтрофилов  активированные  ЛО с постоянной  генерацией импульса | Супернатанты  нейтрофилов  активированных  ЛО с переменной  генерацией импульса |
| Нитраты, мкмоль/л | 15.21±3.43 | 31.11±7,23  \*, \*\*\* | 39.19±7,26  \*,\*\* |
| Нитриты, мкмоль/л | 43.1±5.17 | 82.38±22,83  \*, \*\*\* | 99.38±22.11  \*,\*\* |
| Общее содержание метаболитов оксида азота, мкмоль/л | 28.31±8.35 | 137.91±35,24  \*, \*\*\* | 166.9±34.29  \*,\*\* |
| Са2+ моль/л | 0.22±0.01 | 0.52±0.02  \*, \*\*\* | 0.70±0.04  \*,\*\* |
| Мg, 2+ моль/л | 0.98±0.02 | 0.58±0,04  \*, \*\*\* | 0.48±0.03  \*,\*\* |
| Общее содержание глюкозы мкмоль/л | 4.95±0,05 | 3.25±0.05  \*, \*\*\* | 2.01±0.02  \*,\*\* |

Примечание: \*-достоверность различий показателей по отношению к неактивированным нейтрофилам, \*\*-достоверность различий показателей по отношению к НГ, облучённых лазером с постоянной генерацией импульса, \*\*\*- достоверность различий показателей по отношению к НГ, облучённых лазером с переменной генерацией импульса С учетом поправки Бонферрони критический уровень р составил 0,003. U-критерий Мана- Уитни.

Возможно, повышение содержания NO при воздействии НИЛИ происходит за счёт усиления окислительно-восстановительных процессов, в том числе ускорения реакции окисления аргинина ферментом NO-синтазой, результатом которой и является образование оксида азота (Артюхов В.Г., 2005). Выделяющийся в межклеточное пространство NO является реакционно-способным соединением с широким спектром биологического, в том числе, бактерицидного действия (Захарова М.А., 2003).

При изучении содержания глюкозы в супернатантах неактивированных и активированных нейтрофилов доноров было отмечено, что в ответ на стимуляцию гранулоцитов лазером низкой интенсивности уровень глюкозы достоверно снижается (р<0,003, р=0,00023) с 4,95 до 2,01 мкмоль/л, возможно, такой расход глюкозы, являющейся ключевым метаболитом биохимических процессов возможен вследствие повышения энергетических затрат клетки при её стимуляции лазерным излучением (Бережная Н.М., 1998; Маянский А.Н. и соавт., 1989).

Активация нейтрофилов лазером низкой интенсивности с постоянной генерацией импульса выявила рост уровня секреции ионов Са2+, в супернатантах нейтрофилов более чем в 3 раза по сравнению с неактивированными нейтрофилами доноров. Возможной причиной увеличения концентрации ионов Са2+, после стимуляции НГ лазерным излучением является быстрый выход из органел- кальциосом в цитозоль большого количества ионов Са2+, в результате чего мы наблюдаем рост в супернатантах ионов кальция (Glossman H., 1999). Зарегистрированное снижение концентрации ионов Мg2+ возможно, происходят в результате его расходования на процессы активации процессов метаболизма, а именно катаболизма в клетке (Эллиот В., 2000). Сравнительный анализ биохимического, цитокинового состава супернатантов нейтрофилов облучённых лазерным излучением с постоянной и переменной генерацией импульса показал, что, несмотря на различный количественный состав секреторных продуктов, полученных в результате активации клетки лазерным излучением с постоянной и переменной генерацией импульса, данные изменения имели однонаправленный характер.

Наиболее значимые изменения показателей зарегистрированы при воздействии лазером с переменной генерацией импульса. Полученные нами данные о составе супернатантов нестимулированных и стимулированных нейтрофилов, в целом, совпадают с результатами исследования А.В. Чукичева (1996), И.Е.Третьяковой (2003). Зарегистрированное нами усиление функциональных возможностей нейтрофилов и продуктов их секреции с учётом биоэффективных доз воздействия лазерным излучением низкой интенсивности послужило основанием для проведения объективного исследования иммунотропных эффектов воздействий лазерного излучения низкой интенсивности в практике.

Этап исследования иммунотропных эффектов лазеров низкой интенсивности in vivo

На современном этапе возможны 2 пути реализации эффектов действия лазеров низкой интенсивности: эффекты, обусловленные их локальным и системным применением в терапевтических целях. Исходя из возможностей применения лазеров красного спектра излучения в терапевтической практике, представляло огромный интерес изучение их возможностей для устранения иммунологических дисфункций. В связи с вышеизложенными обстоятельствами, следующим этапом наших исследований стало изучение влияния лазерного излучения на клеточные и гуморальные факторы системного иммунитета, состояние нитроксидергической системы, липидного профиля периферической крови при проведении внутрисосудистого лазерного облучения крови (ВЛОК) у женщин с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта.

У пациенток с воспалительными заболеваниями нижнего отдела репродуктивного тракта, вызванными хламидиями были выявлены сдвиги во всех изучаемых звеньях иммунной системы, характерные для хронического воспалительного процесса: лейкоцитоз, нейтрофилия с уменьшением абсолютного количества нейтрофилов, лимфоцитоз с изменением субпопуляционного состава, выраженном в снижении процента лейкоцитов, несущих CD3, СD 4, СD 16; СD 20 рецепторы, повышении CD8+лимфоцитов, снижения СD 95+клеток, иммнорегуляторного индекса (СD 4+/CD8+), активности нейтрофилов по НСТ-тесту угнетения фагоцитарной функции и функционального резерва нейтрофилов, усилении лизосомальной активности, повышении концентрации Ig A, Ig М, Ig G в сыворотке крови, снижения уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), содержания С1-С3 компонентов комплемента, СН 50, уровня ИЛ-1α, ИЛ-1β, ФНО-α, ИФН-γ, дефенсинов, бактерицидного протеина BPI, при повышении концентрации ИЛ-8. В соответствии с рекомендациями лечению урогенитального хламидиоза внутрисосудистое лазерное облучение крови (ВЛОК) может быть использовано в комплексе лечебных мероприятий.

Нами проведена оценка эффективности использования ВЛОК для коррекции выявленных иммунологических дисфункций. Исследование иммунологических показателей крови проведено до начала терапии и на следующий день после её завершения базисной терапии. Контрольную группу составили здоровые женщины без хламидийной инфекции нижнего отдела репродуктивного тракта (таблица 7).

Таблица 7

Иммунологические показатели периферической крови у женщин с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта до и после терапии с применением ВЛОК

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатели | Здоровые  женщины | До  лечения | Женщины с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта | |
| Базисная  терапия | Базисная  терапия+ ВЛОК |
| Количество лейкоцитов,×109/ л | 5.59 ± 0.10 | 9.01 ± 0.30  \* | 8.91 ± 0,22  \*,\*\*\*\* | 6.01 ± 0.12  \*,\*\*\* |
| Количество лимфоцитов,% | 29.21 ± 1.02 | 35.61 ± 1,10  \* | 38.51 ± 1,02  \*,\*\*\*\* | 39.51 ± 1,07  \*\*,\*\*\* |
| Количество лимфоцитов,×109/л | 1.94 ± 0,12 | 2,13 ± 0,16  \* | 2.19 ± 0,12  \*,\*\*\*\* | 1.98 ± 0,12  \*\*,\*\*\* |
| Количество нейтрофилов,% | 68.90 ± 1,13 | 52.90 ± 1.11  \* | 61.90 ± 1.12  \*,\*\*\*\* | 69.90 ± 1.09  \*\*,\*\*\* |
| Количество нейтрофилов,×109/л | 3.78 ± 0,25 | 2,26 ± 0,15  \* | 3.44 ± 0.25  \*,\*\*\*\* | 3.84 ± 0,25  \*\*,\*\*\* |
| Лизосомальная активность нейтрофилов, % | 91.55 ± 1,12 | 97.52 ± 1.10  \* | 95.52 ± 1.16  \*,\*\*\*\* | 92.50 ± 1.14  \*\*,\*\*\* |
| Лизосомальная активность нейтрофилов, у.е. | 324.0 ±15,01 | 349.05 ±19,10  \* | 371.10 ±16,03  \*,\*\*,\*\*\*\* | 321.09 ± 15,01  \*\*,\*\*\* |
| НСТ–тест спонтанный, % | 46.91 ± 1.72 | 37.9 ± 1.94  \* | 42.9 ± 1.23  \*,\*\*\*\* | 47.91± 1.72  \*\*,\*\*\* |
| НСТ–тест спонтанный, у.е. | 0.58 ± 0.05 | 0.50 ± 0,03  \* | 0.54 ± 0,02  \*,\*\*\*\* | 0.59 ± 0.05  \*\*,\*\*\* |
| НСТ–тест активированный, % | 57.44 ± 1.23 | 50.41 ± 1.77  \* | 53.41 ± 1,75  \*,\*\*\*\* | 58.44 ± 1.22  \*\*,\*\*\* |
| НСТ–тест активированный, у.е. | 0.83 ± 0.04 | 0.68 ± 0.03  \* | 0.78 ± 0.02  \*,\*\*\*\* | 0.88 ± 0.04  \*\*,\*\*\* |
| ФРН | 1.94± 0.46 | 1.70 ± 0,41  \* | 1.86 ± 0,42  \*,\*\*\*\* | 1.98± 0.46  \*\*,\*\*\* |
| Активность фагоцитоза нейтрофилов, % | 46.51 ± 1.24 | 35.51 ± 1.22  \* | 42,51 ± 1,26  \*,\*\*,\*\*\*\* | 47.51 ± 1,20  \*\*,\*\*\* |
| Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов, у.е. | 1.72± 0,06 | 1.52 ± 0,08  \* | 1.62 ± 0,07  \*,\*\*\*\* | 1.84± 0,06  \*\*,\*\*\* |
| СD3, % | 27.92 ± 1,94 | 18.12 ± 1.94  \* | 24.12 ± 1.94  \*,\*\*\*\* | 28.12 ± 1.94  \*\*,\*\*\* |
| СD3, абс. | 0.50 ± 0,08 | 0.45 ± 0.08  \* | 0,42 ± 0,01  \*,\*\*\*\* | 0,53 ± 0.08  \*\*,\*\*\* |
| СD4, % | 30.81 ± 1,22 | 21.89 ± 1.73  \* | 29,19 ± 1,13  \*,\*\*,\*\*\*\* | 31,81 ± 1.22  \*\*,\*\*\* |
| СD4, абс. | 0.45 ± 0,02 | 0.37 ± 0,06  \* | 0.43 ± 0,06  \*,\*\*\*\* | 0,47 ± 0,02  \*\*,\*\*\* |
| СD8, % | 21.14 ± 1,16 | 24.14 ± 1,23  \* | 21.14 ± 1,20  \*,\*\*\*\* | 22,14 ± 1,16  \*\*,\*\*\* |
| СD8, абс. | 0.41 ± 0,02 | 0,44 ± 0,05  \* | 0.42 ± 0,01  \*,\*\*\*\* | 0,41 ± 0,02  \*\*,\*\*\* |
| СD4/СD8 | 1,95 ± 0,06 | 0.97 ± 0,06  \* | 1.19 ± 0,08  \*,\*\*\*\* | 1,97 ± 0,06  \*,\*\*\* |
| СD16, % | 13.68 ± 0,27 | 12.03 ± 0,70  \* | 13.63 ± 0,17  \*,\*\*\*\* | 13,88 ± 0,27  \*\*,\*\*\* |
| СD16, абс. | 0.21 ± 0,05 | 0,22 ± 0,03  \* | 0.24 ± 0,01  \*,\*\*\*\* | 0,23 ± 0,05  \*\*,\*\*\* |
| СD20, % | 13,86 ± 0,88 | 10.61 ± 0,79  \* | 11,81 ± 0,99  \*,\*\*\*\* | 13.92 ± 0.88  \*\*,\*\*\* |
| СD20, абс. | 0.22 ± 0,03 | 0,19 ± 0,03  \* | 0,21 ± 0,23  \*,\*\*\*\* | 0.22 ± 0.03  \*\*,\*\*\* |
| СD95, % | 21.69 ± 1,98 | 14,69 ± 2,10  \* | 17.69 ± 2,16  \*,\*\*,\*\*\*\* | 22,69 ± 1.98  \*\*,\*\*\* |
| СD95, абс. | 0.34 ± 0,06 | 0,28 ± 0,06  \* | 0.33 ± 0,06  \*,\*\*\*\* | 0.35 ± 0.06  \*,\*\*\* |
| С1, эф.мол /мл | 99.93±6.01 | 91.2±8.01  \* | 90.2±7.01  \*,\*\*\*\* | 100.21±6.06  \*\*,\*\*\* |
| С2, эф.мол /мл | 84.40±4.46 | 83.99±4.53  \* | 83.21±4.50  \*,\*\*\*\* | 84.42±4.42  \*\*,\*\*\* |
| С3, эф.мол /мл | 96.81±3.12 | 88.8±3.62  \* | 82.11±2.41  \*,\*\*\*\* | 96.8±3.12  \*\*,\*\*\* |
| С4, эф.мол /мл | 80.21±3.34 | 78.2±3.81  \* | 72.22±3.54  \*,\*\*\*\* | 80.2±3.34  \*\*,\*\*\* |
| С5, эф.мол /мл | 88.52±4.25 | 87.5±3.11  \* | 86.52±2.6  \*,\*\*\*\* | 88.5±4.25  \*\*,\*\*\* |
| СН-50, у.е. | 63.22±6.15 | 69.22±6.62  \* | 56.22±7.61  \*,\*\*\*\* | 63±6.15  \*\*,\*\*\* |
| ЦИК | 69.44±9.46 | 39±8.44  \* | 49.13±8.03  \*,\*\*\*\* | 69±9.46  \*\*,\*\*\* |
| Ig А, г/л | 2.32 ± 0,12 | 2.80 ± 0,09  \* | 2.49 ± 0.10  \*,\*\*\*\* | 2,92 ± 0,12  \*\*,\*\*\* |
| Ig М, г/л | 1.19 ± 0.14 | 1.23 ± 0,08  \* | 1.10 ± 0.11  \*,\*\*\*\* | 1,19 ± 0.14  \*\*,\*\*\* |
| Ig G, г/л | 9.16 ± 0.29 | 9.51 ± 0,38  \* | 9.36 ± 0.25  \*,\*\*\*\* | 9,16 ± 0.29  \*\*,\*\*\* |

Примечание: В таблице приведены различия между сравниваемыми группами. \*- достоверность различий показателей по отношению к показателям здоровых женщин\*\*- достоверность различий показателей по отношению к показателям женщин до лечения\*\*\*- достоверность различий показателей по отношению к показателям женщин, пролеченных по базисной схеме\*\*\*\*- достоверность различий показателей по отношению к показателям женщин, пролеченных по схеме базисная терапия + ВЛОК

Результаты исследований показали, что применение ВЛОК в комплексе с базисной терапией приводило к нормализации исследуемых показателей на момент окончания лечения, чего не происходило при использовании только базисной схемы. К моменту завершения лечения с применением ВЛОК зарегистрировано: восстановление количественного и субпопуляционного состава лейкоцитов, нормализации межклеточных взаимоотношений субпопуляций Т-лимфоцитов, что приводило к увеличению количества иммунокомпетентных клеток в крови, нормализация роста поглотительной способности нейтрофилов по тесту с латексом, восстановление биоцидной функции этих клеток по НСТ-тесту, функционального резерва, лизосомальной активности, содержания в сыворотке крови IgA, Ig М, Ig G, ЦИК.

Дисбаланс системы цитокинов, дефенсинов сыворотки крови женщин с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта, выраженный в снижении содержания ИЛ-1β, ИЛ-1α, ИФН-γ, повышении ИЛ-8 в процессе комплексной терапии с применением ВЛОК был ликвидирован полностью, однако при использовании только базисного способа лечения дисфункции в продукции цитокинов и дефенсинов устранены не были (таблица 8).

Таблица 8

Содержание цитокинов, дефенсинов в сыворотке крови у женщин хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта до и после терапии с применением ВЛОК

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатели | Здоровые  женщины | До  лечения | Женщины с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта | |
| Базисная  терапия | Базисная  терапия+ ВЛОК |
| ИЛ-1β, пг/мл | 29.90±3.41 | 16.93±3.62  \* | 23.96±1.33  \*,\*\*\*\* | 27.91±3.12  \*\*,\*\*\* |
| ИЛ-1α, пг/мл | 45.61±4.56 | 35.63±3.95  \* | 40.64±2.53  \*,\*\*,\*\*\*\* | 50.63±4.51  \*\*,\*\*\* |
| РАИЛ-1, пг/мл | 24.49±6.64 | 29.64±6.69  \* | 26.44±4.34  \*,\*\*\*\* | 25.48±3.69  \*\*,\*\*\* |
| ИЛ-8, пг/мл | 26.36±4.24 | 96.66±4.41  \* | 76.13±2.33  \*,\*\*\*\* | 27.41±6.52  \*\*,\*\*\* |
| ИФН-γ, пг/мл | 0.90±0.12 | 0.38±0.13  \* | 0.66±0.11  \*,\*\*,\*\*\*\* | 0.93±0.14  \*\*,\*\*\* |
| Дефенсины, нг/мл | 4.47±0.95 | 2.78±0.55  \* | 4.98±0.35  \*,\*\*\*\* | 6.47±0.25  \*\*,\*\*\* |
| BPI, нг/мл | 0.97±0.32 | 0.55±0.25  \* | 0.52±0.24  \*,\*\*\*\* | 0.79±0.31  \*\*,\*\*\* |

Сравнительный анализ динамики иммунологических показателей женщин леченых по базисной схеме, и с применением ВЛОК показал, однонаправленный характер изменений их значений при данных способах терапии, направленных в сторону восстановления показателей, однако степень нормализации данных факторов была более выраженной в группе пациенток, получавших комплексную терапию с применением ВЛОК.

После установленного иммуномодулирующего влияния внутрисосудистой лазеротерапии на показатели системного иммунитета было интересно изучить содержание оксида азота сыворотки крови женщин с хламидийной инфекцией и установить влияние внутрисосудистой лазеротерапии на их динамику (рисунок 1)

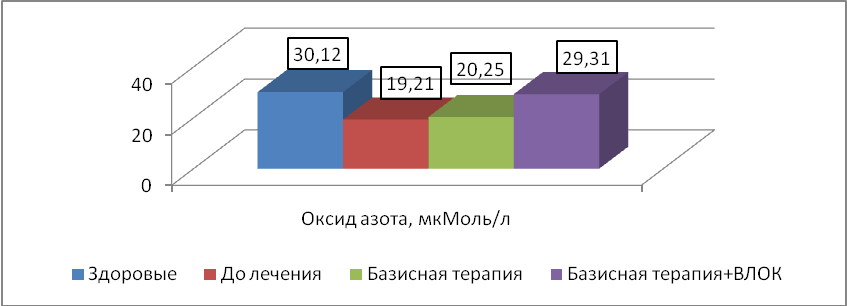


Рисунок 1

Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на продукцию оксида азота сыворотки крови женщин с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта до и после внутрисосудистой лазеротерапии

Одним из приоритетных направлений стало определение оксида азота в сыворотке крови, поскольку (-NO) –природный свободный радикал, выполняющий в организме несколько функций, две из которых особенно важны для понимания системного действия лазерного излучения. Во-первых, NO-предшественник, выделяемого клетками эндотелия стенок кровеносных сосудов фактора расслабления (EDRF- Endothelium Derivated Relaxity Factor), фактора вызывающего вазодилатацию микрососудов, что и определяет, по-видимому, появление различных положительных эффектов лазерного излучения. Во–вторых, NO выделяется фагоцитами и выполняет роль защитного средства против патогенов (Проскуряков С.Я.,2000). Учитывая значение NO в регуляции фагоцитарной активности, изучение его содержания под действие системной лазеротерапии даёт возможность расширить поиск возможностей немедикаментозной коррекции процессов фагоцитоза при локальных и системных воспалительных процессах.

Установлено, что средний уровень оксида азота, регистрируемый у пациенток с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта, оказался статистически достоверно ниже по сравнению с аналогичными показателями неинфицированных женщин, что согласуется с работами коллектива исследователей ЧелГМА по изучению нитроксидергических процессов при воспалительных заболеваниях урогенитального тракта. В частности, М.А. Захаровой с соавт. (2001г), было доказано достоверное снижение уровня оксида азота у женщин с ХИ органов малого таза. На наш взгляд изменение содержания NO может быть обусловлено значительным уменьшением пула аминокислоты L-аргинина, являющееся предшественником антипатогенной защиты при внедрении C. trachomatis в организм (Маеда Х.,1998; Проскуряков С.Я., 2000). К моменту завершения внутривенной лазеротерапии у пациенток с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта восстанавливались показатели нитроксидергической системы периферической крови. Возможно, повышение содержания NO в сыворотке крови при воздействии ВЛОК также происходит за счёт усиления окислительно-восстановительных процессов, в том числе ускорения реакции окисления аргинина гемсодержащим ферментом NO-синтазой, результатом которой и является образование оксида азота. Кроме того, фермент NO-синтаза экспрессируется под воздействием ФНО-α, и зарегистрированное нами повышение его содержания, возможно, косвенно способствовало, ускорению синтеза этого фермента и, соответственно, влияло на процесс усиления выработки оксида азота при ВЛОК.

Поскольку имеющиеся единичные работы содержат разноречивую информацию о влиянии ВЛОК на липидный обмен представлялось важным изучить липидный профиль женщин с хламидйной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта и оценить возможность коррекции липидотранспортных дисфункций с помощью внутривенной лазеротерапии (Шилин Д.Е., 2003; Кутлубаева Э.Р., 2008). Для определения показателей липидного спектра плазмы крови у больных венозную кровь забирали в одноразовые пробирки до и после курса терапии (в утренние часы натощак).

Результаты липидного профиля женщин с инфекционно воспалительными заболеваниями урогенитального тракта, вызванными хламидиями, представлены в таблице 9.

Таблица 9

Показатели периферической крови у женщин с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта до и после терапии с применением внутрисосудистой лазеротерапии

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатели | Здоровые  женщины | До лечения | Женщины с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта | |
| Базисная терапия | Базисная  терапия+ ВЛОК |
| Холестерин, мМоль/л | 4.75±0,05 | 4.81±0.05  \* | 4.63±0.05  \*,\*\*\*\* | 4.85±0,05  \*,\*\*,\*\*\* |
| Триглицериды, мМоль\л | 0.96±0,02 | 0.95±0.02  \* | 0.93±0,02  \*,\*\*\*\* | 0.96±0,02  \*,\*\*\* |
| Хс ЛПВН, мМоль/л | 1.34±0,04 | 1.37±0.04  \* | 1.33±0,04  \*,\*\*\*\* | 1,36±0,04  \*,\*\*,\*\*\* |
| ХсЛПНП, мМоль/л | 2.68±0,05 | 2.75±0.05  \* | 2.73±0,05  \*,\*\*\*\* | 2.69±0,05  \*,\*\*\* |
| ЛПОНП,мМоль/л | 0.42±0,01 | 0.43±0.01  \* | 0.33±0,01  \*,\*\*\*\* | 0.43±0,01  \*,\*\*,\*\*\* |
| ЛПНП+ЛПОНП,г/л | 2.88±0,01 | 3.01±0.01  \* | 2.21±0,01  \*,\*\*\*\* | 2.98±0,01  \*,\*\*,\*\*\* |
| К-атерогенности | 2.24±0,03 | 2.26± 0.05  \* | 2.28±0,05  \*,\*\*\*\* | 2.25±0,03  \*,\*\*,\*\*\* |

Примечание: В таблице приведены различия между сравниваемыми группами. \*- достоверность различий показателей по отношению к показателям здоровых женщин\*\*- достоверность различий показателей по отношению к показателям женщин до лечения\*\*\*- достоверность различий показателей по отношению к показателям женщин, пролеченных по базисной схеме\*\*\*\*- достоверность различий показателей по отношению к показателям женщин, пролеченных по схеме базисная терапия + ВЛОК

Как видно из данных, представленных в таблице 9, внутрисосудистое лазерное облучение крови стимулирует образование качественных и количественных сдвигов в спектре липидов сыворотки крови, включающей нормализацию уровня холестерина, повышению Хс ЛПВН (на10%), снижению ХсЛПНП (на 8%), ЛПОНП (на 11%) (р<0,003, р=0,0012). Рост доли фосфолипидов, важнейших структурно-функциональных компонентов клеточных мембран, точнее, восполнение его фонда, следует отнести к позитивным фотоиндуцированным изменениям приспособительного и компенсаторного характера. Возможно, при внутривенном действии НИЛИ лазерное излучение подавляет накопление свободных жирных кислот, обладающих мембранно-деструктивным действием, что может приводить к активизации биосинтетических процессов, приводящих к увеличению содержания суммарных фосфолипидов. В этой связи становиться очевидным, что лазерное излучение, способствуя нормализации липидного обмена, стимулирует сдвиги в спектре липидов, которые сопряжены с изменениями физико-химического потенциала биомембран, и, вероятно, носят приспособительный характер, позволяющий частично нивелировать негативные последствия, вызванные понижением суммарного уровня фосфолипидов сыворотки крови. Динамика изменения содержания различных липидов в сыворотке крови является отражением высокой активности фосфолипаз и фотоиндуцированном запуске гидролитических процессов в сыворотке крови. Данный процесс биохимических изменений, в том числе изменение уровня холестерина, косвенно, как свидетельствуют литературные источники, среди прочих причин может влиять на агрегационную способность тромбоцитов, способствуя её нормализации (Борисенко К.К., 1998; Брагина Е.Е., 2000; Мортон Н.С., 2000). Полученные в исследовании результаты свидетельствуют о положительном влиянии НИЛИ на показатели липидного спектра сыворотки крови и позволяют рассматривать внутрисосудистое облучение крови как эффективный метод в комплексном реабилитационном лечении больных с местными воспалительными реакциями.

Таким образом, данные представленные при анализе иммунологических и биохимических показателей до и после системной лазеротерапии показали возможность влияния данного вида излучений на отдельные этапы воспалительной реакции. Открытым остаётся вопрос о генерализации эффекта лазерного излучения при внутрисосудистом облучении крови. На наш взгляд генерализацию эффектов ВЛОК можно объяснить с позиции «тригерных» воздействий. Пусковой или «тригерный» эффект, по нашему мнению, происходит, в основном, за счёт передачи воздействий через жидкие среды биообъекта, в нашем случае кровь, а также за счёт передачи энергии в клетке в виде АТФ при фоторегуляции и поглощении фотоакцепторами НГ квантов света. Суть концепции генерализации эффектов ЛО заключается в следующем: энергия низкоинтенсивных лазеров мала для адаптационной реакции всего организма, поэтому при ВЛОК активизируются процессы местной или клеточной саморегуляции, которые и становятся «триггером» для запуска адаптивных реакций всего организма.

Нормализация иммунологических и биохимических показателей под влиянием системной инвазивной лазеротерапии даёт основания для проведения исследований по оценке локального, неинвазивного применения лазера низкой интенсивности с постоянной и переменной генерацией импульса для коррекции дисфункций факторов мукозального иммунитета женщин с воспалительными заболеваниями нижнего отдела репродуктивного тракта, вызванных хламидиями. В соответствии с поставленной задачей был проведён сравнительный анализ динамики иммунологических факторов цервикального секрета при терапевтическом, локальном воздействии in vivo лазерным излучением с учётом биоэффективных параметров воздействия. Облучение воспалительного очага проводилось с помощью терапевтического аппарата «МУСТАНГ-2000», генерирующего лазерное излучение с постоянной и переменной генерацией импульса в соответствии с требованиями Роспотребнадзора РФ в сочетании с базисной терапией урогенитального хламидиоза на основании «Методических рекомендаций по диагностике и лечению заболеваний, передающихся половым путём» (ЦНИИКВИ, г. Москва, 2007).

Получение представления о роли нейтрофилов и факторов мукозального иммунитета при воспалительном процессе нижнего отдела репродуктивного тракта возможно при проведении исследования непосредственно из очага воспалительной реакции- шейки матки, месте наибольшей иммунологической активности нижнего отдела репродуктивного тракта и частой локализации C. trachomatis (Рюмин Д.В., 1999; Телешева Л.Ф., 2000).

У женщин с урогенитальным хламидиозом выявлена дисфункция клеточных факторов местной противоинфекционной защиты выраженная в увеличении количества лейкоцитов в цервикальном секрете, повышении процента жизнеспособных нейтрофилов, усилении лизосомальной активности, кислородозависимого метаболизма по НСТ-тесту, снижении функционального резерва нейтрофилов, угнетении активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофильных гранулоцитов цервикальной слизи.

Выявленный дисбаланс в состоянии клеточных факторов местной антимикробной защиты может служить основанием для включения в комплексную терапию хламидийной инфекции локального воздействия лазерным излучением низкой интенсивности с постоянной и переменной генерацией импульса, как возможного средства повышения местной неспецифической защиты при воспалительных заболеваниях нижнего отдела репродуктивного тракта, в том числе, вызванных хламидиями (Брагина Е.Е.,2001; Стругацкий В.М., 2002).

Теоретическими предпосылками к использованию предложенного метода послужили работы, выполненные в Челябинском государственном институте лазерной хирургии Южно-уральского научного центра РАМН (2000-2006) и разработки Государственного научного центра лазерной медицины при президенте РФ МЗ РФ г. Москва (2000), которые свидетельствуют о влиянии лазерного изучения на все составляющие патологического процесса (органный, тканевой, клеточный) и способности физических факторов усиливать иммунные реакции на системном и локальном уровнях.

Сравнительный анализ локального действия лазера с переменной и постоянной генерацией импульса выявил больший иммунологический эффект воздействий ЛО с переменной генерацией импульса. У больных, пролеченных лазером с постоянной генерацией импульса, определялось снижение абсолютного и относительного количества нейтрофилов, их лизосомальной активности, интенсивности люминесценции лизосом нейтрофилов цервикального секрета, увеличение интенсивности спонтанного восстановления НСТ, нормализация функционального резерва этих клеток. У пациенток, пролеченных с использованием лазера с переменной генерацией импульса, помимо вышеуказанных изменений, определялось усиление поглотительных способностей и фагоцитарного числа нейтрофилов. К моменту завершения лечения с применением лазерного излучения с переменной генерацией импульса отмечено полное восстановление факторов колонизационной устойчивости цервикального секрета (таблица 10).

Таблица10

Состояние клеточных факторов цервикального секрета у женщин с хламидийной инфекцией при различных способах терапии.

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатели | Здоровые  n=80 | | Базис  n=100 | | Базис+ЛО с переменной генерацией импульса  n=106 | | Базис+ЛО с постоянной генерацией импульса  n=100 | |
| До лечения | После лечения | До лечения | После лечения | До лечения | После лечения |
| Лейкоциты, x109 /л | 6.47±0.40 | | 11.55±0,59\* | 9.23±0,27\* | 11.61±0,59\* | 6.38±0,30\*\*\* | 10.11 ± 0.37\* | 7.88±0.30\*,\*\*\* |
| Лейкоциты жизнеспособные, (абс.) x109 | 3.87±0.28 | | 7.41±0.34\* | 5.93±0,17\* | 7,61 ± 0,50\* | 3.92±0,24\*\*\* | 7.38 ± 0.30\* | 3,97±0,10\*\* |
| Лейкоциты жизнеспособные,% | 59.21±2.79 | | 62.43±1,55\* | 60,1±2,23\* | 63,52±1,70\* | 58.13±2.63\*\*\* | 64,42 ± 1,40\* | 60,9±2,60\*\* |
| Лизосомальная активность нейтрофилов, % | 18.24±1.42 | | 66.01±2,31\* | 30,6±1,12\*,\*\* | 66,10±2,39\* | 18.67±1.30\*\* | 65,97 ± 2,90\* | 30,54±1,40\*,\*\*^ |
| Лизосомальная активность нейтрофилов, у.е. | 29.42±2.56 | | 155.52±22,0\* | 45,43±2,12\*,\*\* | 145,51±22,01\* | 37.42±2.50\*\*\* | 147,52 ± 23.01\* | 29.80±2.33\*\*^ |
| Активность фагоцитоза  нейтрофилов, % | 53.44±1.71 | | 37.9±1,71\* | 47,12±1,74\* | 39,9±1,71\* | 52.21±1.74\*\*\* | 47,7 ± 1,06\* | 34,08±1,50\*,\*\*^ |
| Интенсивность фагоцитоза нейтрофилов | 2.25±0.16 | | 1.57±0.03\* | 1.99±0,74\* | 1.50±0.08\* | 2.29±1.12\*\*\* | 1.52 ± 1,97\* | 2.30±1.70\*\* |
| НСТ-тест спонтанный, % | | 28.72±1.42 | 49.33±2,01\* | 36,72±1,33\*,\*\* | 49,7±2,0\* | 29.72±1.40\*\*\* | 51,47 ± 1,11\* | 32,01±1,10\*\*^ |
| НСТ-тест спонтанный, у.е. | | 0.33±0.02 | 0.75±0.04\* | 0.37±0.02  \*,\*\* | 0.77±0.04\* | 0,35±0,02\*\*\* | 37,9 ± 1,52\* | 0,29±0,05\*,\*\*^ |
| НСТ-тест индуцированный, % | | 52.52±1.93 | 62.82±2,02\* | 54.22±1,90  \*,\*\* | 63.81±2.06\* | 53,52±1,90\*\*\* | 64,46 ± 1,07\* | 50,0±1,20\*\* |
| НСТ-тест индуцированный, у.е. | | 0.69±0.03 | 1,07±0,05\* | 0.75±0,04\*,\*\* | 1.09±0,05\* | 0.71±0,03\*\*\* | 1.12±0,05\* | 0.65±0.09\*\*\* |
| ФРН | | 2.10±0.16 | 1,39±0,10\* | 1.41±0,16\*,\*\* | 1.42±0,10\* | 2.17±0,16\*\*\* | 1.37±0,10\* | 1.97±0.16\*\*^ |

Примечание: сравнения между группами проведены по критерию Мана-Уитни;\*р<0,003 по отношению к показателям в группе здоровых

\*\*р<0,003 по отношению к показателям до лечения,\*\*\*р<0,003 по отношению к показателям группы Базис+ЛО с переменной генерацией импульса после лечения по отношению к группе женщин получивших базисную терапию^ р<0,003 -достоверность по отношению к показателям после лечения в группе Базис+ЛО с переменной генерацией импульса по отношению к показателям Базис+ЛО с постоянной генерацией импульса

Сопоставление динамики изменения иммунологических факторов при воздействии различных типов лазерного излучения, можно отметить следующее: после терапии с использованием НИЛИ с переменной генерацией импульса, были зарегистрированы более значимые изменения факторов врождённого иммунитета репродуктивного тракта по сравнению показателями, полученными после применения, как базисной терапии, так и терапии с применением НИЛИ с постоянной генерацией импульса. Достоверные позитивные изменения свойств НГ при лазерных воздействиях с различными режимами генерации импульса имели одинаковую направленность и заключались в усилении функционального ответа нейтрофилов цервикального секрета. Данные однонаправленные эффекты лазеротерапии мы можем объяснить включением однотипных процессов регуляции, на клеточном уровне, обеспечивающих адекватный ответ в пределах гомеостатического регулирования.

Основным результатом местного действия лазерных воздействий с постоянной и переменной генерацией импульса следует считать усиление функциональной активности нейтрофилов в воспалительном очаге, которое, по мнению А.Н. Маянского (1999) следует признать одним из интегральных показателей критериев действенности стимулирующей, в частности иммунопотенциирующей терапии.

Далее проводилось исследование гуморальных факторов местной противоинфекционной защиты женщин с хламидийной инфекцией нижнего отдела репродуктивного тракта, включающее в себя: оценку содержания в секрете ИЛ-1α, ИЛ-1β, РАИЛ1, ИЛ-8, ФНО-α, ИФН-γ, IgА, IgМ, IgG, компонентов комплемента С1-С5, содержания дефенсинов, метаболитов оксида азота (таблица 11).

В цервикальном секрете было зарегистрировано: повышение IgА, Ig G снижение уровня провоспалительных цитокинов, дефенсинов, BPI, повышение содержания ИЛ-8, снижении содержания С1-С5 компонентов комплемента цервикального секрета, СН50, возможно, связанное с тем, что присутствие патогена приводит к непрерывной активации системы комплемента (Holers V.M., 1996).

К моменту завершения терапии у пациенток зарегистрировано восстановление показателей IgА. При оценке концентрации Ig G в цервикальной слизи, установлено, что его уровень, повышенный до начала лечения 4.85 ± 0.78 г/л, полностью нормализовался

Таблица 11

Состояние гуморальных факторов цервикального секрета у женщин с хламидийной инфекции при различных способах терапии.

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Показатели | Здоровые | Базис | | Базис+ЛО с переменной генерацией импульса | | Базис+ЛО с постоянной генерацией импульса | |
| До лечения | После лечения | До лечения | После лечения | До лечения | После лечения |
| ИЛ-8, пг/мл | 40.39±1.10 | 110.38±3,37\* | 54.40±1.21\*,\*\* | 124.81±3.37\* | 34.47±1.19\*\*,\*\*\* | 127.22±3.30\* | 52.3±1.96\*,\*\*,^ |
| ИФН-γ,пг/мл | 0.30±0.03 | 0.12±0,01\* | 0.19±0,03\*,\* | 0.14±0,01\* | 0.39±0,02\*\*,\*\*\* | 0.13±0,001\* | 0.24±0,03\*\*^ |
| ИЛ-1α,пг/мл | 33.31±0.21 | 14.17±1.32\* | 22,81±2.21\*,\*\* | 14,16±1.52\* | 23.52±2.19\*\*,\*\*\* | 15.19±1.05\* | 33.01±2.11\*,\*\*^ |
| РАИЛ-1, пг/мл | 111.04±5.09 | 112.62±4.43\* | 101.2±5.12\* | 112.57±5.48\* | 111.10±6.12\*\*,\*\*\* | 112.63±5.35\* | 111.21±6.27\*\*^ |
| ФНО-α,пг/мл | 2.92±1.03 | 1.13±0.91\* | 2.12±0.54\*,\*\* | 1.18±0,51\* | 2.32±1.01\*\*,\*\*\* | 1.14±0,97\* | 2.74±1.00\*\*^ |
| Дефензины,пг/мл | 104.47±0.95 | 92.78±0.55\* | 93.87±0.45\*,\*\* | 92.98±0.65\* | 96.47±0.35\*\*,\*\*\* | 2.78±0.25\* | 113.87±0.55\*\* |
| BPI,пг/мл | 0.69±0.12 | 0.44±0.02\* | 0.31±0,07\*,\*\* | 0.53±0.10\* | 0.88±0.12\*\*,\*\*\* | 0.47±0,09\* | 0.41±0.07\*,\*\* |
| Ig А,г/л | 0.67 ± 0.08 | 1.99 ± 0.20\* | 0.91± 0,03\*,\*\* | 1.81 ± 0.20\* | 0.65 ± 0,06\*\*,\*\*\* | 2.07 ± 0,20\* | 0.58± 0.10\*\*^ |
| Ig M,г/л | 0.24 ± 0.03 | 0.23 ± 0.15 | 0.27 ±0,02 | 0.30± 0.15\* | 0,32 ± 0,01 | 0,24 ± 0,15\* | 0.28 ± 0.02 |
| Ig G,г/л | 3.28 ± 0,3 | 5.10 ± 0.78\* | 4.91 ± 0.21\*,\*\* | 4.85 ± 0.78\* | 3.03 ± 0,1\*\*,\*\*\* | 4.98 ± 0.78\* | 3.55 ± 0.12\*\*^ |
| С1, эф.мол /мл | 43.54±0,41 | 40.13±0.21\* | 40.63±0.28\* | 40,00±0.17\* | 43,54±0,41\*\*,\*\*\* | 39.99±0.37\* | 43.04±0.46\*\*^ |
| С2, эф.мол /мл | 29.53±0,32 | 23.30±0.30\* | 23.70±0.36\* | 23.13±0.24\* | 29,53±0.32\*\*,\*\*\* | 23.10±0.22\* | 29.13±0.22\*\*^ |
| С3, эф.мол /мл | 36.18±1,03 | 33.02±0.44\* | 33.82±0,41\* | 32.99±0.50\* | 36.18±1.03\*\*,\*\*\* | 33.12±0.70\* | 36.28±1.04\*\*^ |
| С4, эф.мол /мл | 17.06±0.89 | 18.25±0.69 | 18,05±0,79 | 17.99±0.09 | 18.10±0.70\*\*,\*\*\* | 18.12±0.64 | 18.43±0.54\*\*^ |
| С5, эф.мол /мл | 25.77±0,09 | 26.18±0.70\* | 26,68±0,73\* | 26.28±0.45\* | 25.77±1.09\*\*,\*\*\* | 26.78±0.60\* | 25.67±0.07\*\*^ |
| СН-50 | 47.68±0.43 | 39.23±0.37\* | 39.43±0.47\* | 39.88±0.17\* | 47.68±0.43\*\*,\*\*\* | 38.23±0,39\* | 47.62±0.31\*\*^ |

Примечание: сравнения между группами проведены по критерию Мана-Уитни; \*р<0,003 по отношению к показателям в группе здоровых \*\*р<0,003 по отношению к показателям до лечения,\*\*\*р<0,003 по отношению к показателям группы Базис+ЛО с переменной генерацией импульса после лечения по отношению к группе женщин получивших базисную терапию^ р<0,003 -достоверность по отношению к показателям после лечения в группе Базис+ЛО с переменной генерацией импульса по отношению показателям Базис+ ЛО с постоянной генерацией импульса после лазеротерапии с переменной генерацией импульса и составил 3,03±0,1г/л, с постоянной генерацией импульса оставался повышенным-3.55±0.12, при базисной терапии его значения не отличались от показателей до лечения. Достоверных различий по содержанию Ig M в цервикальном секрете женщин до и после терапии во всех группах сравнения не выявлено.

Терапия с привлечением лазерного воздействия с постоянной и переменной генерациями импульса способствовала нормализации содержания ИЛ-1α, ИЛ-1β, РАИЛ1, ИЛ-8, ФНО-α, ИФН-γ, дефензинов и BPI, компонентов С1-С5 комплемента, содержания IgG в цервикальном секрете. При использовании базисной терапии отмечены тенденции к нормализации исследуемых показателей. Таким образом, лазерное излучение низкой интенсивности с постоянной и переменной генерацией импульса, оказывая биостимулирующее действие на мембраны иммунокомпетентных клеток, возможно, приводит к усилению индукции медиаторов клеточного иммунитета, запускающих каскад иммунных реакций (Бартенева С.Н., 1996).

При рассмотрении результатов динамического иммунологического исследования гуморальных факторов местной противоинфекционной защиты репродуктивного тракта при действии терапевтических лазеров было выявлено однонаправленное влияние, выраженное в нормализации исследуемых показателей при использовании различных типов терапии: опосредованное восстановление показателей гуморального звена, угнетённых вследствие влияния на мукозальные иммунные факторы C. trachomatis.

Подводя итог проведённых исследований, необходимо отметить, что локальная и системная иммунокоррекция при воспалительных заболеваниях урогенитального тракта, основанная на стимулирующем действии низкоинтенсивного лазерного излучения, является эффективным средством комплексной терапии, поскольку способствует восстановлению локального и системного иммунного статуса, ликвидации дисбаланса эффекторных возможностей нейтрофилов в очаге воспалительной реакции, нормализации факторов колонизационной резистентности репродуктивного тракта, чем самым способствует скорейшей элиминации патогена под действием этиотропной терапии.

Всё вышеизложенное позволяет говорить о новом направлении в иммунокоррекции-физической иммуномодуляции, значительным преимуществом которой является рациональный подход к решению вопросов иммунологических дисфункций, заключающаяся в возможности селективного воздействия лазером низкой интенсивности на различные субпопуляции иммунокомпетентных клеток, в т.ч. и на НГ, доступность проведения, отсутствие побочных эффектов при адекватных лечебных режимах и относительная дешевизна, что делает перспективным дальнейшее развитие данного направления иммунокорекции и открывает широкие возможности применения терапевтических лазеров в клинической практике

ВЫВОДЫ

1. В экспериментальных условиях воздействие низкоинтенсивным лазерным излучением (длина волны 0,632мкм) с переменной генерацией импульса оказывает разнообразное по точкам приложения, направлению и степени выраженности влияние на функциональный статус нейтрофилов, зависящее от условий эксперимента, степени действия лазерного излучения, времени экспозиции. Частота 100 Гц, время экспозиции лазерного излучения 12,5 мин, доза облучения 0,56Дж\см2 приводит к снижению активности лизосом, повышению биоцидного потенциала, активности и интенсивности фагоцитоза нейтрофилов.

2.Облучение in vitro нейтрофилов крови здоровых доноров низкоинтенсивным лазером с постоянной генерацией импульса при длине волны 0,632 мкм, времени экспозиции 12,5 мин, дозе облучения 1,1 Дж\см2 приводит к усилению спонтанной и индуцированной НСТ-редуцирующей активности, увеличению функционального резерва и фагоцитарного потенциала данных клеток при снижении лизосомальной активности гранулоцитов.

3.Действие низкоинтенсивного лазерного излучения с постоянной и переменной генерацией импульса приводит к однонаправленным изменениям функциональных характеристик облучённых лазером нейтрофилов, выраженных в изменении их функциональной активности. При этом доза необходимая для максимальной активации нейтрофила при переменной генерации импульса составила 0,56дж\см2, что вдвое ниже дозы, необходимой для получения аналогичных стимулирующих эффектов при лазерном воздействии с постоянной генерацией импульса.

4.Культивирование интактных нейтрофилов in vitro сопровождается выделением провоспалительных цитокинов (ИЛ-1α, ИЛ-1β, РАИЛ, ИЛ-8, ФНО-α), растворимых антимикробных факторов (оксида азота, дефенсинов, бактерицидного/индуцирующего протеина), глюкозы, ионов кальция, магния. Индукция нейтрофилов крови лазерным излучением с постоянной и переменной генерацией импульса приводит к секреции биологически активных продуктов одинакового состава: увеличивается содержание провоспалительных цитокинов, бактерицидного/индуцирующего протеина, ионов кальция, снижается уровень глюкозы, ионов магния. При использовании в качестве индуктора низкоинтенсивного лазерного излучения с переменной генерацией импульса, то степень выраженности секреции исследуемых биологических веществ нейтрофилами выше по сравнению с лазерным излучением с постоянной генерацией импульса.

5. У больных с воспалительными заболеваниями нижнего отдела урогенитального тракта, вызванного хламидийной инфекцией регистрируется изменения клеточных и гуморальных факторов иммунной системы: лейкоцитоз, лимфоцитоз с уменьшением количества CD3+, CD4+, CD20+, CD16+-лейкоцитов, снижение иммунорегуляторного индекса (CD4+/CD8+), повышение CD8+, снижение фагоцитарной активности нейтрофилов, уменьшению активности нейтрофилов по НСТ-тесту при снижении их функционального резерва, повышении индекса люминесценции лизосом нейтрофилов, повышение содержания IgA, IgG, IgМ, снижение компонентов комплемента С1-С5, повышения количества циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови, снижения уровня противовоспалительных цитокинов, дефенсинов, содержания оксида азота, сдвиги липидной компоненты сыворотки крови, выраженной в снижении уровня холестерина, триглицеридов, холестерина липопротеидов низкой и высокой плотности, характерные для локальной воспалительной реакции.

6. Применение внутрисосудистого лазерного облучения крови в комплексе с базисной антибиотикотерапией приводит к нормализации иммунологических и биохимических показателей крови: снижению абсолютного и относительного числа лейкоцитов, восстановления количества и рецепторного пейзажа лимфоцитов, снижению лизосомальной активности, активности нейтрофилов по НСТ-тесту, снижении содержания IgA, IgG, IgМ и повышения С1-С5 компонентов комплемента, повышении концентрации ИЛ-1α, ИЛ-1β, ФНО-α, дефенсинов, BPI и снижении ИЛ-8. У пациенток с воспалительными заболеваниями нижнего отдела репродуктивного тракта, вызванных хламидиями, пролеченных без использования лазеротерапевтических воздействий дисфункция биохимических и иммунологических показателей периферической крови после проведённого лечения сохранялась.

7.Локальное действие лазером низкой интенсивности в комплексной терапии пациенток с хламидиозом нижнего отдела репродуктивного тракта стимулирует функциональную активность фагоцитов в очаге воспалительной реакции, что проявляется в: нормализации абсолютного и относительного количества нейтрофилов, восстановлении их лизосомальной активности и интенсивности люминесценции лизосом, увеличении интенсивности спонтанного восстановления НСТ нейтрофилов, повышении функционального резерва этих клеток, усиление поглотительных способностей и фагоцитарного числа нейтрофилов цервикального секрета.

8. Динамика показателей гуморальных факторов цервикального женщин с воспалительными заболеваниями нижнего отдела репродуктивного тракта, вызванными хламидийной инфекцией, под влиянием лазерного излучения с постоянной и переменной генерацией импульса имеет однонаправленный характер, выраженная в нормализации продукции Ig G, IgА, продукции С1-С5 компонентов комплемента, общей гемолитической активности, нормализации продукции цитокинов и дефензинов.

9.Использование лазерного излучения с переменной генерацией импульса с целью нормализации факторов местной противоинфекционной защиты женщин с воспалительными заболеваниями нижнего отдела репродуктивного тракта, вызванных хламидиями приводит к более быстрым позитивным изменениям факторов мукозального иммунитета репродуктивного тракта, направленных в сторону их нормализации по сравнению с применением лазерного излучения с постоянной генерацией импульса и базисных методов терапии.

10. Разработанные методы локальной иммунокоррекции с учётом биоэффективных доз воздействия 0,56Дж\см2 для импульсного режима и 1,1 Дж\см2 для режима с постоянной генерацией излучения открывают перспективу для проведения дальнейших испытаний по использованию лазерного излучения в терапевтической практике с целью коррекции дисфункций факторов врождённого иммунитета при их системном и локальном применении.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Гизингер, О.А. Влияние лазерного излучения на нейтрофилы цервикального секрета при урогенитальном хламидиозе / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, О.Л. Колесников, О.И. Летяева // Рос. журн. кож. и венерич. болезней. – 2005. – № 1. – С. 50-53.
2. Гизингер, О.А. Влияние препарата бестим на клеточные факторы местного иммунитета у женщин с кандидозной инфекцией / О.А. Гизингер, М.Б. Овденко // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, № 2. – С. 190. – Тезисы II Российской конференции по иммунотерапии и иммунореабилитологии.
3. Гизингер, О.А. Использование лазеротерапии в комплексном лечении хламидийного цервицита / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, О.Л. Колесников // Вестн. ЮУрГУ. – 2005. – № 5. – С.163-167. – (Сер. «Образование, здравоохранение, физическая культура». Вып.5, Т. 1).
4. Гизингер, О.А. Система провоспалительных цитокинов у женщин с урогенитальным трихомониазом / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин // Мед. иммунология. – 2005. – Т.7, № 5-6. – С. 601-604.
5. Гизингер, О.А. Уровни провоспалительных цитокинов в цервикальном секрете женщин с хламидийной инфекцией до и после терапии низкоиненсивным лазером / О.А. Гизингер // Актуальные вопросы дерматовенерологии: материалы регион. науч.-практ. конф. дерматовенерологов, акушеров-гинекологов, урологов. – Челябинск, 2005. – С. 53-54.
6. Гизингер, О.А. Факторы местного иммунитета репродуктивной системы у женщин с хламидийной инфекцией / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, О.И. Летяева // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2005. – № 4. – С. 65-69.
7. Гизингер, О.А. Действие низкоинтенсивного лазера на факторы местного иммунитета у женщин с хламидийной инфекцией / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физ. культуры. – 2006. – № 5. – С. 20-23.
8. Гизингер, О.А. Изменение содержания провоспалительных цитокинов в цервикальном секрете женщин с хламидийной инфекцией до и после терапии низкоинтенсивным лазером «Урал-ИМ» / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин // Достижения и перспективы развития дерматовенерологии: материалы юбилейной науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию дерматовенерол. службы Челяб. обл. – Челябинск, 2006. – С. 67.
9. Гизингер, О.А. Иммунологические и микробиологические аспекты действия низкоинтенсивного лазера на факторы местного иммунитета репродуктивного тракта женщин с хламидийной инфекцией / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, Л.Ф.Телешева // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2006. – № 4. – С. 105-109.
10. Гизингер, О.А. Низкоинтенсивный лазер в комплексной терапии урогенитальных инфекций у женщин / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин // Достижения и перспективы развития дерматовенерологии: материалы юбилейной науч.-практ. конф., посвящ 60-летию дерматовенерол. службы Челяб. обл. – Челябинск, 2006. – С. 57.
11. Гизингер, О.А. Оценка клинико-иммунологической эффективности терапии хламидийного цервицита с применением низкоинтенсивного лазерного излучения / О.А. Гизингер, В.В.Панченко // Достижения и перспективы развития дерматовенеролигии: материалы юбилейной науч.-практ. конф., посвящ 60-летию дерматовенерол. службы Челяб. обл. – Челябинск, 2006. – С. 68-70.
12. Гизингер, О.А. Реакция нейтрофилов цервикального секрета у женщин с хламидийной инфекцией на низкоинтенсивное лазерное излучение / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, В.В. Панченко, Н.В. Ермакова // 1-й Российско-чешский медицинский форум: сб. материалов. – Челябинск, 2006. – С.142-144
13. Гизингер, О.А. Система провоспалительных цитокинов в цервикальном секрете у женщин с урогенитальным хламидиозом / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин // Цитокины и воспаление. – 2006. – Т. 5, № 4. – С. 13-16.
14. Гизингер, О.А. Сравнительная оценка влияния лазеротерапии на иммунологические факторы местного иммунитета у женщин с герпесвирусной инфекцией / О.А. Гизингер, К.В. Никушина // Достижения и перспективы развития дерматовенерологии: материалы юбилейной науч.-практ. конф., посвящ. 60-летию дерматовенерол. службы Челяб. обл. – Челябинск, 2006. – С. 92-93.
15. Гизингер, О.А. Использование лазеротерапии в комплексном лечении хламидийного цервицита / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин // Иммунология Урала. – 2007. – №1 (6). – С.120. – Материалы VI конференции иммунологов Урала.
16. Гизингер, О.А. Оценка иммунологической эффективности терапии хламидийного цервицита с применением лазера низкой интенсивности / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, Л.Ф. Телешева. – М., 2007. – 5 с. – Деп. в ГЦНМБ 23.10.2007, №-Д.27807.
17. Гизингер, О.А. Состояние функциональной активности нейтрофилов цервикального секрета у женщин с хламидийной инфекцией после терапии низкоинтенсивным лазером / О.А. Гизингер, О.И. Летяева // Иммунология Урала. – 2007. – №1 (6). – С.119. – Материалы VI конференции иммунологов Урала.
18. Гизингер, О.А. Аспекты действия низкоинтенсивного лазерного излучения на иммунологические факторы цервикального и вагинального секретов у женщин с хламидийной инфекцией / О.А. Гизингер, К.Г. Ишпахтина // Рос. иммунол. журн. – 2008. – Т. 2(11), № 2-3. – С. 248. – Материалы объединенного иммунологического форума.
19. Гизингер, О.А. Влияние низкоинтенсивного гелий-неонового лазера на функции нейтрофилов цервикального канала и влагалища у женщин с кандидозной инфекцией / О.А. Гизингер, К.Г. Ишпахтина, К.В. Никушкина // Рос. иммунол. журн. – 2008. – Т. 2 (11), № 2-3. – С. 248-249. – Материалы объединенного иммунологического форума.
20. Гизингер, О.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на иммунологическую реактивность организма / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, К.Г. Ишпахтина // Вестн. новых мед. технологий. – 2008. – Т. 15, № 2. – С. 95-97.
21. Гизингер, О.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы цервикального секрета у женщин с микоплазменной инфекцией / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин // Вопр. курортологии, физиотерапии и лечеб. физкультуры. – 2008. – № 4. – С. 29-31.
22. Гизингер, О.А. Изучение содержания рецептора индукции апоптоза-CD-95 [Fas/APO-1] на нейтрофилах секретов репродуктивного тракта у женщин с хламидийной инфекцией / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, К.Г. Ишпахтина // Вестн. новых мед. технологий. – 2008. – Т. 14, № 3. – С. 118-119.
23. Гизингер, О.А. Низкоинтенсивный лазер в коррекции дисфункций нейтрофильных гранулоцитов пациентов с цервицитом хламидийной этиологии в эксперименте / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин // Иммунология. – 2008. –Т.29, № 6. – С. 346-349.
24. Гизингер, О.А. Низкоинтенсивный лазер в коррекции дисфункций нейтрофильных гранулоцитов пациентов с цервицитом хламидийной этиологии в эксперименте in vitro / О.А. Гизингер, К.В. Никушкина, Е.В. Плеханова // Материалы VI итоговой научно-практической конференции молодых ученых Челябинской государственной медицинской академии. – Челябинск, 2008. – С. 43-51.
25. Гизингер, О.А. Роль низкоинтенсивного лазерного излучения в коррекции дисфункций нейтрофильных гранулоцитов у женщин с хламидийной инфекцией / О.А. Гизингер, К.Г. Ишпахтина // Вестн. новых мед. технологий. – 2008. – Т. 14, № 3. – С. 116-118.
26. Гизингер, О.А. Содержание рецептора индукции апоптоза-CD-95 на нейтрофилах цервикального и вагинального секретов у женщин с хламидийной инфекцией / О.А. Гизингер, К.В. Никушкина, Е.В. Плеханова //Материалы VI итоговой научно-практической конференции молодых ученых Челябинской государственной медицинской академии. – Челябинск, 2008. – С. 51-56.
27. Гизингер, О.А. Влияние лавомакса на функции нейтрофилов цервикального канала у женщин с хламидийной инфекцией / О.А. Гизингер, О.И. Летяева // III Всероссийский конгресс дерматовенерологов: тез. науч. работ. – Казань, 2009. – С. 76.
28. Гизингер, О.А. Влияние лазера низкой интенсивности на количество нейтрофильных внеклеточных ловушек при различном временном воздействии / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, В.А. Маркова // Актуальные проблемы медицинской науки и практического здравоохранения: тр. науч. сессии, посвящ. 65-летию ЧелГМА. – Челябинск, 2009. – С.14-15.
29. Гизингер, О.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на нейтрофилы периферической крови доноров в условиях эксперимента/ О.А. Гизингер, К.Г. Ишпахтина, О.Л. Колесников // Иммунология. – 2009. – Т.30, № 5. – С. 263-267.
30. Гизингер, О.А. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения с переменной генерацией импульса на процесс формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек / О.А. Гизингер, В.А.Маркова, А.И.Рыжкова // Материалы LXIII итоговой межвузовской научной студенческой конференции с международным участием, посвящённой 65-летию челябинской государственной медицинской академии. – Челябинск, 2009. – С. 64.
31. Гизингер, О.А. Влияние продолжительности воздействия лазера низкой интенсивности с постоянной генерацией импульса на процесс формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, В.А. Маркова // Материалы VII итоговой научно-практической конференции молодых ученых Челябинской государственной медицинской академии. – Челябинск, 2009. – С. 75-77.
32. Гизингер, О.А. Гелий-неоновый лазер с переменной генерацией импульса в коррекции дисфункции нейтрофильных гранулоцитов in vitrо / О.А. Гизингер // Материалы VII итоговой научно-практической конференции молодых ученых Челябинской государственной медицинской академии. – Челябинск, 2009. – С. 28-33.
33. Гизингер, О.А. Изменение динамики содержания цитокинов под воздействием лазера низкой интенсивности / О.А. Гизингер, М.А. Полетаева, Е.В. Максимова // Иммунология. – 2009. – Т.30, № 3. – С. 176-180.
34. Гизингер, О.А. Изучение процесса формирования нейтрофильных внеклеточных ловушек под воздействием лазера низкой интенсивности / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, К.Г. Ишпахтина, В.А. Маркова // Мед. иммунология. – 2009. – Т.11, № 4-5. – С. 406-407.
35. Гизингер, О.А. Клинико-иммунологические аспекты действия препарата «Сафоцид» при лечении урогенитальных инфекций / О.А. Гизингер, В.А. Маркова // Материалы VII итоговой научно-практической конференции молодых ученых Челябинской государственной медицинской академии. – Челябинск, 2009. – С. 39-46.
36. Гизингер, О.А. Клинико-микробиологическая оценка эффективности препарата «Сафоцид» при лечении хламидийной инфекции нижнего отдела репродуктивного тракта / О.А. Гизингер, О.И. Летяева // Материалы VII итоговой научно-практической конференции молодых ученых Челябинской государственной медицинской академии. – Челябинск, 2009. – С. 34-39.
37. Гизингер, О.А. Методы изучения бактерицидности нейтрофильных гранулоцитов по формированию нейтрофильных ловушек / О.А. Гизингер, В.А. Маркова, А.И. Рыжкова // Материалы LXIII итоговой межвузовской научной студенческой конференции с международным участием, посвящённой 65-летию челябинской государственной медицинской академии. – Челябинск, 2009. – С. 65.
38. Гизингер, О.А. Мониторинг функционально-метаболического статуса нейтрофилов под действием низкоинтенсивного лазерного излучения ИК-диапазона / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин // Научно-практическая конференция центрального федерального округа Российской федерации с международным участием «Инновации и информационные технологии в диагностической, лечебно-профилактической и учебной работе клиник»: материалы конф. – Тверь, 2009. – С.296-297.
39. Гизингер, О.А. Оценка количества нейтрофильных внеклеточных ловушек у здоровых доноров разного пола, формирующихся под воздействием лазера низкой интенсивности / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, В.А. Маркова // Вестн. урал. мед. акад. науки. – 2009. - № 2\1(24). - С.246-247.
40. Гизингер, О.А. Состояние микробиоценоза после применения иммунимодулятора лавомакс у женщин с микоплазменной инфекцией : тез. науч. работ / О.А. Гизингер, О.И. Летяева // III Всероссийский конгресс дерматовенерологов. – Казань, 2009. – С.87.
41. Гизингер, О.А. Уровень провоспалительных цитокинов в цервикальном секрете у женщин с хламидийной инфекцией до и после терапии низкоинтенсивным лазером с переменной генерацией импульса / О.А. Гизингер, И.И. Долгушин, К.Г. Ишпахтина, В.А. Маркова // Мед. иммунология. – 2009. – Т.11, № 4-5. – С. 312-313.
42. Гизингер, О.А. Функционально-метаболический статус нейтрофилов под воздействием лазерного излучения ИК-диапазона (850нм) / О.А. Гизингер, К.Г. Ишпахтина, О.Л. Колесников // Актуальные проблемы медицинской науки и практического здравоохранения: тр. науч. сессии, посвящ. 65-летию ЧелГМА. – Челябинск, 2009. – С.11.
43. Гизингер, О.А. Цитокиновый профиль вагинального секрета женщин с урогенитальным микоплазмозом / О.А. Гизингер, К.В. Никушкина, Е.А. Мезенцева, К.Г. Ишпахтина, О.Б. Прокопьева // Актуальные проблемы медицинской науки и практического здравоохранения: тр. науч. сессии, посвящ. 65-летию ЧелГМА. – Челябинск, 2009. – С.9-10.
44. Гизингер, О.А. Эффективность различных методов иммунокоррекции в терапии урогенитальных инфекций / О.А. Гизингер, К.Г. Ишпахтина // Материалы LXIII итоговой межвузовской научной студенческой конференции с международным участием, посвящённой 65-летию челябинской государственной медицинской академии. – Челябинск, 2009. – С. 66.