

Таким образом, анализ течения настоящей беременности и родов у обследованных МРЖ показал, что применение бальнеологических факторов в лечении БВ у МРЖ приводит к нормализации биоценоза влагалища, увеличению лактобациллярной флоры, уменьшению условно-патогенной флоры. Это, в свою очередь, обуславливает уменьшение частоты гестационных осложнений и улучшение перинатальных исходов в сравнении с традиционным медикаментозным лечением.

#### Выводы

1. При лечении женщин с бактериальным вагинозом целесообразно использовать бальнеотерапию с включением

гинекологических орошений минеральными водами. На курс гинекологических орошений необходимо 8–10 процедур длительностью до 10 минут каждая. На одну процедуру гинекологического орошения минеральной водой используется до 5–6 литров нативной минеральной воды с температурой 36–37 °С, давлением до 500 мм водного столба.

2. Учитывая высокий клинический эффект минеральной воды в восстановлении микробиоценоза влагалища, рекомендуется использовать её в виде гинекологических орошений при бактериальном вагинозе и при состояниях после антибиотикотерапии и санации влагалища антибактериальными препаратами.

3. Рекомендовать применение ПЦР –

диагностики с использованием набора «Фемофлор» в качестве прегравидарного скринингового обследования МРЖ в женской консультации, учитывая высокую диагностическую значимость и легкость использования.

#### Литература

1. Дурпалова К.М., Омаров Н.С.-М. Бальнеотерапия сульфатно-хлоридно-натриевыми водами многорожавших женщин с бактериальным вагинозом // Вестник новых медицинских технологий. – 2009 – Т. XVI, № 4 – С.126–128.
2. Дурпалова К.М., Омаров Н.С.-М. Комплексное лечение бактериального вагиноза. Монография. – Махачкала: ООО «Радуга-1», 2010. – 116с.

Агевнина В.П., Алехин А.И., Жаров Е.В., Данилейко Ю.К.

## Влияние высокочастотного холодноплазменного воздействия в импульсно-периодическом режиме модуляции на восстановительные процессы в тканях экспериментальных животных

ЦКБ РАН, г. Москва

**В**лияние физических факторов на биологические процессы представляет значительный интерес. В ряде случаев целенаправленное воздействие различных физических факторов может быть использовано как самостоятельно, так и в комплексе с медикаментозным воздействием для восстановления функций организма после различных повреждений. Одним из примеров положительной реализации такого подхода является успешное применение высокочастотного холодноплазменного воздействия для активации восстановительных процессов при лечении фоновых заболеваний шейки матки.

Перспективным направлением в изучении влияния физических факторов на активацию восстановительных процессов является анализ действия на ткани организма радиочастотного тока (РЧ) в импульсно-периодическом режиме модуляции. В многочисленных исследованиях по изучению воздействия электрических токов на клетки тканей было показано, что ответная реакция клеток на электростимуляцию различна и зависит от амплитуды и частоты генерируемого

тока, а также от продолжительности его действия. Воздействие импульсных токов низких и высоких частот приводит к активизации кровообращения, усилению обменных процессов и восстановлению трофики тканей. Низкочастотные импульсные токи нашли широкое применение при лечении парезов, параличей различной этиологии, атрофий мышц и т.д.

Методы лечения, основанные на использовании импульсных токов высокой частоты, применяются при варикозном расширении вен, длительно не заживающих ранах, трофических язвах и нейродермитах (Ясногородский, 1987). В исследованиях по изучению действия высокочастотных импульсных токов Bourguignon и сотр показали, что после электростимуляции фибробластов человека количество белка и ДНК увеличилось на 160 % по сравнению с контролем (Bourguignon. 1986; Bourguignon 1987). В других исследованиях подобные параметры электростимуляции являлись триггерами увеличения транспорта Ca<sup>2+</sup>, с последующим повышением количества инсулиновых рецепторов

на мембране фибробластов (Bourguignon, 1989). Кроме того, было отмечено, что подобная электростимуляция способствует также повышению экспрессии рецепторов к TGF-β (Falanga, 1987).

В отношении действия РЧ тока в импульсно-периодическом режиме модуляции в настоящее время получены предварительные данные, которые свидетельствуют о лечебном характере данного воздействия на ткани организма. При этом отмечается присутствие не только деструктивного, но и восстановительного эффекта, возникающего в процессе лечения (Бабурин и др., 2009). Кроме того, имеются данные об успешном применении этого воздействия в лечении некоторых патологических состояний у человека (Данилейко и др., 2009). Однако для практического внедрения данного метода в медицинскую практику и разработки медицинской технологии его применения необходимо знание фундаментальных механизмов действия токов радиочастотного диапазона на организм на биохимическом, клеточном и тканевом уровнях.

В работе проведено исследование реакции клеток кожи и скелетных мышц крыс на действие импульсно-периодического электротока РЧ диапазона (2,64 МГц) с целью изучения клеточных механизмов данного воздействия.

**Объект исследования.** Работу проводили на крысах неинбредной линии Wistar в возрасте 4–6 мес. Была использована трапецевидная мышца и кожные покровы в зоне этой мышцы.

**Описание прибора.** Для изучения действия импульсно-периодического электротока радиочастотного диапазона был использован высокочастотный электрохирургический аппарат ЭХВЧ-250 «КаК Медимастер», который был разработан в Институте общей физики им. А.М. Прохорова РАН. Аппарат обеспечивает генерацию электротока частотой 2,64 МГц в импульсно-периодическом режиме с возможностью модуляции выходного напряжения импульсами длительностью от 50 до 400 мкс и частотой повторения от 1 до 190 кГц. Более подробные сведения о технических характеристиках аппарата приведены в работах по исследованию метода лечения патологических состояний человека (Данилейко и др., 2009) и механизмов взаимодействия высокочастотной энергии с биологической тканью на границе ткань-электрод (Поляков, 2003).

Опытных животных подвергали действию токов РЧ диапазона в импульсно-периодическом режиме (параметры модуляции устанавливались в диапазоне: длительность импульса 100–200 мкс, частота следования 2–5 кГц). Воздействие осуществлялось с помощью монополярного игольчатого электрода, диаметром 0,3 мм, введенного в ткань на глубину 2–4 мм. Представленные исследования проводились для трех уровней выходной мощности аппарата: 2, 4 и 6, при положении регулятора режимов – II. Такие установки выходных параметров соответствовали выделяемой в ткани мощности: 0,1 Вт, 1,0 Вт и 4,0 Вт, соответственно. При введении в ткань игольчатого электрода уровень выходной мощности аппарата контролировался с помощью измерительного оборудования (вольтметр статический С-50, и безреактивный резистор типа ТВО). Воздействие высокочастотным током осуществлялось в течение 10 сек.

Контрольным животным вводили иглу в соответствующую зону (кожи или мышцы) без воздействия РЧ токов. Результаты воздействия оценивали с помощью гистологического и иммуногистохимического методов на 1, 3, 5, 7, 14 и 21 сутки после воздействия.

**Гистологическое исследование.** Для гистологического анализа кожу или мышечную ткань фиксировали смесью Буэна, после чего многократно промывали 70% этиловым спиртом. Фиксированный материал проводили по стандартной методике по спиртам восходящей концентрации, ксилолу, заливали в парафин и готовили серийные срезы толщиной 7 мкм. После депарафинирования препараты окрашивали гематоксилин-эозином, заключали в балзам и анализировали с помощью светового микроскопа Olympus AH-3 (Австрия).

**Приготовление криостатных срезов.** Для приготовления криостатных срезов исследуемые образцы ткани фиксировали в 4% параформальдегиде, приготовленном на 0,1 М PBS (рН 7,4), в течение 24 ч при комнатной температуре. Затем образцы отмывали в 3 сменах 0,1 М PBS, последовательно выдерживали по 10–15 мин в 5%-ном и 10%-ном растворе сахарозы и оставляли на ночь в 20%-ном растворе сахарозы при 4°C. На следующие сутки исследуемые образцы ткани помещали в смесь Tissue Tec O.C.T. (Leica, Германия) и 20%-ного раствора сахарозы в соотношении 1:1 и замораживали при –70°C. На криостате Leica M1900 (Германия) изготавливали срезы толщиной 7–10 мкм. Перед инкубацией с антителами срезы отмывали в 0,1 М PBS (30 мин).

**Имуногистохимический анализ.** Для иммуногистохимических исследований с использованием флуоресцентной метки срезы отмывали в 0,1 М PBS (рН 7,4) и пермеабилizировали 30 мин в 0,25%-ном растворе Triton X-100. Для уменьшения неспецифического связывания антител срезы инкубировали в блокирующем растворе 3%-ого бычьего сывороточного альбумина (Sigma) в течение 30 мин. Растворы Triton X-100 и БСА готовили на 0,1 М PBS с добавлением 0,1%-ного Tween-20. Список использованных антител, названия, фирмы производители и разведения представлены в таблице. Инкубацию с первичными антителами, разведенными в блокирующем растворе, проводили в течение

18 ч при 4°C, после чего клетки промывали PBS 4 раза по 5 мин и наносили вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 488 или 546 (Molecular Probes, США). Для окрашивания ядер клеток использовали Hoechst 33342 (1 : 1000, Sigma). После инкубации со вторыми антителами клетки промывали PBS и заключали под покровные стекла в глицерин. Специфичность антител подтверждали в контрольных экспериментах, в которых реакцию проводили в отсутствие первых антител. Отсутствие флуоресцентной метки свидетельствовало о специфичности реакции.

Анализ полученных результатов проводили с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM RXA2 (Германия), оснащенного набором светофильтров и фотокамерой Olympus DP70. Обработка результатов была выполнена с использованием программ ImageJ и Adobe Photoshop 7.0.

#### Результаты и обсуждение

Важнейшей особенностью влияния РЧ токов в импульсно-периодическом режиме модуляции на организм следует считать сочетание деструктивных и восстановительных процессов, вызываемых примененным воздействием. Полученные результаты показали, что в первые сутки после воздействия, как в коже, так и в скелетных мышцах наблюдается выраженный отек тканей. Данные исследования представлены на *рисунках 1а-в* и *2а-в* соответственно. На третьи сут после обработки тканей электротоком РЧ диапазона отек уменьшается. При этом в коже наблюдается разобщение взаимодействия эпидермиса и дермы (*рисунок 1 а'-б'*). Главное проявление действия РЧ токов это следующее за фазой отека ткани восстановление морфологии, основой которой является усиление клеточной пролиферации и процессов дифференцировки.

Действие импульсно-периодических токов РЧ диапазона мощностью 0,1 Вт на кожу приводит к активации пролиферативных процессов уже на третьи сут после воздействия (*рисунок 1б'*). Максимальный уровень пролиферации отмечается на 14 сут, далее (к 21 суткам) наблюдается незначительное снижение. Наряду с повышением пролиферативной активности, в эпидермисе с 10 по 21 сут происходит увеличение гиперкератоза. Незначительные

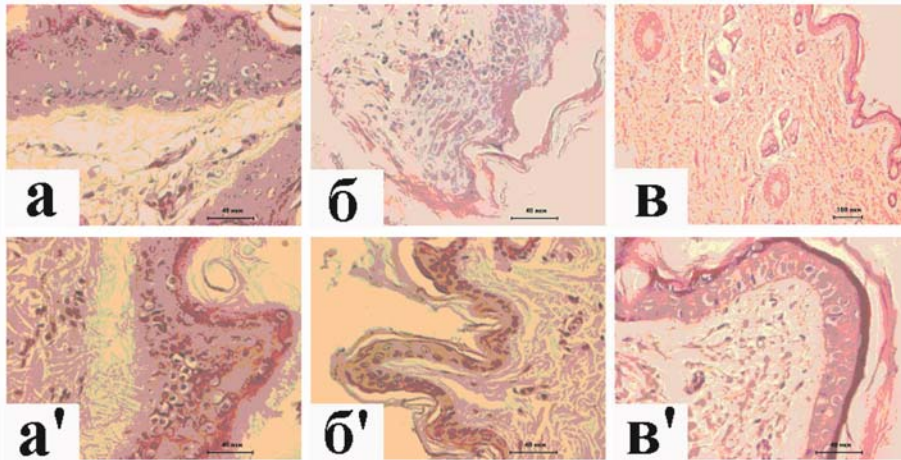


Рисунок 1. Воздействие токов РЧ диапазона мощностью 0,1 (б, б') и 1,0 (в, в') Вт на клетки кожи крысы. а, а' - кожа животного из контрольной группы; б, б' - отек субэпидермального слоя (1 сут после воздействия); в, в' - повышение извилистости эпидермиса (3 сут после воздействия). Окраска гематоксилином и эозином.

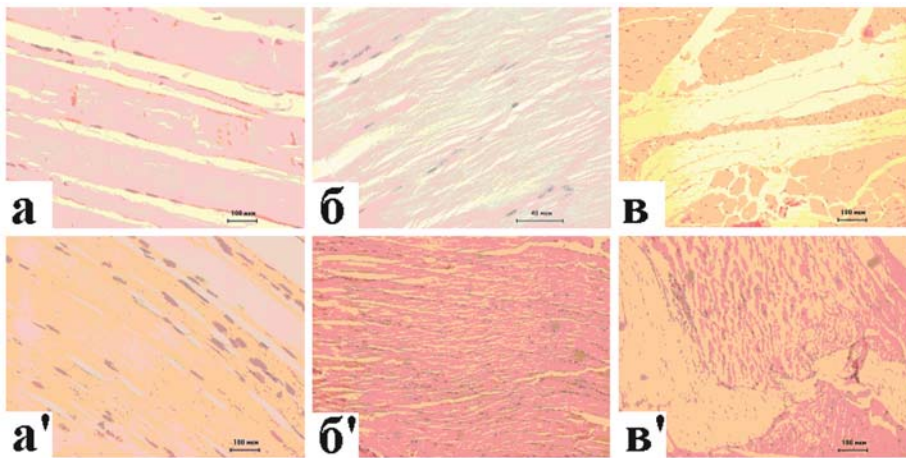


Рисунок 2. Воздействие токов РЧ диапазона мощностью 0,1 (а, а'), 1,0 (б, б') и 4,0 (в, в') Вт на клетки мышечной ткани крысы. а, б - отек эндомизия, в - отек на фоне некроза мышечных волокон (1 сут после воздействия); а', б', в' - появление незрелых форм мышечных волокон (3 сут после воздействия). Окраска гематоксилином и эозином.

колебания в степени извилистости базальной мембраны по сравнению с контролем свидетельствуют о том, что площадь контакта эпидермиса и дермы существенно не меняется (рисунок 1б'). Изменения, протекающие в мышечной ткани при обработке электротоками РЧ диапазона мощностью 0,1 Вт, сходны с процессами, происходящими в коже при соответствующем воздействии. Дозированная обработка РЧ током мощностью 0,1 Вт приводит к отеку эндомизия в первые сутки после воздействия (рисунок 2а). Повышение пролиферативной активности наблюдается с третьих по 21-е сут. В эти же сроки отчетливо выражены процессы дифференцировки. Появление незрелых форм мышечных волокон отмечается уже на третьи сут после воздействия (рисунок 2а'). К 21 сут состояние кожи и мышц нормализуется. Воздей-

ствии РЧ тока мощностью 0,1 Вт на здоровую кожу и мышечную ткань вызывает реактивные и адаптационные процессы, которые приводят к активации метаболизма и умеренной пролиферативной активности, снижающейся к 21 сут.

Действие РЧ токов в импульсно-периодическом режиме модуляции мощностью 1,0 Вт на кожу приводит к умеренным деструктивным изменениям (отек, разобщение взаимодействия эпидермиса и дермы). Некротических явлений, также как и при действии электротока мощностью 0,1 Вт, выявлено не было. На фоне отека дермы трофическая функция (поступление питательных веществ) была нарушена. При этом извилистость базальной мембраны повышалась, что можно расценивать как восстановительную реакцию, отмечавшуюся с 3 по 14 сут

(рисунок 1б'). Проявлением этого процесса можно считать и увеличение пролиферативной активности на ранних сроках после воздействия (рисунок 3б). При действии РЧ токов мощностью 1,0 Вт в эти сроки отмечены процессы активного ангиогенеза. Явление нарушения взаимодействия эпидермиса и дермы отмечалось с 7 по 14 сут, что сопровождалось повышением гиперкератоза к 14 сут. Следует отметить, что при РЧ воздействии мощностью 1,0 Вт, так же, как и при 0,1 Вт, наблюдалась вторая волна деструктивных изменений. Однако в случае действия 1,0 Вт подобное явление отмечалось на 14 сут, а при действии 0,1 Вт – на 7 сут. Однозначно объяснить появление второго пика деструктивных изменений пока не представляется возможным. При действии токов РЧ диапазона мощностью 1,0 Вт на мышечную ткань наблюдались более выраженные деструктивные явления по сравнению с действием тока мощностью 0,1 Вт (рис. 2б). Однако значительной гибели мышечных структур не выявлялось. Регенерационные процессы были отчетливо выражены уже с 3 сут после воздействия (рис. 2б'). Вторая волна деструктивных процессов отсутствует, в отличие от кожи. К 21 сут проявлялась тенденция к нормализации состояния и кожи, и мышечной ткани. Таким образом, дозированное РЧ воздействие мощностью 1,0 Вт на здоровую кожу и мышечную ткань сопровождается умеренными явлениями деструкции, в ответ на которые развивается адекватная восстановительная реакция к явной тенденции нормализации состояния тканей к 21 сут.

Действие электротоков РЧ диапазона мощностью 4,0 Вт на кожу приводит к сильному некрозу тканей, что сопровождается существенным нарушением взаимодействия между эпидермисом и дермой. На фоне некрозов появляются сильные отеки, сохраняющиеся в течение первых пяти суток. Кроме того, наблюдается ярко выраженный гиперкератоз уже на 7 сут. Регистрируемая активация пролиферативных процессов на этом фоне направлена на возмещение дефицита тканей (ликвидация некроза). Признаки регенерации выражены менее отчетливо по сравнению с воздействием мощностью 0,1 и 1,0 Вт и наблюдались лишь на 5 сут. Кроме того, следует отметить, что на фоне некроза

на 5–7 сут появляются зоны склероза. Тогда как при действии РЧ токов мощностью 0,1 и 1,0 Вт на этих сроках наблюдались процессы активного ангиогенеза. При РЧ воздействии мощностью 4,0 Вт на мышечную ткань отмечаются процессы схожие с таковыми в коже. Так в первые сутки после воздействия наблюдаются ярко выраженные деструктивные изменения, формируются зоны некроза (рис. 2б), количество которых увеличивается на 3 сут (рис. 2б'). Развивающийся на фоне некроза отек незначительно снижается, однако сохраняется вплоть до 21 сут. Пролиферативная активность существенно ниже по сравнению с воздействием мощностью 0,1 и 1,0 Вт. Регенерационные процессы сначала нарастают, а к 21 суткам снижаются. Таким образом, действие токов РЧ диапазона мощностью 4,0 Вт на здоровую кожу и мышечную ткань оказывает очень сильный повреждающий эффект. Деструктивные изменения (некроз, отек) и их последствия (склероз) сохраняются и на 21 сут после воздействия.

Следовательно, действие РЧ токов в импульсно-периодическом режиме модуляции низкой и средней мощности (0,1 и 1,0 Вт) может использоваться в качестве стимулятора пролиферативных и метаболических процессов в ткани. Воздействие большей мощности (4,0 Вт) оказывает на ткань более интенсивное действие, сопровождающееся значительно выраженной деструкцией ткани.

Более детальное исследование механизмов активации клеточных процессов при действии токов РЧ диапазона было проведено на примере восстановления скелетной мышечной ткани. Известно, что восстановление мышечной ткани при различных повреждениях, происходит за счет стволовых (сателлитных) клеток. (Buckingham M., 2006, 2007; Charge, Rudnicki, 2004; Seale et al., 2000, 2001; Stocum, 2006) В норме сателлитные клетки не активны, но при нарушении целостности мышечных волокон происходит их активация. Активированные сателлитные клетки пролиферируют и дают начало миогенным клеткам-предшественникам, в которых экспрессия ряда регуляторных генов приводит к запуску программы миогенной дифференцировки. Все этапы участия сателлитных клеток в восстановительных процессах (пролиферация, активация,

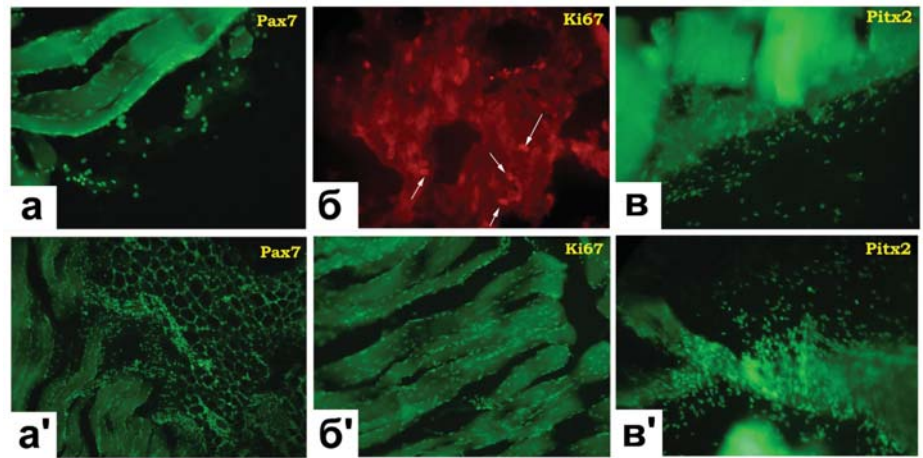


Рисунок 3. Иммуногистохимическое выявление миогенных клеток-предшественников на первые (а, б, в) и третьи (а', б', в') сут после воздействия токов РЧ диапазона мощностью 0,1 Вт. а', б', в' - миграция миогенных клеток-предшественников в зону повреждения; а, а' - окрашивание антителами против Pax7; б, б' - выявление Ki67(+) клеток; в, в' - окрашивание антителами против Pitx2.

дифференцировка по миогенному пути) после воздействия РЧ токов были изучены с использованием иммуногистохимического метода.

Для понимания механизмов действия тока на восстановительные процессы в тканях важное значение имеет динамика клеточного ответа на данное воздействие. В первые сут после воздействия наблюдались разрывы мышечных волокон. В зоне повреждения были обнаружены сателлитные клетки, экспрессирующие специфический транскрипционный фактор Pax7. При этом часть этих клеток была локализована на периферии мышечных волокон, а часть была не связана с мышечными волокнами (рисунок 3а). Вместе с тем в первые сут после действия токов РЧ диапазона происходит активация пролиферации миогенных клеток, что подтверждается наличием небольшого количества клеток, экспрессирующих Ki67 – маркер пролиферации клеток, который присутствует на всех стадиях клеточного цикла за исключением фазы G0 (рисунок 3б). В первые сут после воздействия в зоне повреждения была идентифицирована часть клеток, экспрессирующих маркер ранних стадий дифференцировки Pitx2, что может свидетельствовать о переходе этих клеток на путь миогенной дифференцировки (рисунок 3в).

Известно, что повреждение одного конца мышечного волокна активирует сателлитные клетки по всей его длине. При этом наблюдается миграция сателлитных клеток вдоль мышечного волокна в зону повреждения. Если в первые

сут после действия токов РЧ диапазона наблюдались разрывы мышечных волокон, сопровождающиеся выходом сателлитных клеток из зоны обычной локализации на периферии волокон, то на третьи сут после воздействия отмечалось активное движение этих клеток вдоль мышечных волокон в зону повреждения (рис. 3а'). Одновременно в зоне воздействия происходит активная пролиферация миогенных клеток, выявляемая по экспрессии маркера Ki67 (рис. 3б'). Таким образом, на третьи сутки после воздействия отмечена колокализация экспрессии белковых регуляторных факторов Pax7 и Ki67, свидетельствующая о том, что мигрирующие в зону повреждения сателлитные клетки находятся в активированном состоянии, которое сопровождается их пролиферацией. В результате деления сателлитных клеток формируются миогенные клетки-предшественники, дающие начало новым мышечным волокнам. Эти клетки характеризуются также активной экспрессией регуляторного фактора дифференцировки Pitx2 (рис. 3в'). На пятые сутки после действия токов радиочастотного диапазона уровень экспрессии белкового фактора Pax7 несколько снижается, тогда как экспрессия Ki67 и Pitx2 активируется в области повреждения, что свидетельствует об активных процессах пролиферации и дифференцировки миогенных клеток, приводящих к восстановлению ткани в зоне воздействия. На 10-е сутки после воздействия отмечено дальнейшее снижение экспрессии Pax7, однако экспрессия этого фактора еще наблюдает-

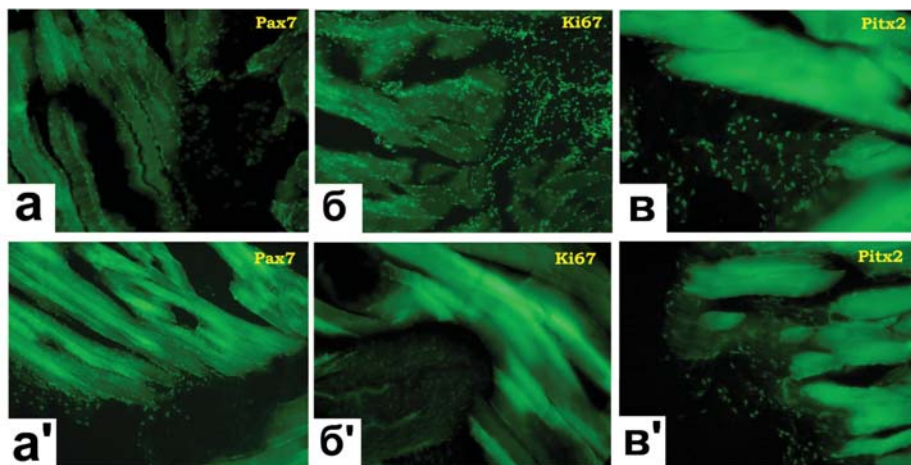


Рисунок 4. Иммуногистохимическое окрашивание срезов мышечной ткани антителами к Pax7 (а, а'), Ki67 (б, б') и Pitx2 (в, в'). Образцы ткани взяты на первые (а, б, в) и 10-ые (а', б', в') сут после обработки РЧ токами мощностью 0,1 Вт.

ся в сателлитных клетках, не связанных с мышечными волокнами (рисунок 4а). На этом этапе происходит снижение экспрессии Ki67 (рисунок 4б), что свидетельствует об изменении пролиферативного статуса миогенных клеток. Следует отметить, что экспрессия Pitx2 в зоне воздействия остается на высоком уровне (рис. 4в), что указывает на продолжающиеся процессы дифференцировки и восстановления в этой зоне.

Из представленных данных следует, что действие токов радиочастотного диапазона на кожу и скелетные мышцы животных свидетельствует об активных восстановительных процессах в зоне воздействия. Таким образом, применение данного воздействия при различных повреждениях должно приводить к мобилизации восстановительного потенциала тканей и заживления этих повреждений.

Таким образом, реакция клеток кожи и скелетных мышц на действие РЧ

тока в импульсно-периодическом режиме модуляции зависит от мощности генерируемого тока. Наиболее оптимальным по сочетанию деструктивных и восстановительных процессов является действие РЧ токов мощностью 1.0 Вт, в течение 10 сек. Деструктивные изменения такого воздействия менее выражены по сравнению с обработкой РЧ током мощностью 4.0 Вт и не приводят к массовой гибели клеток. А процессы восстановления, выражающиеся в усилении пролиферации, активации ангиогенеза в коже и формирования новых волокон в скелетных мышцах, протекают более интенсивно, чем при действии токов РЧ диапазона мощностью 0.1 Вт.

Такие параметры воздействия импульсно-периодического тока РЧ диапазона могут быть рекомендованы для использования в дальнейших исследованиях по изучению воздействия РЧ токов на процессы раневого заживления.

### Литература

1. Данилейко Ю.К., Кореева Н.В., Никонов Д.А., Осико В.В., Салюк В.А., Фадеева С.Ю., Шутенко Т.В. Клинический опыт применения токов радиочастотного диапазона в комплексной терапии больных угревой болезнью // Вестник последипломного образования. 2009. №2. С. 8 – 11.
2. Бабурин Н.В., Белов С.В., Данилейко Ю.К., Егоров А.Б., Лебедева Т.П., Нефедов С.М., академик Осико В.В., Салюк В.А. Гетерогенная рекомбинация в плазме водяных паров – как механизм воздействия на биологические ткани // ДАН. 2009. т.426. №4. С. 1 – 3.
3. Поляков О.В. Плотность тока и перенос заряда на межфазной границе тлеющий разряд – электролитный катод // Конденсированные среды и межфазные границы. 2003. Т. 5. № 1. С. 102–105.
8. Buckingham M. Myogenic progenitor cells and skeletal myogenesis in vertebrates // Curr. Opin. Genet. Dev. 2006. V. 16. P. 525–532.
9. Buckingham M. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes // C.R. Biologies. 2007. V. 330. P. 530–533.
10. Charge S.B.P., Rudnicki M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration // Physiol. Rev. 2004. V. 84. P. 209–238.
12. Seale P., Sabourin L.A., Gargis-Gabardo A. et al. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells // Cell. 2000. V. 102. P. 777–786.
13. Seale P., Asakura A., Rudnicki M. The potential of muscle stem cells // Dev. Cell. 2001. V. 1. P. 333–342.
14. Stocum D.L. Regenerative biology and medicine. N.Y.: Acad. Press. 2006. 448 p.