

*На правах рукописи*

**Гришачева Татьяна Георгиевна**

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ  
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ НА СОСУДЫ  
МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Специальность 03.03.01 – Физиология

Санкт-Петербург

2019

Работа выполнена в лаборатории сравнительной физиологии дыхания Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН).

**Научный руководитель:**

**Кривченко Александр Иванович**, член-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией сравнительной физиологии дыхания ИЭФБ РАН

**Официальные оппоненты:**

**Дворецкий Жан Петрович**, член-корр. РАН, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии им. И. П. Павлова Российской академии наук

**Муравьев Алексей Васильевич**, доктор биологических наук, профессор кафедры медико-биологических основ спорта Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный педагогического университета им. К.Д. Ушинского»

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии Российской академии наук

Защита диссертации состоится «11» февраля 2020 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.127.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу: 194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (194223, г. Санкт-Петербург, пр. М. Тореза, 44) и на сайте ИЭФБ РАН: <http://www.iephb.ru/nauka/dissovet/>

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук



Парнова Римма Германовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Фотодинамическая терапия является одним из перспективных и эффективных способов лечения различных заболеваний. Данный метод входит в стандарт специализированной медицинской помощи онкологическим больным, а также применяется для лечения многих неонкологических заболеваний: трофические язвы, артрозы, акне, псориаз, склерозирующий лишай, возрастная макулярная дегенерация и др. (Странадко и др., 2003; 2010; 2013; Гельфонд, 2003; 2007; Fayter et al., 2010; Agostinis et al., 2011; Abdel-Kader, 2014; Каплан и др., 2014; Ozog et al., 2016; Филоненко, Серова, 2016; Mahmoudi et al., 2018; De Annunzio et al., 2019).

Большое значение в реализации терапевтического эффекта при фотодинамическом воздействии имеют изменения микроциркуляции, являющиеся следствием повреждения структурных элементов сосудистой стенки (эндотелий, гладкомышечные клетки, межклеточный матрикс) продуктами фотохимических реакций (Krammer et al., 2001; Michels et al., 2003; Ohlerth et al., 2006; Chen et al., 2006; Maas et al., 2012; Wang et al., 2013).

Для фотодинамической терапии используются фотосенсибилизаторы, значительно отличающиеся между собой по физико-химическим и фотофизическим свойствам, а условия их фотоактивации значительно варьируются (Bonnett, 1995; Moan et al., 1995; Allison et al., 2004; Castano et al., 2004; 2005; Узденский, 2010; Мачинская и др. 2013; Брусов и др., 2015; Abrahamse et al., 2016; De Annunzio et al., 2019). Актуальной задачей, стоящей перед клиницистами, применяющими фотодинамические методы, является выбор оптимального фотосенсибилизатора и режимов его фотоактивации, результат которой приведет к необходимому сосудистому эффекту. Так, при лечении опухолей необходимо добиться ишемического некроза (Bugelski et al., 1981; Reed et al., 1989; Malcolm et al., 1989), а в других случаях, например, при воспалении, воздействие на сосуды не должно приводить к необратимым изменениям микроциркуляции. В инструкциях к препаратам, используемых при фотодинамической терапии, не указывается, в какой степени при их фотоактивации происходят нарушения микроциркуляции. Недостаточно изучены такие вопросы, как особенности эндотелиотропности различных фотосенсибилизаторов, значение режимов облучения, динамика микроциркуляторных нарушений не только в процессе фотодинамического воздействия, но и после его завершения, что важно для прогнозирования направленности, степени выраженности изменений микроциркуляции и оптимизации фотодинамической терапии.

Дальнейшее исследование особенностей сосудистых эффектов фотодинамической терапии при использовании разных фотосенсибилизаторов имеет важное значение для оптимизации протоколов фотодинамической терапии.

**Степень разработанности темы.** В большом количестве клинических и экспериментальных исследований последних лет установлено, что при фотодинамическом лечении опухолей развиваются изменения микроциркуляции как в самой опухоли, так и в окружающих нормальных тканях (Khurana et al., 2008; Wang et al., 2013, Buzzá et al., 2014; Vartista et al., 2017). Уже в процессе фотоактивации в зоне воздействия наблюдаются сужение артериол, адгезия и агрегация тромбоцитов, внутрисосудистая агрегация эритроцитов, образование тромбов и прогрессирующее замедление кровотока вплоть до стаза (Reed et al. 1989; Fingar et al., 1990; 1992; Moshfeghi et al., 2003; Madar-Balakirski et al., 2010; Middelburg et al., 2013; Wang et al., 2013; Buzzá et al., 2014).

Описанные изменения микроциркуляции связаны, главным образом, с дисфункцией эндотелия в зоне проведения фотодинамической терапии (Zhou, 1989; Maas et al., 2012;

Senge et al., 2013). Установлено, что накопление фотосенсибилизаторов в эндотелии сосудов зависит от их химических свойств (полярность, липофильность, гидрофильность, соотношение мономерных, димерных и олигомерных форм) (Strauss et al., 1997; Zheng et al., 2001; Pavani et al., 2009; Узденский, 2016).

Учитывая, что тромбоциты могут являться одной из мишеней при фотодинамической терапии, так как циркулирующий в крови фотосенсибилизатор проникает в клетки крови, то их фотоактивация может иметь значение в механизме спазма сосудов и тромбоза. Данные о влиянии фотодинамического воздействия на агрегационную активность тромбоцитов немногочисленны и весьма противоречивы. В опытах *in vivo* при облучении сосудов микроциркуляторного русла на фоне введения различных фотосенсибилизаторов в зоне воздействия наблюдается адгезия и агрегация тромбоцитов (Zhou, 1989; McMahon et al., 1994; Dolmans et al., 2003; Madar-Balakirski et al., 2010). Предполагается, что их активация происходит вследствие влияния биологически активных веществ (аденозиндифосфат (АДФ), тромбоксан А2 и др.), поступающих из поврежденного эндотелия (Zhou, 1989; Senge et al., 2013). Значение фотодинамического повреждения циркулирующих в крови тромбоцитов в механизме нарушения микроциркуляции при фотодинамической терапии остается не изучено.

**Цель исследования** — сравнительное изучение эффектов действия на микроциркуляцию и функциональную активность тромбоцитов фотосенсибилизаторов различных классов (бенгальский розовый, радахлорин и копропорфирин) при одинаковых условиях фотоактивации.

#### **Задачи исследования:**

- 1) Изучить влияние отдельных компонентов фотодинамической терапии (фотосенсибилизаторов различных классов, лазерного облучения) на параметры микроциркуляции и функциональную активность тромбоцитов.
- 2) Сравнить эффекты фотодинамического воздействия на сосуды брыжейки тонкой кишки крыс фотосенсибилизаторов из разных классов (бенгальский розовый, радахлорин и копропорфирин) при одинаковых условиях фотоактивации.
- 3) Изучить влияние фотодинамического воздействия исследуемых фотосенсибилизаторов на кровоток и реактивность сосудов в коже и сопоставить их с действием на микрососуды брыжейки тонкой кишки крыс.
- 4) Определить влияние фотоактивированных фотосенсибилизаторов на агрегационную активность тромбоцитов в опытах *in vitro* и при фотодинамической модификации крови у крыс.

**Научная новизна.** Впервые изучены особенности сосудистых эффектов в процессе фотодинамического воздействия с использованием различных фотосенсибилизаторов и одинаковых режимов облучения. Получены новые данные об изменении кровотока и реактивности сосудов кожи при фотодинамическом воздействии с использованием различных фотосенсибилизаторов. Впервые показано, что фотодинамическая модификация крови приводит к изменению функциональной активности тромбоцитов, что проявляется в изменении параметров агрегации и дезагрегации.

**Теоретическая и практическая значимость.** Разработанный способ регистрации скорости кровотока позволяет проводить исследования микроциркуляции в процессе фотоактивации фотосенсибилизаторов и после ее завершения для оценки влияния фотодинамического воздействия на кровоток, что может быть использовано для оптимизации протокола фотодинамической терапии при использовании фотосенсибилизаторов для лечения различных заболеваний.

Результаты настоящего исследования расширяют представления о сосудистом механизме действия при фотодинамической терапии и включены в элективный курс для студентов на кафедре физики лечебного факультета «Применение оптических методов в медицине» и в программу циклов повышения квалификации врачей по основам фотодинамической терапии в Центре лазерной медицины Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. При одинаковых условиях фотоактивации фотосенсибилизаторы разных классов (бенгальский розовый, копропорфирин, радахлорин) оказывают ингибирующее влияние на параметры микроциркуляции. Наиболее выраженный эффект оказывает радахлорин.
2. Бенгальский розовый, копропорфирин и радахлорин в условиях *in vitro* ингибируют АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, а их фотоактивация усиливает данный эффект, тогда как само лазерное излучение потенцирует агрегацию тромбоцитов.
3. Фотодинамическая модификация крови интактных крыс оказывает влияние на функциональную активность тромбоцитов, что проявляется в изменении параметров агрегации и дезагрегации.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на Российских и Международных конференциях: Conference ESM–EVBO, 2015, Pisa, Italy; V Всероссийская конференция «Фотодинамическая терапия и фотодиагностика», 2016 г., Москва; Научно-практическая конференция с международным участием "Применение лазеров в медицине. Фотодинамическая терапия", 2016, Москва; II Международная научно-практическая конференция «Экспериментальные и клинические аспекты микроциркуляции и функции эндотелия», 2016 г., Смоленск, Россия; 20th International Vascular Biology meeting (IVBM2018), 2018, Helsinki, Finland; 18th International conference on Laser optics, 2018 Saint-Petersburg, Russia; Joint Conference of Three Societies: European Society for Clinical Hemorheology and Microcirculation International Society of Biorheology International Society for Clinical Hemorheology. 2018, Krakow, Poland; VII Всероссийский конгресс с международным участием по фотодинамической терапии, 2018 г., Москва; 3rd Conference ESM–EVBO, 2019, Maastricht, Netherlands; XII Международная конференция «Микроциркуляция и гемореология», 2019, Ярославль, Россия.

**Личный вклад автора.** Автор лично участвовал в планировании и постановке экспериментов, обработке и интерпретации полученных данных, подготовке публикаций по результатам выполненной работы.

**Публикации.** Материалы диссертации изложены в 17 публикациях, из них 7 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации диссертационных исследований.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 171 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (293 источников). Работа проиллюстрирована 44 рисунками и 21 таблицей.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Экспериментальные животные.** Исследования выполнены на крысах-самцах линии Wistar (ФГУП «Питомник лабораторных животных „РАППОЛОВО“») в возрасте 2–3 месяца, массой 250–350 г. Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с этическими принципами, установленными на основе Директивы Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных научных целей. Общая количественная характеристика объектов исследования представлена в табл. 1.

Таблица 1. Общая количественная характеристика объектов исследования

Проведенные исследования	Количество объектов исследования
<b>Исследование микроциркуляции в брыжейке тонкой кишки крыс</b>	
Интактная группа	10 венул
Группа с введением исследуемых фотосенсибилизаторов	15 венул
Группа с лазерным воздействием	15 венул
Группа с лазерной активацией исследуемых фотосенсибилизаторов	15 венул
<b>Исследование микроциркуляции в коже у крыс</b>	
Интактная группа	25 крыс
Группа с введением исследуемых фотосенсибилизаторов	24 крысы
Группа с лазерным воздействием	24 крысы
Группа с лазерной активацией исследуемых фотосенсибилизаторов	24 крысы
Группа с исследованием кровотока в коже при локальном нагреве	30 крыс
<b>Влияние фотосенсибилизаторов и фотодинамического воздействия на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов <i>in vitro</i></b>	
Контроль	46 проб
PRP+ инкубация с фотосенсибилизатором	74 пробы
PRP+лазерное воздействие <i>in vitro</i>	48 проб
PRP+инкубация с фотосенсибилизатором + лазерное воздействие <i>in vitro</i>	48 проб
<b>Влияние фотодинамической модификации крови на агрегационную активность тромбоцитов</b>	
Контроль	15 крыс
Внутривенное введение фотосенсибилизаторов	16 крыс
Лазерное воздействие на бедренную артерию	16 крыс
Лазерное воздействие на бедренную артерию на фоне внутривенного введения фотосенсибилизаторов	20 крыс

**Исследуемые фотосенсибилизаторы:** Бенгальский розовый (БР), "Acros organics", США; Радахлорин (РХ) "Радафарма", РФ; Копропорфирин (КП), "Элест", РФ.

**Источники лазерного излучения.** Выбор источников лазерного излучения был обусловлен спектральными характеристиками используемых фотосенсибилизаторов (ФС). Для активации бенгальского розового использовали твердотельный лазер с непрерывной генерацией (DPSS Laser, Республика Южная Корея) с длиной волны  $\lambda=532$  нм,

максимальная мощность — 60 мВт; или полупроводниковый лазер с непрерывной генерацией ("Алком медика - Изумруд", Россия) с длиной волны  $\lambda=530$  нм; максимальная мощность — 4 Вт. Для активации копропорфирина использовали полупроводниковый лазер с непрерывной генерацией («Лакта Милон», Россия) с длиной волны  $\lambda=635$  нм; максимальная мощность — 0,5 Вт. В экспериментах с фотоактивацией радахлорина использовали полупроводниковый лазер с непрерывной генерацией ("Алком медика - Гранат", Россия) с длиной волны  $\lambda=662$  нм; максимальная мощность — 2 Вт. В контрольных исследованиях было изучено действие лазерных источников в тех же энергетических параметрах только без предварительного введения ФС.

**Исследование микроциркуляции в брыжейке тонкой кишки крыс.** Исследование микроциркуляции в брыжейке тонкой кишки крыс проводили с использованием метода прижизненной биомикроскопии. Объект исследования: вены диаметром 20–40 мкм с исходной скоростью кровотока от 4 до 9 мм/с. После наркотизирования у крыс через нижнесрединный доступ извлекали петлю тонкой кишки, примыкающую к мезоаппендиксу. Для визуальной фиксации скорости кровотока использовали микроскоп (Wild M420, Швейцария), объектив (Makrozoom 6.3–32x), быстродействующую цифровую камеру (Basler acA2000-165uc USB3.0, Германия) с матрицей CMOSIS CMV2000 (165 кадров/с). Схема проведения экспериментов подразумевала запись исходного кровотока в течение 180 с, регистрация скорости кровотока во время лазерного воздействия (300 с) и регистрация скорости кровотока после лазерного воздействия (300 с).

**Концентрация фотосенсибилизаторов и протокол лазерного воздействия.** Все фотосенсибилизаторы вводились внутривенно: бенгальский розовый — 17 мг/кг за час до исследования или лазерного воздействия; копропорфирин — 10 мг/кг за 3 часа до исследования или лазерного воздействия; радахлорин — 5 мг/кг за 3 часа до исследования или лазерного воздействия. Лазерное излучение вводили в оптическую систему микроскопа с помощью световода — макролинзы («Полироник», Россия) и фокусировали на одну вену диаметром пятна — 170–200 мкм в зоне наблюдения. Параметры лазерного воздействия в исследовании микроциркуляции в брыжейке тонкой кишки крыс приведены в таблице 2.

Таблица 2. Протокол лазерного воздействия в исследовании микроциркуляции в брыжейке тонкой кишки крыс

Длина волны, нм	Режим генерации	Мощность в плоскости объекта*, мкВт	Диаметр пятна на объекте, мкм	Плотность мощности в плоскости объекта, Вт/см <sup>2</sup>	Плотность энергии в течение 5 мин экспозиции, Дж/см <sup>2</sup>
532	непрерывный	29	170	0,12	36
635	непрерывный	34	200	0,1	30
662	непрерывный	35	200	0,11	33,4
* — мощность лазерного излучения в плоскости объекта контролировали с помощью измерителя мощности (Advantest Q8230, США) перед каждым экспериментом.					

**Исследование микроциркуляции в коже у крыс.** Исследование микроциркуляции в коже у крыс проводилось методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ). Наркотизированных крыс помещали на термостатируемый столик Physitemp TCAT-2LV с ректальным датчиком температуры. Температуру кожи (в зоне лазерного воздействия) в ходе эксперимента измеряли инфракрасным термометром AND DT-635 (Япония). С помощью флоуметра Transonic Laser Doppler Monitor BLF21 (Transonic Systems Inc., США) исследуется участок ткани объёмом 1 мм<sup>3</sup>, на глубину до 1 мм. Флоуметр позволяет

исследовать тканевую перфузию от 0 до 100 мл/мин на 100 г ткани. Результаты показателя кровотока кожи приведены в перфузионных единицах (пф. ед.).

Схема проведения экспериментов:

- регистрация исходного кровотока и температуры кожи до воздействия;
- регистрация кровотока и температуры кожи сразу после лазерного воздействия;
- регистрация кровотока и температуры кожи через час после лазерного воздействия.

**Концентрация фотосенсибилизаторов и протокол лазерного воздействия.** Концентрацию и способ введения исследуемых ФС использовали такой же, как и в предыдущем исследовании. Излучение от полупроводниковых лазеров подводили при помощи световода с линзой для наружного облучения («Полироник», Россия). Диаметр пятна на коже 1 см. Протокол лазерного воздействия на кожу в опытах с лазерными источниками с длинами волн – 532; 635; 662 нм в непрерывном режиме генерации: мощность — 0,3 Вт; плотность мощности — 0,38 Вт/см<sup>2</sup>; время облучения — 13 мин; плотность энергии — 300 Дж/см<sup>2</sup>.

**Исследование кровотока в коже при локальном нагреве.** Исследование показателя кровотока в коже при локальном нагреве проводили с помощью регулируемого нагревательного элемента до температур, регистрируемых при лазерном облучении кожи от 39 до 44 °С.

**Исследование влияния фотосенсибилизаторов и фотодинамического воздействия на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*.** Агрегационную активность тромбоцитов исследовали турбидиметрическим методом по *Вопп* с помощью агрегометра АТ-01 (Россия). В качестве индуктора агрегации использовали АДФ (CHRONO-LOG Corporation, США) в конечной концентрации 1,25 мМ.

На первом этапе исследовали влияние ФС в разной концентрации на тромбоциты в опытах *in vitro*. Для этого в стандартную по тромбоцитам PRP (270 мкл) добавляли ФС в разной концентрации и после 5-минутной инкубации в темноте определяли АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

На втором этапе эксперимента в плазму, содержащую стандартное число тромбоцитов (270 мкл), вводили ФС в определенной концентрации (БР – 5 мкг/мл; КП — 18 мкг/мл; РХ — 14 мкг/мл), после 5 минутной инкубации в темноте пробу подвергали лазерной активации и определяли агрегационную активность тромбоцитов. В группе сравнения (PRP без ФС) исследовали влияние лазерного воздействия на агрегацию тромбоцитов в той же дозе.

Пробы PRP подвергали лазерному воздействию в темноте с помощью полупроводниковых лазерных аппаратов (532; 635; 662 нм). Торец световода для наружного облучения, закрепленный на штативе, располагали на расстоянии 10 мм от поверхности пластиковой кюветы, в которой содержалась проба. Параметры лазерного воздействия: мощность — 0,5 Вт; диаметр пятна на объекте облучения — 3,5 см; плотность мощности — 0,05 Вт/см<sup>2</sup>; плотность энергии 6 Дж/см<sup>2</sup> (время облучения 2 мин); плотность энергии 12 Дж/см<sup>2</sup> (время облучения 4 мин); плотность энергии 24 Дж/см<sup>2</sup> (время облучения 8 мин); плотность энергии 48 Дж/см<sup>2</sup> (время облучения 16 мин).

**Исследование влияния фотодинамической модификации крови у крыс на агрегационную активность тромбоцитов.** В данной серии опытов ненаркотизированным крысам внутривенно вводили ФС в концентрации: БР 17 мг/кг, забор крови через 1 час; КП 10 мг/кг, забор крови через 3 ч; РХ 5 мг/кг, забор крови через 3 ч. После забора крови ее



центрифугировали, получали стандартную по тромбоцитам плазму и исследовали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

Для изучения влияния фотоактивированных ФС на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, после внутривенного введения ФС подвергали лазерному воздействию бедренную артерию крыс. В качестве группы сравнения была исследована агрегационная активность тромбоцитов у крыс на фоне лазерного воздействия без предварительного введения ФС.

Для облучения бедренной артерии после введения ФС производили разрез длиной около 2 см на внутренней поверхности правого бедра животного. Участок бедренной артерии длиной 5 мм освобождали от соединительной ткани и выделяли из сосудисто-нервного пучка. Исследование кровотока в бедренной артерии проводили при помощи высокочастотной ультразвуковой доплерографии ("Минимакс-Допплер-К", частота датчика 20 МГц). Скорость кровотока оценивали непосредственно перед лазерным воздействием и после. Критерием фотодинамического эффекта во время облучения бедренной артерии было резкое снижение кровотока.

Параметры лазерного воздействия для лазерного источника излучения 532 нм: мощность – 60 мВт; диаметр пятна – 2 мм; плотность мощности – 1,9 Вт/см<sup>2</sup>; время лазерного воздействия – 30 мин; плотность энергии – 3 420 Дж/см<sup>2</sup>. Параметры лазерного воздействия для лазерных источников излучения 635 и 662 нм: мощность – 0,1 Вт; диаметр пятна – 2 мм; плотность мощности – 3,2 Вт/см<sup>2</sup>; время лазерного воздействия – 15 мин; плотность энергии – 2 880 Дж/см<sup>2</sup>. После лазерного воздействия производили забор крови и исследовали АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.

**Статистическая обработка данных.** Сбор данных осуществлялся с помощью табличного процессора Microsoft Excel 2007. Количественные данные проверялись на соответствие нормального распределения с использованием W-критерия Шапиро-Уилка. Если распределение было нормальным, то исследовался дисперсионный анализ с повторными измерениями (Mixed ANOVA). Если распределение не соответствовало нормальному, то использовали непараметрический критерий Манна-Уитни или дисперсионный анализ на рангах с последующим сравнением групп по критерию Данна. Числовые данные, приводимые в исследованиях скорости кровотока в брыжейке тонкой кишки крыс и исследованиях агрегационной активности тромбоцитов представлены как медиана (нижний квартиль/верхний квартиль) и в виде процентов по отношению к исходному значению. В опытах с кровотоком в коже данные представлены в виде среднего арифметического ( $M$ ) ± ошибка среднего ( $m$ ) и в виде процентов по отношению к исходному (контрольному) значению. О значимости установленных различий судили по уровню значений  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### **Влияние неактивированных фотосенсибилизаторов на скорость кровотока в венах брыжейки тонкой кишки крыс**

Медиана скорости кровотока в венах ( $d=20-40$  мкм) брыжейки тонкой кишки у интактных крыс составила 5016 (4220–5344) мкм/с. Внутривенное введение ФС не

приводило к значимым изменениям скорости кровотока относительно исходных значений и по сравнению с группой с интактными животными.

### **Влияние лазерного излучения на скорость кровотока в венах брыжейки тонкой кишки крыс**

При облучении венул лазерным источником света в зеленом диапазоне длин волн (мощность 29 мкВт, диаметр пятна 170 мкм, плотность мощности 0,12 Вт/см<sup>2</sup>) после пятиминутной экспозиции, что соответствует 36 Дж/см<sup>2</sup>, не происходило значимого изменения медианы скорости кровотока. При лазерном облучении 635 нм (мощность 34 мкВт, плотность мощности в плоскости объекта 0,1 Вт/см<sup>2</sup>) через 4 мин после начала облучения, что соответствует 24 Дж/см<sup>2</sup>, увеличение медианы скорости кровотока по сравнению с исходной скоростью составило 15,1 % ( $p < 0,05$ ). В опытах при лазерном облучении венул в диапазоне длин волн 662 нм (мощность 35 мкВт, плотность мощности в плоскости объекта 0,11 Вт/см<sup>2</sup>) к 3 мин после начала облучения, что соответствует 18 Дж/см<sup>2</sup> медиана скорости кровотока увеличилась на 12,5 % ( $p < 0,05$ ). Скорость кровотока продолжала увеличиваться и после прекращения лазерного воздействия.

Таким образом, облучение в красном диапазоне (635, 662 нм) приводило к значимому увеличению скорости кровотока, что согласуется с данными литературы (Дворецкий и др., 2004; Черток и др., 2007). Значимых изменений в скорости кровотока при облучении в зеленой области не зарегистрировано.

### **Влияние активированных светом фотосенсибилизаторов на скорость кровотока в венах брыжейки тонкой кишки крыс**

Во всех опытах с активированными ФС происходило замедление кровотока в венах вплоть до полной остановки на фоне нарушения суспензионной стабильности крови — внутрисосудистая агрегация клеток крови, образование сладжей, формирования тромба. Степень выраженности этих изменений и скорость их развития зависели от исследуемого ФС. В опытах с РХ уже на 2 мин облучения было зарегистрировано снижение скорости кровотока на 54,1 % (очень короткий латентный период) и полностью прекратился через 3 мин облучения. К этому времени суммарная плотность энергии составляла 20 Дж/см<sup>2</sup>, в опытах с КП и БР при той же набранной дозе только начиналось замедление скорости кровотока (рис. 1). Самый продолжительный латентный период наблюдался в опытах с КП, снижение кровотока наблюдали на 4-мин лазерной экспозиции, что соответствует 24 Дж/см<sup>2</sup>. Полная остановка кровотока наблюдалась к концу периода наблюдения только в части экспериментов.

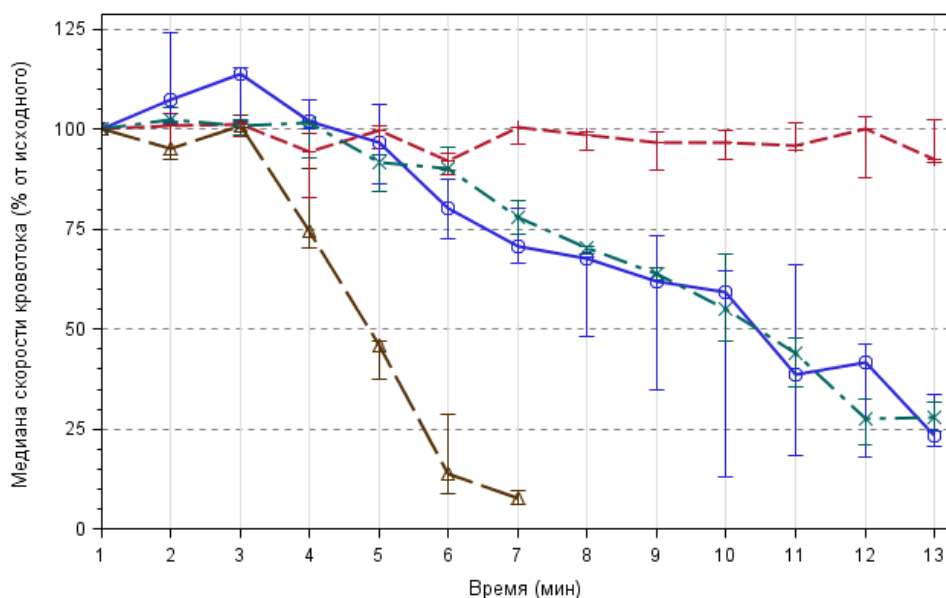


Рис. 1. Медиана скорости кровотока (в % к исходному значению): красный — контроль; зеленый — введение КП+облучение 635 нм; синий — введение БР+облучение 535 нм; коричневый — введение РХ+облучение 662 нм

### Влияние неактивированных фотосенсибилизатора на кровоток в коже крыс

Внутривенное введение БР, КП и РХ без их фотоактивации не приводит к изменению показателя кровотока в коже по сравнению с исходными значениями.

### Влияние лазерного облучения на кровоток в коже крыс

Лазерное облучение кожи (532 нм, 300 Дж/см<sup>2</sup>) приводит к снижению кровотока на 25,4% ( $p < 0,05$ ) на фоне локальной гипертермии до  $44,7 \pm 0,28$  °С сразу после воздействия ( $p < 0,01$ ). Через час после лазерного воздействия температура кожи вернулась к исходным значениям, а показатели кровотока оставались сниженными (табл. 3).

В группе крыс, которые подвергались облучению 635 нм (300 Дж/см<sup>2</sup>), наблюдалось повышение температуры кожи до  $43,95 \pm 0,24$  °С сразу после воздействия ( $p < 0,01$ ). Показатели кровотока в коже при этом увеличились на 10,2 % ( $p < 0,05$ ). В месте воздействия наблюдалась гиперемия сразу после облучения. Через час после лазерного воздействия температура кожи вернулась к исходным значениям, а показатели кровотока увеличились на 15,9 % по сравнению с исходными значениями ( $p < 0,05$ ).

Лазерное облучение кожи (662 нм, 300 Дж/см<sup>2</sup>) приводит к повышению кровотока на 20,3% ( $p < 0,05$ ) на фоне локальной гипертермии кожи до  $40,9 \pm 0,23$  °С. Через час после облучения температура в коже вернулась к исходному значению, а показатели тканевого кровотока были по-прежнему значимо выше по сравнению с исходным значением (табл. 3).

Таблица 3. Влияние излучения (662; 635, 530 нм) на кровоток в коже крыс

Группа	Фоновое значение		Значения сразу после облучения		Значения через 1 час после облучения	
	кровоток в коже, пф. ед.	температура кожи, °С	кровоток в коже, пф. ед.	температура кожи, °С	кровоток в коже, пф. ед.	температура кожи, °С
Контроль (n=25)	5,11±0,18	34,62±0,11	5,14±0,17	34,7±0,11	5,3±0,19	34,71±0,1
530 нм (n=8)	4,65±0,35 <sup>#</sup>	34,46±0,09	<b>3,47±0,22<sup>*#</sup></b>	<b>44,66±0,28<sup>**##</sup></b>	<b>3,8±0,22<sup>*#</sup></b>	35,2±0,18
635 нм (n=8)	5,19±0,19	34,5±0,17	<b>5,71±0,17<sup>*#</sup></b>	<b>43,95±0,24<sup>**##</sup></b>	<b>6,02±0,19<sup>*#</sup></b>	34,77±0,23
662 нм (n=8)	5,02±0,4	34,52±0,13	<b>6,04±0,55<sup>*#</sup></b>	<b>40,97±0,23<sup>**##</sup></b>	<b>6,05±0,18<sup>*#</sup></b>	35,32±0,09

Примечание: \* — p<0,05 по сравнению с фоновыми значениями; \*\* — p<0,01 по сравнению с фоновыми значениями; # — p<0,05 по сравнению с контролем; ## — p<0,01 по сравнению с контролем.

**Исследование кровотока в коже при локальном нагреве.** Дополнительно было проведено исследование показателя кровотока в коже при локальном нагреве с помощью регулируемого нагревательного элемента до температур, регистрируемых при лазерном облучении кожи. Локальный нагрев кожи от 39 до 44 °С приводил к увеличению показателя кровотока в коже (рис. 2). Локальный нагрев кожи приводит к значимому усилению кровотока сразу после воздействия, а через час данные кровотока сопоставимы с фоновыми значениями. При лазерном облучении в диапазоне длин волн 532 нм происходит нагрев кожи, но показатели перфузии значимо снижаются по сравнению с исходными значениями. Через час кровотока показатели кровотока не восстанавливались. При облучении в красном диапазоне длин волн (635 нм и 662 нм) разогрев кожи приводил к увеличению перфузии в тканях, однако через час после воздействия не возвращался к исходным значениям. Следовательно, полученные эффекты действия лазерного излучения на кожу не связаны с прямым действием тепла.

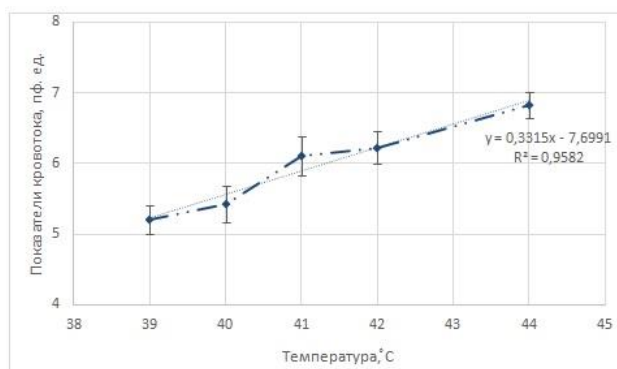


Рис. 2. Изменения показателя кровотока в коже сразу после локального нагрева с помощью регулируемого нагревательного элемента до заданных температур от 39 до 44 °С.

### Влияние фотоактивированных фотосенсибилизаторов на кровотоки в коже крыс

Фотоактивация БР (532 нм; 0,38 Вт/см<sup>2</sup>; 13 мин; 300 Дж/см<sup>2</sup>) приводит к снижению кровотока на 60,4 % ( $p < 0,01$ ). Температура кожи в этот момент составляла  $44,9 \pm 0,39$  °С. Через час скорость кровотока оставалась на том же уровне, что и сразу после облучения и составила  $1,79 \pm 0,3$  пф. ед. ( $p < 0,01$ ). Температура кожи через час после воздействия не отличалась от фоновых значений (рис. 3).

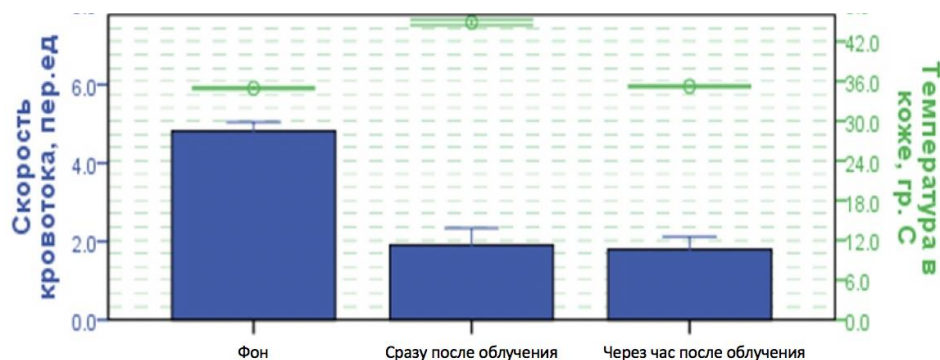


Рис. 3. Влияние фотоактивированного бенгальского розового (17 мг/кг) на кровотоки в коже крыс. Синяя диаграмма — значения показателя кровотока: исходные значения (фон); сразу после лазерного воздействия и через час после фотоактивации (пф. ед.). Зеленая — значения температуры кожи в зоне лазерного воздействия (°С)

Фотоактивация КП в зоне лазерного воздействия приводит к снижению кровотока на 13,6% ( $p < 0,05$ ), на фоне локальной гипертермии  $44,22 \pm 0,22$  С° (рис. 4). Через час после облучения скорость кровотока снизилась до  $3,58 \pm 0,34$  пф.ед. ( $p < 0,01$ ).

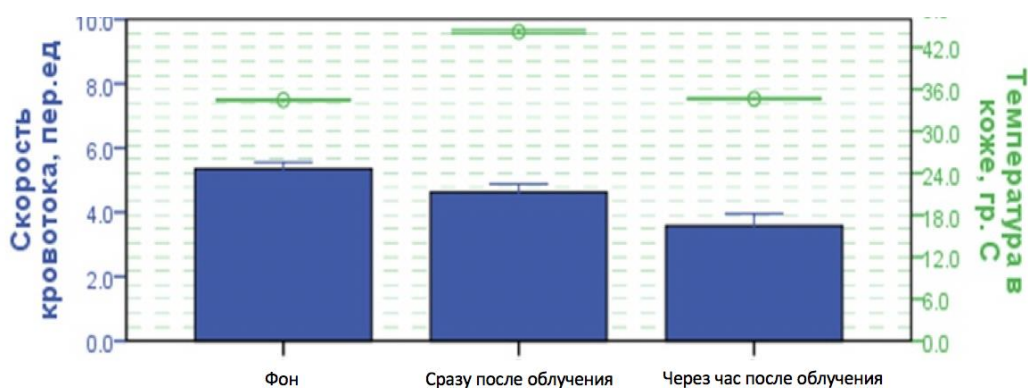


Рис. 4. Влияние фотоактивированного копропорфирина (10 мг/кг) на кровотоки в коже крыс. Синяя диаграмма — значения показателя кровотока: исходные значения (фон); сразу после лазерного воздействия и через час после фотоактивации (пф. ед.). Зеленая — значения температуры кожи в зоне лазерного воздействия (°С)

Сразу после облучения (662 нм; 0,38 Вт/см<sup>2</sup>; 13 мин; 300 Дж/см<sup>2</sup>) на фоне предварительного введения РХ наблюдалось снижение перфузии до  $1,52 \pm 0,35$  пф. ед. ( $p < 0,01$ ). Температура кожи сразу после лазерного облучения составила  $40,82 \pm 0,27$  °С. Через час после облучения температура кожи была  $34,86 \pm 0,15$  °С, восстановления показателей кровотока не наблюдали (рис. 5).

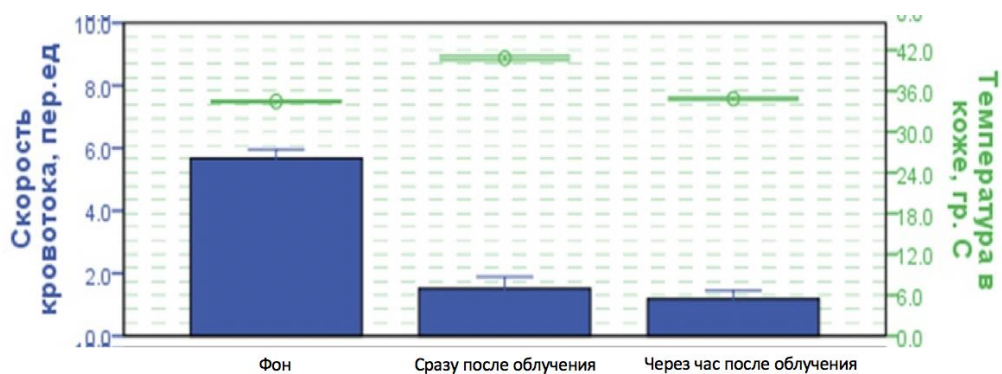


Рис. 5. Влияние фотоактивированного радахлорина (5 мг/кг) на кровоток в коже крыс. Синяя диаграмма — значения показателя кровотока: исходные значения (фон); сразу после лазерного воздействия и через час после фотоактивации (пф. ед.). Зеленая — значения температуры кожи в зоне лазерного воздействия (°С)

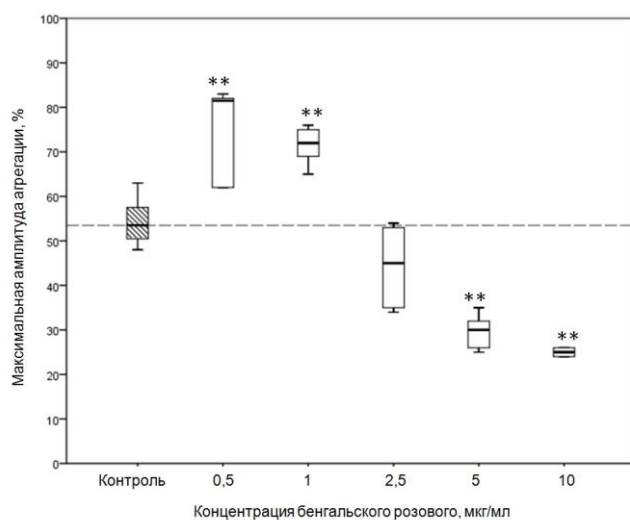
Таким образом, облучение на фоне предварительного введения фотосенсибилизаторов приводит к значимому снижению кровотока сразу после воздействия, и эффект сохраняется через час. Температура кожи сразу после облучения в этой группе животных повышалась также, как и в группе облучения без ФС. Наиболее выраженное снижение перфузии наблюдалось в опытах с РХ и БР. В опытах с КП тоже происходило снижение перфузии, но реакция была не такая выраженная, что говорит о меньшей эндотелиотропности этого препарата.

### Влияние фотосенсибилизаторов на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в опытах *in vitro*

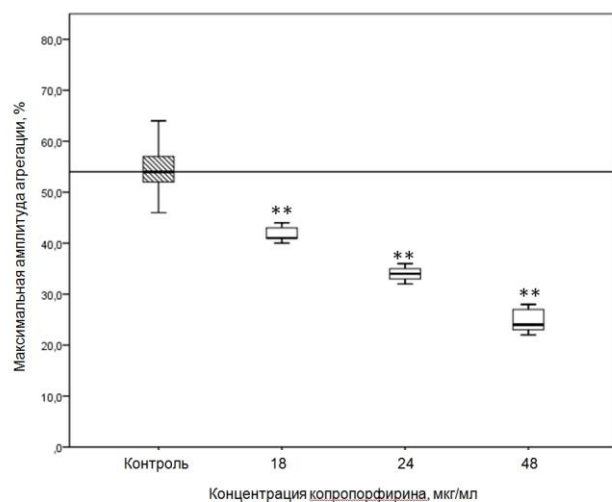
В первой серии исследований в опытах *in vitro* ФС в разных концентрациях добавляли в плазму, содержащую стандартное количество тромбоцитов. После 5-минутной инкубации в темноте пробу помещали в кюветный блок агрегометра.

После 5-мин инкубации PRP с БР в концентрации 0,5 и 1 мкг/мл максимальное светопропускание увеличилось на 52,3 и 34,6 % соответственно по сравнению с контролем ( $p < 0,01$ ). Увеличение концентрации БР до 5 и 10 мкг/мл привело к снижению интенсивности агрегации тромбоцитов на 43,9 и 53,3 %, соответственно (рис. 6, а). Скорости агрегации и дезагрегации значимо уменьшались ( $p < 0,01$ ).

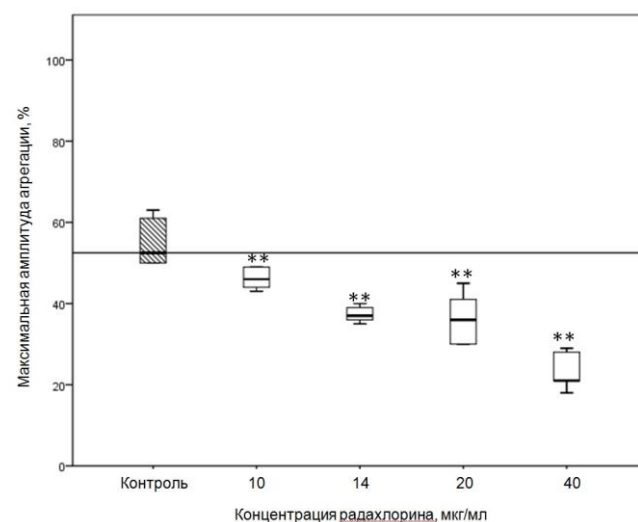
После 5-минутной инкубации PRP с КП агрегационная активность тромбоцитов дозозависимо снижалась с увеличением концентрации КП (рис. 6, б). Так, при концентрации 18 мкг/мл интенсивность агрегации снизилась на 24,1 %; при 24 мкг/мл на 37 %; при 48 мкг/мл — 55,6 % (коэффициент Спирмена  $r = -0,678$ ,  $p < 0,0001$ ). Процессы агрегации и дезагрегации значимо замедлялись, коэффициент Спирмена  $r = -0,8$  для скорости агрегации тромбоцитов;  $r = -0,798$  для скорости дезагрегации тромбоцитов ( $p < 0,0001$ ).



**a**



**б**



**в**

Рис. 6. Влияние бенгальского розового (а), копропорфирина (б), радахлорина (в) на интенсивность агрегации в зависимости от разной концентрации ФС. \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем.

После 5-минутной инкубации PRP с РХ интенсивность агрегации тромбоцитов дозозависимо уменьшалась (коэффициент Спирмена  $r = -0,937$ ;  $p < 0,0001$ ), скорость агрегации и дезагрегации значительно замедлились, ( $r = -0,919$  и  $r = -0,925$  соответственно). В частности, при концентрации РХ 10 мкг/мл максимальная амплитуда агрегации снизилась

на 12,4 %; при 14 мкг/мл на 29,5 %; при 20 мкг/мл на 31,4 %; при 40 мкг/мл – 60 % (рис. 6, в). Эти данные согласуются с данными литературы (Park et al., 2013).

### Влияние лазерного облучения на агрегационную активность тромбоцитов

В этой серии опытов пробы PRP подвергали лазерному воздействию в дозах от 6 до 48 Дж/см<sup>2</sup>. Лазерное облучение 532 нм во всех дозах стимулирует агрегационную активность тромбоцитов, при этом не выявлено четкой зависимости от дозы излучения.

После облучения PRP 635 нм в дозе 12 Дж/см<sup>2</sup> интенсивность агрегации тромбоцитов увеличилась на 42,6 % по сравнению с контролем (p<0,01). Значимо увеличилась скорость агрегации тромбоцитов на 76,2 %. Дальнейшее увеличение дозы до 24 Дж/см<sup>2</sup> также увеличивало интенсивности агрегационной активности, однако уже в меньшей степени, чем при облучении 12 Дж/см<sup>2</sup>. Лазерное излучение при дозе 48 Дж/см<sup>2</sup> не приводило к росту интенсивности агрегации тромбоцитов, но достижение максимальной амплитуды происходило быстрее. При этом скорость дезагрегации значимо уменьшалась на 46,7 % по сравнению с необлученной контрольной группой (p<0,05).

После лазерного облучения 662 нм в дозах 12 и 24 Дж/см<sup>2</sup> интенсивность и скорость агрегации значимо увеличились. Скорость дезагрегации при этом не изменялась.

При сопоставимой дозе 12 Дж/см<sup>2</sup> в разных диапазонах длин волн наиболее выраженное действие на интенсивность агрегации тромбоцитов оказывает излучение 532 нм (рис.7).

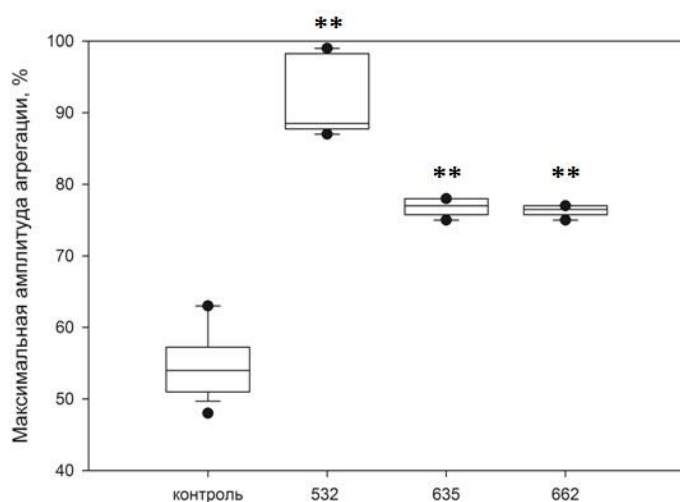


Рис. 7. Влияние лазерного излучения 532; 635 и 662 нм (0,05 Вт/см<sup>2</sup>, 12 Дж/см<sup>2</sup>) на агрегационную активность тромбоцитов. \*\* – p<0,01 по сравнению с контролем. Лазерное облучение (532; 635; 662 нм) плазмы, содержащей стандартное число тромбоцитов, приводит к значимому увеличению агрегационной активности

### Влияние фотодинамического воздействия на агрегационную активность тромбоцитов

В этой серии опытов после 5-минутной инкубации PRP с ФС в темноте, пробы подвергали лазерному воздействию в тех же дозах, что и в опытах без ФС.

Лазерная активация 532 нм PRP на фоне инкубации с БР (5 мкг/мл) приводила к уменьшению интенсивности агрегации тромбоцитов, особенно при максимальной дозировке света (24 Дж/см<sup>2</sup>) на 26,2 % по сравнению с контролем (p<0,01), в то время как облучение без БР усиливало интенсивность агрегации на 90,7 % (p<0,01). Фотодинамическое воздействие оказало влияние и на кинетику процесса. Зафиксированы уменьшения скорости агрегации и дезагрегации тромбоцитов (табл. 4).



Таблица 4. Влияние фотодинамического воздействия в опытах с бенгальским розовым на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*

Группа	Показатели агрегации		
	Максимальная амплитуда агрегации (МА), %	Скорость агрегации, %/с	Скорость дезагрегации, %/с
Контроль (n=18)	53,5 (50,5–57,5)	0,36 (0,33–0,39)	0,23 (0,22–0,25)
БР (5 мкг/мл) (n=6)	<b>30 (26–32)**</b>	<b>0,19 (0,18–0,2)**</b>	<b>0,12 (0,1–0,13)**</b>
Облучение 12 Дж/см <sup>2</sup> (n=6)	<b>88,5 (88–98)**</b>	0,41 (0,4–0,51)	0,22 (0,18–0,32)
Облучение 24 Дж/см <sup>2</sup> (n=6)	<b>102 (81–104)**</b>	0,49 (0,34–0,55)	0,23 (0,19–0,3)
БР+Облучение 12 Дж/см <sup>2</sup> (n=6)	<b>49,5 (38–53) ##<math>\Delta\Delta</math></b>	<b>0,23 (0,18–0,25) **<math>\Delta\Delta</math></b>	<b>0,1 (0,08–0,1) **##<math>\Delta\Delta</math></b>
БР+Облучение 24 Дж/см <sup>2</sup> (n=6)	<b>39,5 (34–43) **##<math>\Delta\Delta</math></b>	<b>0,22 (0,21–0,24) **##<math>\Delta\Delta</math></b>	<b>0,12 (0,1–0,13) **<math>\Delta\Delta</math></b>

Примечание: n — число проб с PRP; \* – p<0,05 по сравнению с контролем; \*\* – p<0,01 по сравнению с контролем; # — p<0,05 по сравнению с БР; ## — p<0,01 по сравнению с БР;  $\Delta$  — p<0,05 по сравнению с облучением;  $\Delta\Delta$  – p<0,01 по сравнению с облучением.

Таким образом, БР в концентрации 5 мкг/мл оказывал ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, облучение (532 нм, 12 Дж/см<sup>2</sup>) без ФС приводило к стимулирующему действию, а при фотоактивации БР не наблюдается стимуляция тромбоцитов (рис. 8). На основании полученных данных, можно предположить, что фотодинамическое воздействие ингибирует механизмы, лежащие в основе стимуляции агрегации тромбоцитов.

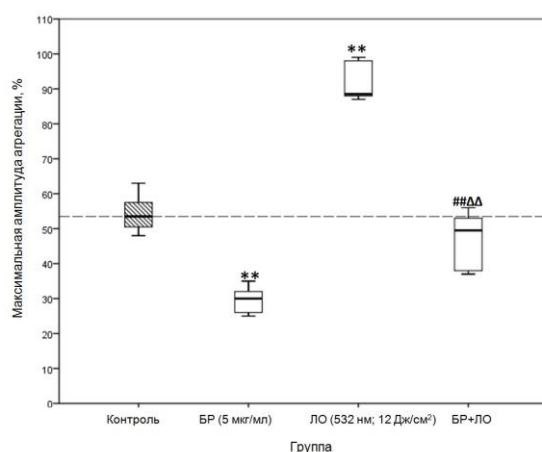


Рис. 8. Влияние БР (5 мкг/мл); лазерного излучения 532 нм (12 Дж/см<sup>2</sup>); лазерного излучения 532 нм (12 Дж/см<sup>2</sup>) на фоне предварительного добавления в PRP БР (5 мкг/мл) на показатель максимальной амплитуды агрегации тромбоцитов: \*\* – p<0,01 по сравнению с контролем; ## — p<0,01 по сравнению с БР;  $\Delta\Delta$  – p<0,01 по сравнению с группой облучения.

Лазерное облучение 635 нм PRP на фоне предварительной инкубации с КП (18 мкг/мл) приводило к значимому снижению максимальной амплитуды агрегации тромбоцитов. Так, при набранной дозе лазерного излучения 12 Дж/см<sup>2</sup> интенсивность агрегации снизилась на 31,5 % по сравнению с контролем. Увеличение дозы облучения приводило к еще более выраженному ингибирующему эффекту и уменьшению скорости

агрегации и дезагрегации тромбоцитов (табл. 5). Как видно из диаграммы на рис. 9, инкубация с КП приводит к ингибирующему эффекту, а лазерная фотоактивация усиливает этот эффект и отменяет стимулирующее действие лазерного излучения 635 нм, так как приводит к еще более выраженному ингибирующему эффекту, чем в группе с КП без лазерного воздействия.

Таблица 5. Влияние фотодинамического воздействия в опытах с копропорфирином на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*

Группа	Показатели агрегации		
	Максимальная амплитуда агрегации (МА), %	Скорость агрегации, %/с	Скорость дезагрегации, %/с
Контроль (n=24)	54 (52–57)	0,42 (0,39–0,49)	0,3 (0,25–0,34)
КП (18 мкг/мл) (n=6)	<b>41(41–43)**</b>	<b>0,29 (0,28–0,3)**</b>	<b>0,18 (0,17–0,21)**</b>
Облучение 12 Дж/см <sup>2</sup> (n=6)	<b>77 (76–78)**</b>	<b>0,74 (0,73–0,9)**</b>	0,37 (0,3–0,39)
Облучение 24 Дж/см <sup>2</sup> (n=6)	<b>60 (58–61)*</b>	<b>0,55 (0,48–0,65)*</b>	0,23 (0,22–0,28)
КП+Облучение 12 Дж/см <sup>2</sup> (n=6)	<b>37(36–37)** ##ΔΔ</b>	<b>0,31 (0,3–0,34)**</b> ΔΔ	<b>0,2 (0,2–0,22)** ΔΔ</b>
КП+Облучение 24 Дж/см <sup>2</sup> (n=6)	<b>30 (28–34)** ##ΔΔ</b>	<b>0,36 (0,31–0,37)** #ΔΔ</b>	<b>0,22 (0,21–0,22)**</b>

Примечание: n — число проб с PRP; \* — p<0,05 по сравнению с контролем; \*\* — p<0,01 по сравнению с контролем; # — p<0,05 по сравнению с КП; ## — p<0,01 по сравнению с КП; Δ — p<0,05 по сравнению с облучением; ΔΔ — p<0,01 по сравнению с облучением.

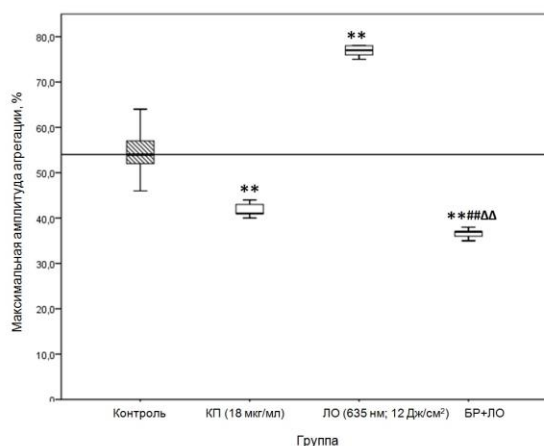


Рис. 9. Влияние КП (18 мкг/мл); лазерного излучения 635 нм (12 Дж/см<sup>2</sup>); лазерного излучения 635 нм (12 Дж/см<sup>2</sup>) на фоне предварительного добавления в PRP КП (18 мкг/мл) на показатель максимальной амплитуды агрегации тромбоцитов. \*\* — p<0,01 по сравнению с контролем; ## — p<0,01 по сравнению с КП; ΔΔ — p<0,01 по сравнению с группой облучения.

Лазерное облучение PRP после 5-минутной инкубации с РХ (14 мкг/мл) приводило к уменьшению интенсивности агрегации тромбоцитов, особенно при дозе 24 Дж/см<sup>2</sup>, показатель максимальной амплитуды агрегации тромбоцитов уменьшился на 65,7 %. Замедлялся процесс агрегации тромбоцитов. Так при облучении 12 Дж/см<sup>2</sup> скорость уменьшилась на 78,6 %, а при дозе 24 Дж/см<sup>2</sup> — 83,3 % (p<0,01). Дезагрегация на фоне фотоактивации РХ отсутствовала (табл. 6).

Таблица 6. Влияние фотодинамического воздействия в опытах с радахлорином на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro*

Группа	Показатели агрегации		
	Максимальная амплитуда агрегации (МА), %	Скорость агрегации, %/с	Скорость дезагрегации, %/с
Контроль (n=10)	52,5 (50–61)	0,42 (0,38–0,43)	0,31 (0,25–0,33)
РХ (14 мкг/мл) (n=6)	<b>37 (36–39)**</b>	<b>0,28 (0,26–0,29)**</b>	<b>0,13 (0,13–0,14)**</b>
Облучение 12 Дж/см <sup>2</sup> (n=5)	<b>76 (76–77)**</b>	<b>0,59 (0,57–0,64)**</b>	0,34 (0,32–0,34)
Облучение 24 Дж/см <sup>2</sup> (n=5)	<b>81 (81–82)**</b>	<b>0,8 (0,74–0,82)**</b>	0,3 (0,29–0,33)
РХ+Облучение 12 Дж/см <sup>2</sup> (n=6)	<b>29 (26–30)** ##Δ</b>	<b>0,09 (0,08–0,15)** ##Δ</b>	—
РХ+Облучение 24 Дж/см <sup>2</sup> (n=6)	<b>18 (8–18)** ##Δ</b>	<b>0,07 (0,02–0,09)** ##Δ</b>	—

Примечание: n — число проб с PRP; \* – p<0,05 по сравнению с контролем; \*\* – p<0,01 по сравнению с контролем; # — p<0,05 по сравнению с РХ; ## — p<0,01 по сравнению с РХ; Δ — p<0,05 по сравнению с облучением; ΔΔ – p<0,01 по сравнению с облучением.

Таким образом, фотоактивация РХ усиливает ингибирующее действие самого фотосенсибилизатора и отменяет стимулирующее действие лазерного излучения 662 нм на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов крыс (рис. 10).

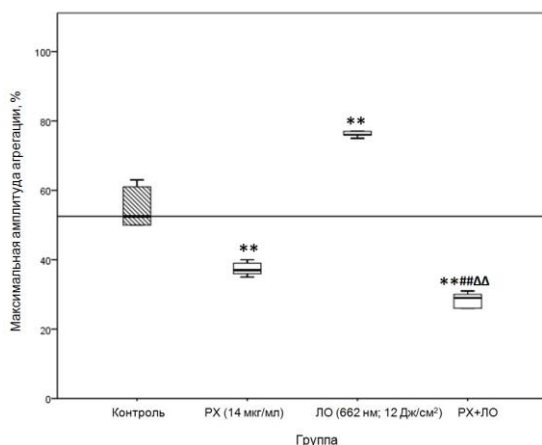


Рис. 10. Влияние РХ (14 мкг/мл); лазерного излучения 662 нм (12 Дж/см<sup>2</sup>); лазерного излучения 662 нм (12 Дж/см<sup>2</sup>) на фоне предварительного добавления в PRP РХ (14 мкг/мл) на показатель максимальной амплитуды агрегации тромбоцитов. Примечание: \*\* – p<0,01 по сравнению с контролем;## — p<0,01 по сравнению с РХ; ΔΔ – p<0,01 по сравнению с группой облучения.

Фотоактивация КП и РХ приводила к усилению ингибирующего эффекта действия самих ФС и значительно уменьшала скорость агрегации тромбоцитов. При высоких дозах лазерной активации процессы агрегации были необратимы. Таким образом, фотодинамическое действие в опытах *in vitro* отменяет стимуляцию лазерного излучения. Наиболее выражено это происходило в опытах с фотоактивацией РХ.

Фотоактивация БР не приводила к еще более выраженному угнетению агрегации тромбоцитов как при инкубации с БР без лазерного воздействия, но наблюдали снижение стимулирующего действия лазерного излучения.

### Влияние фотодинамической модификации крови на агрегационную активность тромбоцитов

В первой группе из этой серии опытов ненаркотизированным крысам в хвостовую вену вводили ФС в концентрации, которая использовалась в исследованиях кровотока в брыжейке тонкой кишки и коже крыс. Длительное контактирование циркулирующих тромбоцитов с ФС оказывало влияние на их функциональную активность, но в меньшей степени, чем в опытах *in vitro*. Под влиянием КП и БР агрегационная активность немного снизилась, а в опытах с РХ отмечено увеличение интенсивности агрегации тромбоцитов и снижение скорости дезагрегации.

В следующей серии опытов была изучена агрегационная активность тромбоцитов после облучения бедренной артерии у крыс без предварительного введения ФС. В процессе лазерного воздействия на артерию облучалась и протекающая по ней кровь — фотомодификация крови. Исследование агрегационной активности тромбоцитов проводилось сразу после завершения облучения. Действие зеленого лазера не приводило значимым изменениям функциональной активности тромбоцитов. Лазерное воздействие в красном диапазоне длин волн увеличило интенсивность агрегации тромбоцитов: при облучении 635 нм на 16,7 %, а при облучении 662 нм на 12,9 % ( $p < 0,05$ ).

Далее изучили влияние фотодинамической модификации крови на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов. Фотодинамический эффект с БР проявляется в повышении агрегационной активности тромбоцитов (рис. 11). При фотоактивации (635 нм) КП происходит снижение ингибирующего эффекта КП (рис. 12). Фотодинамическое действие в опытах с РХ ингибирует процессы стимуляции самого РХ и просто облучения (рис. 13).

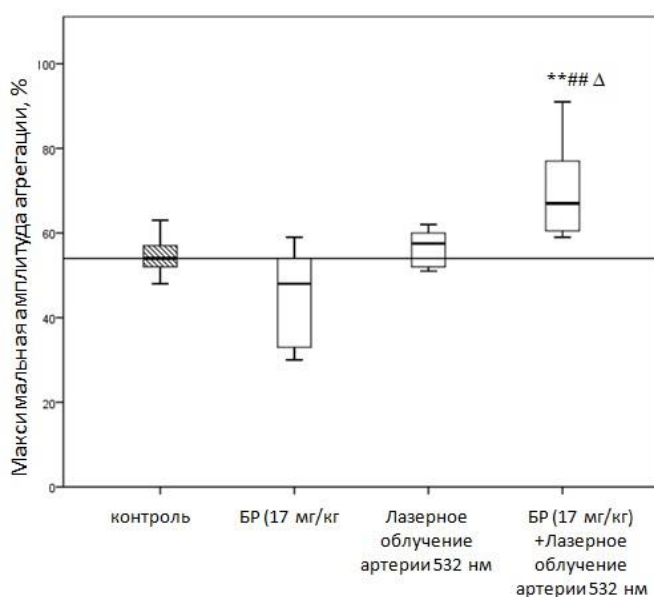


Рис. 11. Влияние фотодинамической модификации крови в опытах с бенгальским розовым. Примечание: \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем; ## —  $p < 0,01$  по сравнению с БР; Δ —  $p < 0,05$  по сравнению с облучением. Внутривенное введение бенгальского розового (17 мг/кг) не приводит к значимому изменению интенсивности агрегации тромбоцитов. Фотодинамический эффект с бенгальским розовым проявляется в повышении агрегационной активности тромбоцитов.

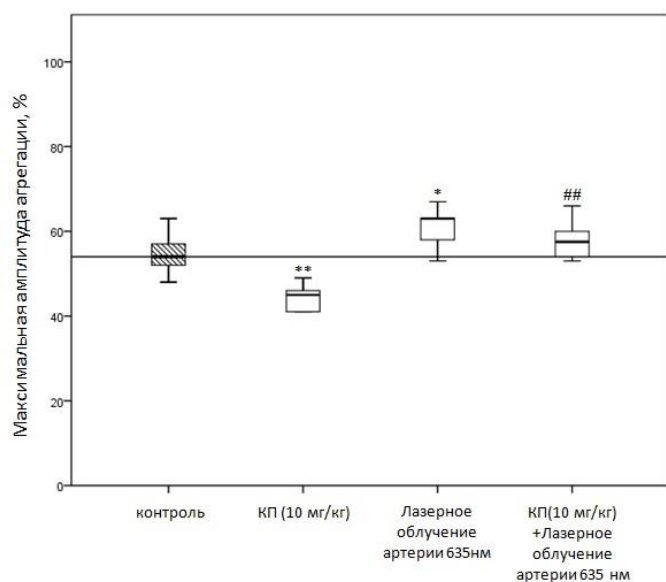


Рис. 12. Влияние фотодинамической модификации крови в опытах с копропорфирином. Примечание: \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем; ## —  $p < 0,01$  по сравнению с КП. Внутривенное введение КП (10 мг/кг) приводит к ингибирующему эффекту интенсивности агрегации тромбоцитов. Фотодинамический эффект с КП проявляется в снижении ингибирующего эффекта КП.

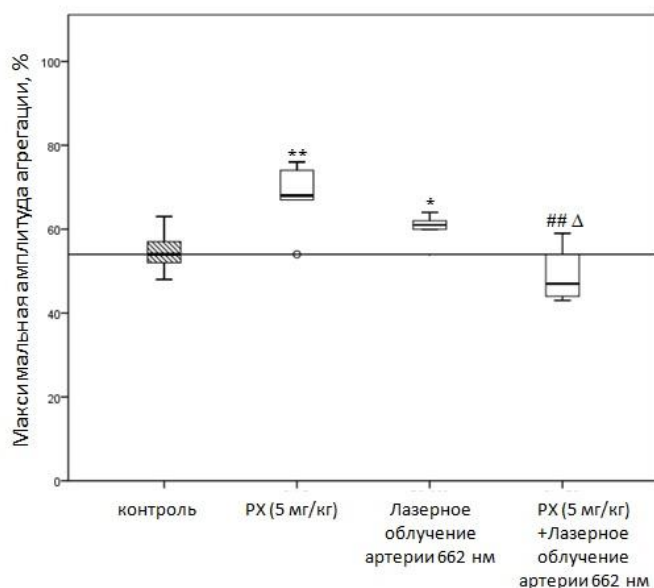


Рис. 13. Влияние фотодинамической модификации крови в опытах с радахлорином. Примечание: \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем; ## —  $p < 0,01$  по сравнению с PX; Δ —  $p < 0,05$  по сравнению с облучением. Внутривенное введение PX (5 мг/кг) приводит к значимому увеличению интенсивности агрегации тромбоцитов. Фотодинамический эффект с PX проявляется в ингибирующем эффекте стимуляции самого PX и просто облучения.

Таким образом, в результате фотохимических реакций происходит образование АФК, которые оказывают влияние на функциональную активность тромбоцитов. Фотодинамический эффект с БР проявляется в повышении агрегационной активности тромбоцитов. Фотоактивация (635 нм) снижает ингибирующий эффект КП. Фотодинамическое действие в опытах с РХ ингибирует процессы стимуляции самого РХ и просто облучения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования установлено, что после внутривенного введения БР (17 мг/кг), КП (10 мг/кг) или РХ (5 мг/кг) без последующей фотоактивации не происходит значимых изменений скорости кровотока относительно исходных значений. Лазерное облучение микрососудов на фоне предварительного введения исследуемых ФС привело к замедлению кровотока в венах вплоть до полной остановки. Степень выраженности этих изменений и скорость их развития существенно отличались в опытах с различными ФС. Различия эффектов изученных ФС в отношении к МЦР могут быть

связаны с их разным распределением в структурах эндотелиальных и гладкомышечных клетках. Наиболее выраженный эффект на микроциркуляцию оказывает РХ, что по всей видимости связано с особенностями его внутриклеточной локализации.

Фотоактивация исследуемых ФС в коже приводит к снижению кровотока на фоне локальной гипертермии. В механизме изменения кровотока при локальной гипертермии основное значение придается аксон-рефлексу и развивающейся эндотелий-зависимой вазодилатации. Однако на фоне увеличения температуры наблюдалось снижение перфузии. Наиболее выраженное снижение перфузии наблюдалось в опытах с РХ и БР. В опытах с КП тоже происходило снижение перфузии, но реакция была не такая выраженная, что говорит о меньшей эндотелиотропности этого препарата. Фотоактивированные ФС, которые накапливаются эндотелием, отменяют эндотелий-зависимую вазодилатацию вследствие избыточного синтеза веществ, которые приводят к вазоконстрикции и дисфункции эндотелия.

Одним из удобных объектов для изучения механизма фотодинамического воздействия на клетки являются тромбоциты, так как они очень чувствительны к различному воздействию (тепловому, механическому, ультразвуковому, световому). При проведении ФДТ фотосенсибилизаторы длительное время циркулируют в крови и проникают в клетки крови, в том числе тромбоциты. Как показали наши опыты в условиях *in vitro*, под влиянием исследуемых ФС интенсивность АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов и скорость агрегации дозо-зависимо уменьшались. Было отмечено и уменьшение скорости дезагрегации, этот эффект ранее не был описан. Фотоактивация ФС усиливает их ингибирующее действие, а стимулирующее влияние самого облучения на агрегацию при этом не отмечено.

Внутривенное введение исследуемых ФС оказывало влияние на функциональную активность тромбоцитов, но в значительно меньшей степени, чем в опытах *in vitro*. Под влиянием КП и БР агрегационная активность несколько снизилась, а в опытах с РХ отмечено значимое увеличение интенсивности агрегации тромбоцитов и снижение скорости дезагрегации. Снижение дезагрегационной активности можно рассматривать как фактор, способствующий тромбозу при активации тромбоцитов тромбогенными факторами, выделяющимися из эндотелия при ФДТ. Фотодинамическая модификация крови в опытах с БР приводит к повышению агрегационной активности тромбоцитов. Учитывая, что БР широко используется для моделирования тромбоза, полученные данные могут иметь значение в механизме тромбообразования. В настоящее время наиболее активно при ФДТ используются ФС — производные хлорина еб. Согласно нашим исследованиям, фотодинамическая модификация крови с РХ не повышает тромбогенной опасности при ФДТ.

## ВЫВОДЫ

1. Длительная циркуляция в крови бенгальского розового, копропорфирина и радахлорина не приводит к значимому изменению микроциркуляции в брыжейке тонкой кишки и коже крыс.
2. Локальное лазерное облучение ( $0,1 \text{ Вт/см}^2$ ;  $30\text{--}33 \text{ Дж/см}^2$ ) венул брыжейки тонкой кишки крыс в красном диапазоне длин волн (635, 662 нм) приводит к значимому увеличению скорости кровотока, при облучении в зеленой области спектра (532 нм) значимых изменений микроциркуляции не наблюдается.
3. Лазерное облучение кожи ( $0,38 \text{ Вт/см}^2$ ;  $300 \text{ Дж/см}^2$ ) в красном диапазоне (635, 662 нм) вызывает локальную гипертермию и увеличение перфузии, а в зеленом (532 нм)

- снижает кровоток на фоне локальной гипертермии, что свидетельствует об изменении реактивности сосудов микроциркуляторного русла.
4. Фотоактивация бенгальского розового, копропорфирина и радахлорина вызывает снижение кровотока в зоне лазерного воздействия. Наиболее выраженные эффекты оказывает радахлорин.
  5. Неактивированные фотосенсибилизаторы в условиях *in vitro* ингибируют АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов, а их фотоактивация усиливает данный эффект, тогда как само лазерное излучение потенцирует агрегацию тромбоцитов.
  6. Фотодинамическая модификация крови в опытах с бенгальским розовым приводит к повышению агрегационной активности тромбоцитов по сравнению с действием неактивированного фотосенсибилизатора или только лазерного облучения. В отличие от этого, в опытах с радахлорином фотодинамическая модификация крови снижает стимулирующее действие как фотосенсибилизатора, так и лазерного облучения.
  7. Исследованные фотосенсибилизаторы вызывают разные эффекты на микроциркуляцию и агрегационную активность тромбоцитов, которые необходимо учитывать при проведении фотодинамической терапии.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК РФ**

1. Петрищев Н.Н., Галкин М.А., Гришачева Т.Г., Дементьева И.Н., Чефу С.Г. Влияние препарата на основе хлорина еб на агрегационную активность тромбоцитов. // Biomedical Photonics. — 2019; 8(3):4–10.
2. Гришачева Т.Г. Влияние фотоактивированного копропорфирина на микроциркуляцию. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2018. Т. 17. № 4. С. 75–80.
3. Гришачева Т.Г., Белик А.Г., Цыганенко В.Н., Струй А.В., Михайлова И.А., Петрищев Н.Н. Фотореактивность сосудов микроциркуляторного русла. // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. — 2018. Т. 104. №2. С. 174–183.
4. Гришачева Т.Г., Дементьева И.Н., Чефу С.Г., Петрищев Н.Н. Влияние фотосенсибилизатора радахлорина и фотодинамического воздействия на индуцированную коллагеном агрегацию тромбоцитов. // Лазерная медицина. — 2017. Т. 21. Вып. 4. С. 42–46.
5. Гришачёва Т.Г., Михайлова И.А., Струй А.В., Чефу С.Г., Петрищев Н.Н. Влияние фотоактивированного бенгальского розового на микроциркуляцию. // Biomedical Photonics. — 2017. – Т. 6. № 3. – С. 11–15.
6. Петрищев Н.Н., Гришачёва Т.Г., Михайлова И.А., Чефу С.Г., Кувардин Е.С. О возможном влиянии температурных эффектов на светочувствительность микрососудов в присутствии фотосенсибилизаторов. // Лазерная медицина. — 2015. Т.19. № 1. С.29–32.
7. Гришачёва Т.Г., Михайлова И.А., Панченко А.В. Влияние фотодинамического действия на адренореактивность сосудов микроциркуляторного русла. // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. — 2014. Т. 13. № 3. С. 86–90.