

УДК 612.135, 616-092.9

DOI: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-82-90

Д. Л. СОНИН<sup>1, 2</sup>, Д. Р. ФАЙЗУЛЛИНА<sup>2</sup>, Е. А. ЗАЙЦЕВА<sup>1</sup>,  
Н. Н. ПЕТРИЩЕВ<sup>2</sup>

## Оценка антиоксидантного действия различных ангиопротективных препаратов по степени дегрануляции тучных клеток при фотодинамическом повреждении

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр имени В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 197341, Россия, Санкт-Петербург, ул. Аккуратова, д. 2

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия 197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, д. 6-8  
E-mail: lasmed@yandex.ru.

Статья поступила в редакцию 28.07.22 г.; принята к печати 26.08.22 г.

### Резюме

**Введение.** На модели острого воспаления кожи, вызванного фотодинамическим повреждением (ФП), в котором ведущая роль принадлежит активным формам кислорода (АФК), изучены нарушения микроциркуляции (МКЦ) и дегрануляция ТК (ТК) в месте воздействия. Научный интерес представляет изучение IgE-независимых механизмов активации ТК и возможность их фармакологической коррекции. **Цель** – оценить возможности использования модели острого воспаления, индуцированного АФК, при ФП для изучения вклада ТК в регуляцию проницаемости сосудов и изучения ангиопротекторных и улучшающих МКЦ препаратов на доклиническом этапе. **Материалы и методы.** Крысам-самцам стока Wistar вводили фотосенсибилизатор, через 3 ч наркотизировали и проводили облучение лазером, затем вводили один из следующих препаратов: гидрокортизон (ГК), этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭС) или квинакрин (КК). Оценка МКЦ кожи проводили методом лазерной доплеровской флуометрии. Подсчет и морфометрию ТК производили в пленочных препаратах рыхлой соединительной ткани кожи. **Результаты.** Сразу после ФП кровотока показатель микроциркуляции в контрольной группе составил 1,9 [1,4;2,3] п. е., что на 55 % меньше исходного. Через час наблюдалось частичное восстановление кровотока до 3,7 [3,3;4,0] п. е. (88 % от исходного,  $p < 0,001$ ). Несмотря на введение ГК и ЭС, кровоток после ФП снижался на 8,5 и 32,5 % соответственно и через час составлял только 78 % от исходного. После введения КК сразу после облучения снижение составило только 28 %, через час кровоток полностью восстанавливался. Степень дегрануляции ТК после введения ГК и КК сопоставима и сопровождается снижением количества ТК с полной (анафилактической) дегрануляцией до 27,5 [21,6; 29,4] и 26,4 [22,5; 32,5] % соответственно, против 46,9 [47,7; 52] % в контрольной группе ( $p < 0,05$ ); однако после введения ЭС результаты сопоставимы с интактным контролем. При проведении непараметрического корреляционного анализа не были выявлены статистически значимые взаимосвязи тканевой перфузии через час после фотодинамического воздействия и морфометрическими типами ТК с использованием различных препаратов. **Заключение.** Разнонаправленность влияния препаратов на перфузию и структуру популяции ТК подтверждается отсутствием выявленной корреляции между данными параметрами. КК, в сравнении с ЭС и ГК, более эффективен в отношении нарушений МКЦ. В этих условиях перспективным представляется сочетанное использование противовоспалительных и антиоксидантных препаратов.

**Ключевые слова:** тучные клетки, фотодинамическая терапия, антиоксиданты, микроциркуляция, квинакрин

**Для цитирования:** Сонин Д. Л., Файзуллина Д. Р., Зайцева Е. А., Петрищев Н. Н. Оценка антиоксидантного действия различных ангиопротективных препаратов по степени дегрануляции тучных клеток при фотодинамическом повреждении. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2022;21(3):82–90. Doi: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-82-90.

УДК 612.135, 616-092.9

DOI: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-82-90

D. L. SONIN<sup>1, 2</sup>, D. R. FAYZULLINA<sup>2</sup>, E. A. ZAITSEVA<sup>1</sup>,  
N. N. PETRISHCHEV<sup>2</sup>

## Antioxidant effect evaluation of drugs with different chemical structures by the degree of mast cell degranulation under photodynamic damage

<sup>1</sup> Pavlov University, Saint Petersburg, Russia 6-8, L'va Tolstogo str., Saint Petersburg, Russia, 197022

<sup>2</sup> Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia 2, Akkuratova str., Saint Petersburg, Russia, 197341  
E-mail: lasmed@yandex.ru

Received 28.07.22; accepted 26.08.22

### Summary

**Introduction.** This model of skin acute inflammation caused by photodynamic damage (PHD), where reactive oxygen species (ROS) play a key role, enables the analysis of the microcirculation (MCC) dysfunction and degranulation of mast

cells (MCs) at the site of exposure. The current study explored the IgE-independent mechanisms of MCs activation caused by PHD and the possibility of its pharmacological correction. *Aim* of the study – to evaluate the possibilities of using the model of acute inflammation induced by ROS during PHD to study the MCs contribution to the regulation of vascular permeability and to study angioprotective and MCC-improving drugs at the preclinical stage. *Materials and methods*. Male Wistar rats were injected with a photosensitizer, then anesthetized and laser irradiated 3 hours later, followed by one of the following drugs: hydrocortisone (HC), ethylmethylhydroxypyridine succinate (ES), or quinacrine (QC). Skin MCC was investigated by laser Doppler flowmetry. Calculation and morphometry of MCs was carried out on film preparations of loose connective tissue of the skin. *Results*. Immediately after PHD, the blood flow in the control group was 1.9 [1.4; 2.3] p. u., which is 55 % less than the initial values. Partial restoration of blood flow up to 3.7 [3.3; 4.0] p.u. was observed after one hour of observation (88 % of baseline,  $p < 0.001$ ). Despite the administration of HC and ES, the blood flow after PHD decreased by 8,5 and 32,5 %, respectively. After an hour, it was only 78 % of the baseline. Intravenous administration of QC immediately after irradiation, lead to decrease of the blood flow only 28 %, and after an hour the blood flow was completely restored. The degree of MCs degranulation after the intravenous administration of HC and QC is almost equal and characterized by a decrease in the number of MCs with complete (anaphylactic) degranulation to 27.5 [21.6; 29.4] and 26.4 [22.5; 32.5] %, respectively, versus 46.9 [47.7; 52] % in the control group ( $p < 0,05$ ); however, after the administration of ES, the results are comparable with the intact control. Non-parametric correlation analysis did not reveal statistically significant difference between blood flow one hour after photodynamic exposure and morphometric types of MCs in groups with various drugs. *Conclusion*. Differences between the drug effects on the skin blood flow and the IgE-independent MCs activation is confirmed by the absence of a correlation between these parameters. QC, in comparison with ES and HC, is more effective in relation to dysfunction of the skin MCC. Under these conditions, the combined use of anti-inflammatory and antioxidant drugs seems promising.

**Keywords:** mast cells, photodynamic therapy, antioxidants, microcirculation, quinacrine

**For citation:** Sonin D. L., Fayzullina D. R., Zaitseva E. A., Petrishchev N. N. Antioxidant effect evaluation of drugs with different chemical structures by the degree of mast cell degranulation under photodynamic damage. *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2022;21(3):82–90. Doi: 10.24884/1682-6655-2022-21-3-82-90.

## Введение

В настоящее время большой научный интерес представляет изучение IgE-независимых механизмов активации тучных клеток (ТК). Этот механизм играет важную роль в воспалении, ангиогенезе, канцерогенезе и противоопухолевом ответе и других типовых патологических процессах. Так, доказана роль ТК среди триггеров цитокинового каскада воспаления при повреждении тканей и, в частности, при инфаркте миокарда с выделением преформированных медиаторов (гистамин, TNF- $\alpha$ , триптаза, химаза, гепарин и другие), которые инициируют врожденный иммунный ответ, направленный на защиту организма и заживление поврежденной ткани [1–3]. Выраженное повреждение, например, при ишемии и реперфузии тканей, создает мощный стимул для быстрой активации резидентных ТК, степень активности которых становится пропорциональной выраженности повреждения, что в результате ведет к вторичному повреждению микроциркуляторного русла (МЦР), вплоть до развития феномена постишемического невосстановления кровотока [4]. В его запуске важную роль играют преформированные медиаторы ТК, которые создают условия для экссудации и ограничения оттока крови и лимфы, путем увеличения проницаемости эндотелия, стимуляции сокращения перицитов и экспрессии рецепторов адгезии лейкоцитов (ICAM-1 и P-селектина) на клетках эндотелия, с последующей миграцией нейтрофилов, что ведет к уменьшению кровотока, вплоть до развития стаза [4]. Последующая активность ТК в очаге повреждения направлена на рекрутирование клеток иммунной системы, чему способствуют высвобождающиеся сериновые протеазы, разрушающие матрикс и провоспалительные хемокины, продолжающие вторичное повреждение тканей, приводящее к апоптозу и экспансии ишемии [5, 6].

Другая важная функция ТК связана с их участием в ангиогенезе. Для ангиогенеза необходимы следу-

ющие компоненты: моноклеары (в том числе ТК), факторы роста и экстрацеллюлярный матрикс. Ангиогенез может быть как компонентом «тканевой инженерии», при восстановлении поврежденных тканей, так и частью патологического процесса, например, при образовании сосудов в опухолевых тканях [7]. Считается, что через выделение проангиогенных факторов (VEGF, FGF-2, IL-8, триптаза, химаза, NGF, гепарин, TGF- $\beta$  и др.) ТК способствуют васкуляризации и инвазии опухоли [8].

Свободнорадикальное окисление является компонентом многих типовых патологических процессов, в частности, наблюдается при ишемии. Ишемией сопровождаются такие состояния, как ишемическое/реперфузионное повреждение миокарда, опухолевый процесс, когда возросшие метаболические потребности не могут быть компенсированы неадекватным неоангиогенезом [1, 9]. В многочисленных исследованиях было продемонстрировано увеличение гетерогенной популяции ТК вокруг опухолей, а также преимущественное расположение клеток в участках со сниженной концентрацией или интермиттирующим поступлением кислорода [10, 11]. При восстановлении кровотока после ишемии активные формы кислорода, наряду с компонентами системы комплемента, аденозином и MCP-1, активируют ТК [1]. Для изучения роли ТК в нарушении микроциркуляции (МКЦ), вызванной активными формами кислорода (АФК), а также эффективности ангиопротекторов нами предлагается использовать экспериментальную модель фотодинамического повреждения (ФП).

ФП широко используется в онкологии, дерматологии, офтальмологии и других специальностях с целью инициации гибели патологических клеток, как путем некроза (некроптоз, пироптоз), так и за счет развития апоптоза (в основном через внутренний путь), параптоза, и аутофагии [12, 13]. Повреждающее действие данного комбинированного воздействия основано на использовании фотосенсибилизаторов и

света определенной длины волны, соответствующей пикам абсорбции используемого препарата. Фотохимические реакции вызывают образование АФК, которым отводят ведущую роль в развитии наблюдаемых эффектов. Повреждение тканей является дозозависимым и направлено не только на клетки мишени, но и на сосуды МЦР. При фотодинамическом процессе снижается скорость кровотока за счет образования сладжей, тромбов и развития отека, что ведет к гипоксии тканей. Радахлорин – фотосенсибилизатор, основным действующим веществом которого является хлорин е6. Данный препарат хорошо зарекомендовал себя в клинической практике с использованием облучения с длиной волны 662 нм. Таким образом, ФП может являться моделью острого воспаления, в котором ведущая роль принадлежит АФК [14–18]. Как уже упоминалось, АФК участвуют в запуске воспаления, активируя ТК, однако взаимосвязь степени дегрануляции ТК и тканевой перфузии в ответ на фотодинамическое воздействие изучена недостаточно.

Закономерно, что доказанная роль ТК в развитии различных заболеваний привела к поиску медикаментов, оказывающих на них влияние. Помимо прямого воздействия на ТК, широко изучаются и разрабатываются лекарственные вещества, обладающие способностью стабилизировать их мембрану. ФП, за счет образования АФК, является перспективной моделью для изучения антиоксидантов, эффективность которых можно косвенно оценить по степени дегрануляции ТК как эффекторного звена иммунной системы, необходимого для развития и поддержания воспаления. Кроме того, использование фотосенсибилизаторов, обладающих тропностью к сосудам МЦР, позволяет оценить ангиопротективные свойства исследуемого препарата.

В качестве препаратов, влияющих на дегрануляцию ТК, были выбраны ГК (ГК), этилметилгидроксипиридина сукцинат (ЭС) и квинакрин (КК). ГК оказывает противовоспалительное действие: блокирует синтез и высвобождение из сенсibilизированных ТК и базофилов гистамина и других биологически активных веществ. Уменьшает воспалительные клеточные инфильтраты, снижает миграцию лейкоцитов, в частности, лимфоцитов в область воспаления, стабилизирует лизосомальные мембраны, уменьшает проницаемость капилляров. ЭС, по данным многочисленных исследований, обладает доказанной антиоксидантной и антигипоксической активностью, стабилизирует мембраны, улучшает МКЦ и реологические свойства крови [19]. КК снижает активность фосфолипазы А2, связываясь с участком, близким к активному сайту, также он снижает секрецию TNF- $\alpha$  [20] и образование АФК макрофагами, нейтрофилами и эозинофилами [21]. Ингибирует гистамин N-метилтрансферазу – фермент, инактивирующий гистамин [22]. Оказывает антиагрегантное действие на тромбоциты [23]. Взаимодействует с фосфолипидами мембран, влияя на их структуру и функцию [24]. Кроме того, было продемонстрировано его прямое ингибирующее влияние на индуцированную дегрануляцию выделенных ТК крыс [25].

**Цель исследования** – оценить возможности использования модели острого воспаления, индуцированного АФК, при ФП для изучения вклада ТК в регуляцию проницаемости сосудов и изучения ангиопротекторных и улучшающих МКЦ препаратов на доклиническом этапе.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали крыс-самцов стока Wistar (n=48) с массой 225–275 г (ФГУП «Питомник лабораторных животных „Рапполово“ ФГБУ «Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”»), в соответствии с директивой ЕС (The European Council Directive (86/609/EEC)) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными. Комиссия по содержанию и использованию лабораторных животных ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова» утвердил протокол исследования (протокол № 20–04 от 26 марта 2020 г.). Животные содержались на неограниченном потреблении корма (стандартный рацион для лабораторных крыс К-120 («Информ-корм», Россия)) и воды при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч (свет: темнота). Температура поддерживалась в пределах 22–25 °С, относительная влажность – 50–70 %. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла не менее 14 дней.

В исследовании использовали ГК в форме натрия сукцината (*PFIZER MFG. BELGIUM, N. V.*, Бельгия) в дозе 20 мг/кг. Раствор для внутривенного введения готовили, добавив во флакон с лиофилизатом водный раствор натрия хлорида 0,9 %. ЭС в форме готового раствора для инъекций для внутривенного введения (мексидол®, ЗАО «Фармасофт», Россия), в дозе 50 мг/кг. Квинакрин дигидрохлорид (*Sigma-Aldrich Co. LLC, США*), раствор которого для внутривенного введения в дозе 5 мг/кг, готовили, добавив водный раствор натрия хлорида 0,9 %-й.

В предварительных исследованиях было показано, что воспроизводимые результаты с частично обратимым значимым снижением тканевого кровотока после ФП наблюдаются при введении радахлорина в качестве фотосенсибилизатора с последующим облучением на аппарате АЛОД-01 («Алком медика», Россия), с длиной волны 662 нм, максимальной мощностью 2,0 Вт, со световодом с линзой для наружного облучения («Полироник», Россия). Расстояние от торца волокна до облучаемой поверхности – 2 мм, диаметр облучаемой поверхности – 10 мм, мощность – 0,1 Вт, плотность мощности – 0,127 Вт/см<sup>2</sup>, плотность энергии – 50 Дж/см<sup>2</sup>. Параметры облучения подобраны таким образом, чтобы не развивался некроз в зоне воздействия. Радахлорин – препарат хлоринового ряда, используется для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии злокачественных новообразований и имеет следующий состав: хлорин е<sup>6</sup> (80–90 %), пурпурин 5 (5–20 %), пурпурин 18 – хлорин р<sup>6</sup> (0–15 %). Максимумы полос абсорбции водного раствора РДХ при pH=7 определяются на длинах волн 285, 402, 502, 655 нм, с максимумом флуоресценции около 660 нм.

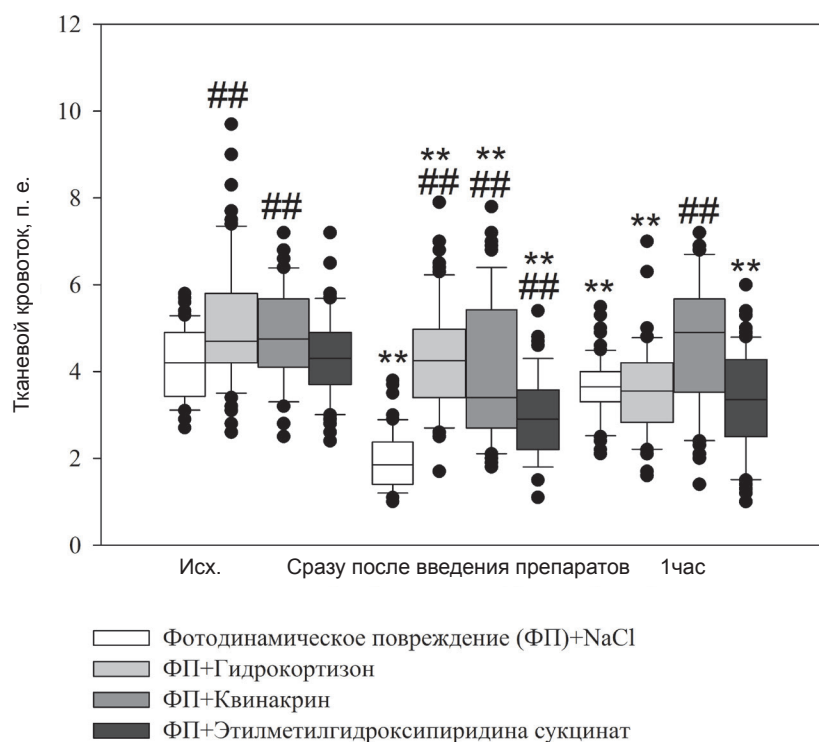


Рис. 1. Динамика изменения кровотока в ответ на фотодинамическое повреждение в контроле и в присутствии исследуемых препаратов: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$  по сравнению с исходными значениями; ### –  $p < 0,001$  по сравнению с контрольной группой (NaCl)

Fig. 1. Dynamics of blood flow changes response to photodynamic damage (PHD) in the control group in the presence of the studied drugs: \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$  compared to baseline; ### –  $p < 0,001$  compared to the control group (NaCl)

Квантовый выход генерации синглетного кислорода ( $\phi_{\Delta}$ ) = 0,52 [26].

Для оценки влияния введенных препаратов на МКЦ кожи методом лазерной доплеровской флоуметрии производили снятие показателей при помощи прибора Laser Doppler Monitor BLF21 (*Transonik Systems Inc.*, США) с мощностью диодного источника излучения (780 нм) до 2,0 мВт. Полученные данные приведены в перфузионных единицах (п. е.), которые соответствуют кровотоку в мл/мин/100 г ткани.

Для оценки степени дегрануляции ТК пленки соединительной ткани, полученные из подкожной клетчатки, препаративными иглами растягивали на предметных стеклах, подсушивали около 5 мин и фиксировали раствором Карнуа при +4 °C 24 ч. Затем окрашивали толуидиновым синим («Биовитрум», Россия), со стандартным набором спиртов, с увеличением продолжительности времени экспозиции по сравнению с обычными срезами парафиновых блоков. Закладывали в среду Био Маунт (*Bio-Optica*, Италия). Подсчет ТК производили на микроскопе Микмед-5 («ЛОМО», Россия), с объективом  $\times 40$ , прибор оснащен цифровой видеокамерой BR-6601HC-UF (НПК «ЕС-экспертс», Россия). Программное обеспечение «МультиМедиа Каталог» («ММС», Россия) позволяет производить автоматический подсчет ТК, а также разделять их на три группы в зависимости от степени дегрануляции: I тип – клетки с четкими контурами ядра и цитоплазмы, без признаков дегрануляции; II тип – клетки с эксцентрично расположенными ядрами и крупной зернистостью в цитоплазме;

III тип – полностью разрушенные клетки с выходом метакроматических гранул в окружающее межклеточное вещество. Подсчет клеток выполняли в 50 полях зрения с последующим пересчетом на 10 полей зрения при увеличении  $\times 400$ . Фотосъемку гистологических объектов выполняли, используя цифровую микрофотокамеру ICC50 (*Leica*, Германия).

Дизайн исследования: предварительно опытной группе животных вводили радахлорин внутривенно (*v. caudalis*) в дозе 5 мг/кг. Через 3 ч животных наркотизировали путем внутривенного введения препаратов Золетил 50 (*VIRBAC*, Франция) и Ксила (*B. V. De Adelaar*, Нидерланды) в равных объемах в дозе 0,5 мл/кг. При необходимости дополнительно вводили до  $\frac{1}{3}$  первоначального объема смеси препаратов. Кожу спины очищали от шерсти механически. Маркером по трафарету с учетом костных ориентиров наносили разметку, площадь воздействия составляла 0,78 см<sup>2</sup>. Производили катетеризацию яремной вены. Затем крысу помещали на термостатируемый столик TCAT-2 Temperature Controller (*Physitemp*, США), с постоянным поддержанием ректальной температуры в пределах 37,0–37,5 °C. Затем проводили облучение кожи (50 Дж/см<sup>2</sup>) и сразу после облучения вводили в/в (*v. jugularis*) один из исследуемых препаратов в объеме (1 мл) в течение 10 мин: ГК в дозе 20 мг/кг ( $n=6$ ), ЭС в дозе 50 мг/кг ( $n=6$ ), КК в дозе 5 мг/кг ( $n=6$ ).

Перед катетеризацией, до и после фотодинамического воздействия, сразу и через 1 ч после введения препаратов производили снятие показателей методом лазерной доплеровской флоуметрии. Через 1 ч

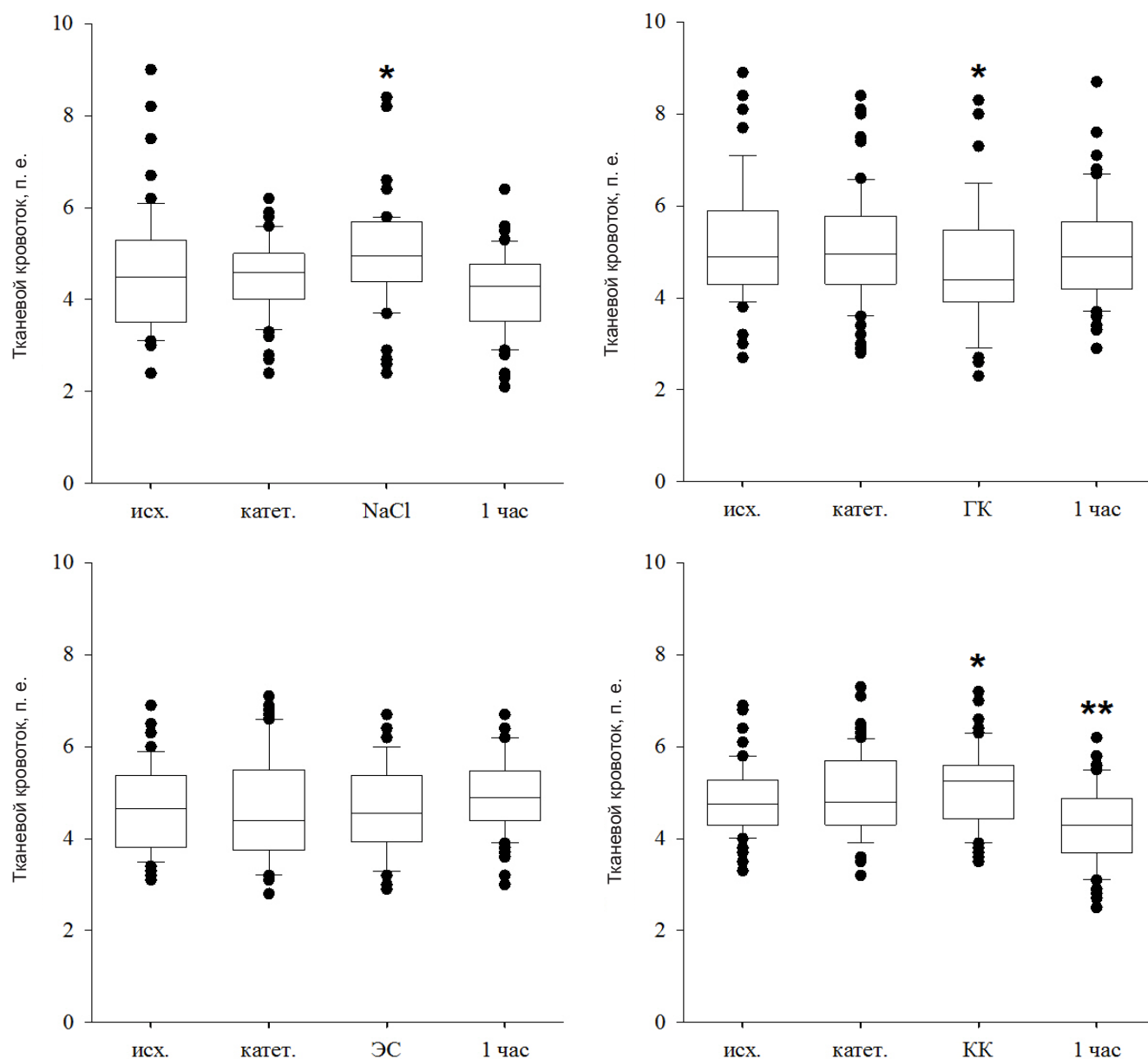


Рис. 2. Динамика изменения тканевой перфузии в контрольных группах (исходная перфузия, сразу после катетеризации, введения исследуемых препаратов): \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$  по сравнению с исходными значениями

Fig. 2. Dynamics changes in tissue perfusion in the control groups (baseline, immediately after catheterization, administration of studied drugs): \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,001$  compared to baseline

после облучения производили взятие пленочных препаратов рыхлой соединительной ткани кожи в месте фотодинамического воздействия.

Контрольным животным после облучения в присутствии радахлорина вводили раствор натрия хлорида 0,9 %-й ( $n=6$ ). Также оценивали основные исследуемые параметры у интактных животных, которым внутривенно (*v. jugularis*) вводили исследуемые препараты ( $n=6$ ), а также в группе, которой вводили препараты на фоне ФС, но без облучения ( $n=6$ ).

Статистическую обработку результатов производили с использованием стандартных программ («Statistica 8.0 Stat Soft for Windows», *Sigma Plot 12.5*). Вид распределения количественных признаков оценивали по критерию Шапиро – Уилка. Данные, не имеющие нормального распределения, описаны медианой (Me), нижним и верхним квартилем [Q25 %; Q75 %]. Оценку значимости различий показателей проводили с применением двухфакторного анализа

ANOVA, U-критерия Манна – Уитни. Значимость различий определяли при  $p < 0,05$ . Для оценки силы связи между изучаемыми переменными использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Нулевую статистическую гипотезу об отсутствии различий и связей отвергали при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и их обсуждение

ФП при выбранных параметрах облучения сразу после воздействия приводит к значимому снижению кровотока на 55 % до 1,9 [1,4; 2,3] п. е., через час отмечается частичное восстановление кровотока до 88 % от исходного, до 3,7 [3,3; 4,0] п. е. ( $p < 0,001$ ) (рис. 1). Введение ГК и ЭС снижает степень выраженности ФП сосудов сразу после облучения – кровоток снижается на 8,5 и 32,5 % соответственно, однако через час составляет только около 78 % от исходного. КК также положительно влияет на кровоток сразу после облучения, снижение составляет только 28 %, но,

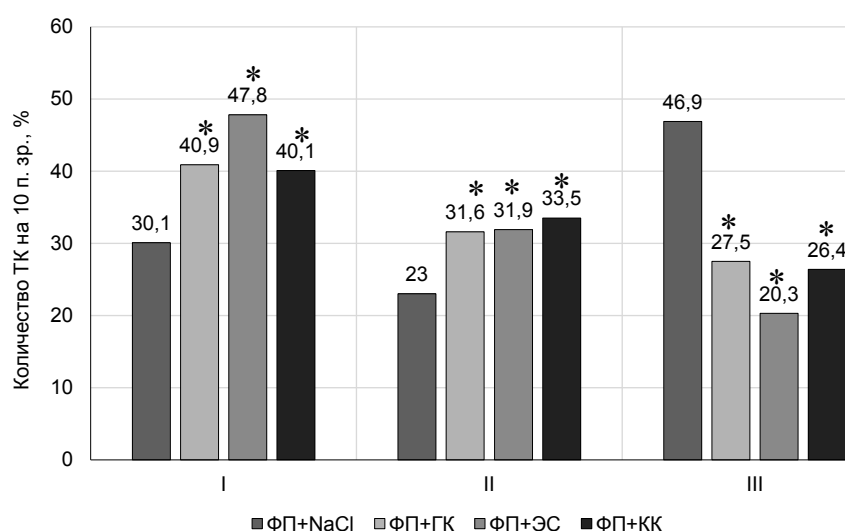


Рис. 3. Соотношение ТК различных морфофункциональных типов после фотодинамического повреждения на фоне исследуемых препаратов: \* –  $p < 0,05$ , в сравнении с контрольной группой (ФП+NaCl)

Fig. 3. The ratio of various morphofunctional mast cells types after photodynamic damage after administration of studied drugs: \* –  $p < 0,05$ , compared with the control group (PHD+NaCl)

что наиболее важно, через час кровоток полностью восстанавливается.

В отсутствие ФП введение физиологического раствора сначала приводило к значимому усилению кровотока, с возвращением к исходным значениям через час при повторном измерении ( $p = 0,019$ ). ГК значимо снижал перфузию кожи сразу после введения препарата, с нормализацией показателя через час ( $p = 0,009$ ). Введение ЭС не влияло на МКЦ на протяжении всего эксперимента. После введения КК, через час, наблюдали значимое снижение кровотока ( $p < 0,001$ ). Однако во всех случаях введения препаратов интактным животным выраженность изменений перфузии тканей не превышала 10 % от исходных значений (рис. 2). Катетеризация яремной вены, как инвазивное вмешательство, не проводило к значимым изменениям кровотока, в сравнении с исходными показателями, ни в одной из групп в исследовании.

В предыдущих исследованиях было показано, что радахлорин без облучения в дозе 5 мг/кг не влияет на кожный кровоток крыс [27]. В данной серии экспериментов динамика изменений кровотока относительно исходных значений в группах животных, которым вводили фотосенсибилизатор за 3 ч до эксперимента, и тем, которым не вводили, сопоставима, статистически значимых изменений не выявлено.

Введение группе контроля радахлорина, физиологического раствора, ГК, КК и ЭС не приводило к значимому отличию процентного соотношения типов ТК в данных группах.

ФП приводит к значимому изменению процентного соотношения морфометрических типов ТК по сравнению с контролем. Через час после ФП преобладают ТК III типа, 48,6 [41; 54,5] %, в то время как в интактном контроле их процент составляет только 19,8 [19,5; 21,6] %. Введение физиологического раствора значимо не влияло на результат фотодинамического воздействия, ТК III типа составили 46,9 [47,7; 52] %.

Степень дегрануляции после введения ГК и КК сопоставима, отмечали снижение ТК III типа до 27,5 [21,6; 29,4] и 26,4 [22,5; 32,5] % соответственно ( $p < 0,05$ ), значимое повышение ТК II типа и значимое снижение I типа ( $p < 0,05$ ) (рис. 3). Как показано на рис. 3, наименьшая степень дегрануляции наблюдалась после введения ЭС, результаты сопоставимы с интактным контролем.

При проведении непараметрического корреляционного анализа не были выявлены статистически значимые взаимосвязи тканевой перфузии через час после фотодинамического воздействия и морфометрическими типами ТК с использованием различных препаратов.

### Обсуждение

На ранних этапах ФП в тканях преобладает воспаление, которое на уровне МКЦ реализуется выраженным увеличением сосудистой проницаемости, стазом, нарушением лимфоотока. В основе данных нарушений лежат разнообразные механизмы: повреждение эндотелиоцитов, компонентов базальной мембраны, гладкомышечных клеток, субэндотелия (коллаген), форменных элементов крови (эритроциты, тромбоциты), дегрануляция ТК под действием АФК [27, 28]. Преформированные медиаторы ТК, включая гистамин, брадикинин, серотонин и TNF- $\alpha$ , повышают сосудистую проницаемость и вызывают сокращение перицитов, окружающих капилляры и вены [29, 30]. Сокращение перицитов также наблюдается и после ишемии и реперфузии, что ведет к развитию стаза крови и замедлению кровотока в очаге повреждения [33]. Имеются литературные данные, свидетельствующие о прямой активации перицитов АФК, которые формируются при фотодинамическом воздействии, даже при сравнительно низких дозах облучения [34]. В дополнение к этому активация перицитов возможна под действием норадреналина, за исключением сосудов миокарда [35].

В данном исследовании параметры облучения были подобраны таким образом (длина волны, мощность и плотность энергии), чтобы не развивался некроз и тромбоз в зоне ФП, тем не менее в механизме развития дисфункции эндотелия при выбранных параметрах облучения нельзя исключить инициацию апоптоза (внутреннего и внешнего пути) в области воздействия за счет активации иммунной системы [27].

В литературе имеются данные [17, 36] о нарастании дегрануляции после фотодинамического воздействия, как в опухолевых, так и в интактных тканях, однако, как правило, оценка проводилась по результатам классических гистологических препаратов с различными окрасками, как традиционными (толuidиновый синий, бриллиантовый зеленый и др.), так и иммуногистохимическими или флуоресцентными. В данной работе использование пленочных препаратов рыхлой соединительной ткани является, на наш взгляд более информативным для оценки дегрануляции ТК, позволяет качественно и количественно оценивать структуру популяции.

При выбранных параметрах ФП все три исследуемых препарата снизили функциональную активность ТК, несколько более выражен данный эффект у ЭС. Наибольшее влияние на активацию ТК в группе ФП+ЭС ожидаемо, так как ЭС в большей степени, чем другие препараты, снижает повреждение тканей АФК и блокирует активацию ТК.

Несмотря на значимое снижение активности ТК в трех группах, тканевой кровоток полностью восстановился только в группе КК, через час наблюдения после ФП. Хорошо известен иммуномодулирующий эффект КК, блокирующий «цитокиновый шторм», в связи с чем данный препарат рассматривают также для лечения COVID-19 [37]. Можно выделить ключевые механизмы, которые, возможно, привели к полному восстановлению кровотока в группе ФП-КК, наряду со снижением активности ТК: это ингибирование фосфолипазы А2, ингибирование эффекта брадикинина и снижение секреции TNF- $\alpha$  макрофагами [20, 38].

Поиск новых экспериментальных моделей, в патогенезе которых основная роль принадлежит АФК, является перспективным для доклинических исследований препаратов, обладающих антиоксидантным действием, а также изучения механизмов их действия. Одновременная оценка ТК как регуляторов функционального состояния сосудов МЦР и перфузии тканей позволяет оценить вклад ТК в регуляцию проницаемости сосудов, под действием патологического фактора и, в частности, ФП. В данной модели основным патогенетическим фактором являются АФК, под действием которых перфузия в месте облучения снижается, а через час частично восстанавливается, что сопровождается выраженной дегрануляцией ТК, за счет снижения клеток I и II типов. Использование препаратов с разным механизмом действия продемонстрировало, что снижение степени дегрануляции, наиболее выраженное после введения ЭС, не сопровождалось значимым усилением перфузии, по сравнению с контролем через час после облучения, несмотря на положительную

динамику кровотока сразу после облучения. Таким образом, несмотря на немедленный положительный эффект, который может быть связан со снижением дегрануляции ТК, в долгосрочной перспективе использование ЭС с позиции нормализации кровотока не является препаратом выбора. Напротив, КК, в меньшей степени влияющий на дегрануляцию ТК, положительно влияет на тканевую перфузию, обладая противовоспалительным действием, которое может быть использовано в некоторых клинических ситуациях (острый инфаркт миокарда, ишемический инсульт и др.). Вероятно, его влияние на сосуды МЦР не может быть связано только со снижением функциональной активности ТК. ГК не продемонстрировал преимуществ ни с позиции дегрануляции ТК, ни с точки зрения усиления или восстановления кровотока в ответ на ФП. Разнонаправленность влияния препаратов на перфузию и структуру популяции ТК подтверждается отсутствием выявленной корреляции между данными параметрами. Перспективным можно считать сочетанное использование препаратов разнонаправленного действия, с целью достижения противовоспалительного и антиоксидантного эффектов. В частности, интересным представляется использование стабилизаторов ТК – регуляторных пептидов, которые образуются в очаге воспаления в результате деградации белков межклеточного матрикса [39].

### Заключение

Модель острого воспаления, индуцированного АФК, при ФП позволяет изучать вклад ТК в механизмы индуцированных ими нарушений МКЦ. Полученные с использованием этой модели данные подтверждают активацию ТК при ФП, функциональную активность которых в большей степени уменьшил препарат с антиоксидантным действием, чем препараты с противовоспалительным действием при их незамедлительном внутривенном введении. Противовоспалительное действие кинакринина в течение 1 ч наблюдения оказалось более эффективным в отношении нарушений МКЦ, вызванных ФП, чем ГК. Перспективным представляется сочетанное использование препаратов разнонаправленного действия, с целью достижения противовоспалительного и антиоксидантного эффектов.

*Исследование проведено в рамках государственного задания № АААА-А20-120092490049-6 «Защита миокарда от ишемического и реперфузионного повреждения путем направленной доставки препаратов, стабилизирующих мембраны тучных клеток».*

### Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

### Литература / References

1. He Z, Ma C, Yu T, Song J, Leng J, Gu X, Li J. Activation mechanisms and multifaceted effects of mast cells in ischemia reperfusion injury // *Exp Cell Res*. 2019;376(2):227–235. Doi: 10.1016/j.yexcr.2019.01.022.

2. Zuurbier CJ, Abbate A, Cabrera-Fuentes HA, Cohen MV, Collino M, De Kleijn DPV, Downey JM, Pagliaro P, Preissner KT, Takahashi M, Davidson SM. Innate immunity as a target for acute cardioprotection // *Cardiovasc Res*. 2019; 115(7):1131–1142. Doi: 10.1093/cvr/cvy304.
3. Andreadou I, Cabrera-Fuentes HA, Devaux Y, Frangogiannis NG, Frantz S, Guzik T, Liehn EA, Gomes CPC, Schulz R, Hausenloy DJ. Immune cells as targets for cardioprotection: new players and novel therapeutic opportunities // *Cardiovasc Res*. 2019;115(7):1117–1130. Doi: 10.1093/cvr/cvz050.
4. Hausenloy DJ, Chilian W, Crea F, Davidson SM, Ferdinandy P, Garcia-Dorado D, van Royen N, Schulz R, Heusch G. The coronary circulation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury: a target for cardioprotection // *Cardiovasc Res*. 2019;115(7):1143–1155. Doi: 10.1093/cvr/cvy286.
5. Hara M, Matsumori A, Ono K, Kido H, Hwang MW, Miyamoto T et al. Mast cells cause apoptosis of cardiomyocytes and proliferation of other intramyocardial cells in vitro // *Circulation*. 1999;(100):1443–1449. Doi: 10.1161/01.CIR.100.13.1443.
6. Zhang QY, Ge JB, Chen JZ, Zhu JH, Zhang LH, Lau CP, et al. Mast cell contributes to cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization // *J Histochem Cytochem* 2006; (54):515–523. Doi: 10.1369/jhc.5A6804.2005.
7. Amani S, Shahrooz R, Mortaz E, Hobbenaghi R, Mohammadi R, Khoshfetrat AB. Histomorphometric and immunohistochemical evaluation of angiogenesis in ischemia by tissue engineering in rats: Role of mast cells // *Vet Res Forum* 2019; (10):23–30. Doi: 10.30466/vrf.2019.34311.
8. Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth // *Biochim Biophys Acta – Mol Basis Dis*. 2012; (1822):2–8. Doi: 10.1016/j.bbadis.2010.11.010.
9. Carmeliet PJR. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis // *Nature* 2011;(473):298–307. Doi: 10.1016/S0140-6736(01)91146-8.
10. Ramírez-Moreno IG, Ibarra-Sánchez A, Castillo-Arellano JI, Blank U, González-Espinosa C. Mast Cells Localize in Hypoxic Zones of Tumors and Secrete CCL-2 under Hypoxia through Activation of L-Type Calcium Channels // *J Immunol* 2020;(204):1056–1068. Doi: 10.4049/jimmunol.1801430.
11. Maltby S, Khazaie K, McNaghy KM. Mast cells in tumor growth: Angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation // *Biochim Biophys Acta – Rev Cancer*. 2009;(1796):19–26. Doi: 10.1016/j.bbcan.2009.02.001.
12. Kessel D. Apoptosis, paraptosis and autophagy: death and survival pathways associated with photodynamic therapy // *Photochem Photobiol*. 2019;(95):119–125. Doi: 10.1111/php.12952.
13. Donohoe C, Senge MO, Arnaut LG, Gomes-da-Silva LC. Cell death in photodynamic therapy: from oxidative stress to anti-tumor immunity // *Biochim Biophys Acta – Rev Cancer* 2019;(1872):188308. Doi: 10.1016/j.bbcan.2019.07.003.
14. Cecic I, Korbelik M. Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors // *Cancer Lett*. 2002;(183):43–51. Doi: 10.1016/S0304-3835(02)00092-7.
15. Brooke RCC, Sinha A, Sidhu MK, Watson REB, Church MK, Friedmann PS, et al. Histamine is released following aminolevulinic acid-photodynamic therapy of human skin and mediates an aminolevulinic acid dose-related immediate inflammatory response // *J Invest Dermatol*. 2006;(126):2296–2301. Doi: 10.1038/sj.jid.5700449.
16. Kerdel FA, Soter NA, Lim HW. In Vivo Mediator Release and Degranulation of Mast Cells in Hematoporphyrin Derivative-Induced Phototoxicity in Mice // *J Invest Dermatol*. 1987;(88):277–280. Doi: 10.1111/1523-1747.EPI2466135.
17. Rosin FCP, Barcessat ARP, Borges GG, Corrêa L. Effect of 5-ALA-mediated photodynamic therapy on mast cell and microvessels densities present in oral premalignant lesions induced in rats // *J Photochem Photobiol B Biol*. 2015;(153):429–434. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.10.027.
18. van Duijnhoven FH, Aalbers RIJM, Rovers JP, Terpsstra OT, Kuppen PJK. The immunological consequences of photodynamic treatment of cancer; a literature review // *Immunobiology*. 2003;(207):105–113. Doi: 10.1078/0171-2985-00221.
19. Воронина Т. А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов // *Журн. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. – 2012. – Т. 112, № 12. – С. 86–90. [Voronina TA. Mexidol: the spectrum of pharmacological effects // *Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni SS Korsakova*. 2012;112(12):86–90. (In Russ.)].
20. Shen CY, Wang D, Chang ML, Hsu K. Protective effect of mepacrine on hypoxia-reoxygenation-induced acute lung injury in rats // *J Appl Physiol*. 1995;78(1):225–231. Doi: 10.1152/jappl.1995.78.1.225. PMID: 7713816.
21. Struhar D, Kivity S, Topilsky M. Quinacrine inhibits oxygen radicals release from human alveolar macrophages // *Int J Immunopharmacol*. 1992;14(2):275–257. Doi: 10.1016/0192-0561(92)90040-r.
22. Horton JR, Sawada K, Nishibori M, Zhang X, Cheng X. Two polymorphic forms of human histamine methyltransferase: structural, thermal, and kinetic comparisons // *Structure*. 2001;9(9):837–849. Doi: 10.1016/S0969-2126(01)00643-8.
23. Vallee E, Gougat J, Navarro J, Delahayes JF. Anti-inflammatory and platelet anti-aggregant activity of phospholipase-A2 inhibitors // *J Pharm Pharmacol*. 1979;31(9):588–592. Doi: 10.1111/j.2042-7158.1979.tb13597.x.
24. Oien DB, Pathoulas CL, Ray U, Thirusangu P, Kalogera E, Shridhar V. Repurposing quinacrine for treatment-refractory cancer // *Semin Cancer Biol*. 2021;(68):21–30. Doi: 10.1016/J.SEMCANCER.2019.09.021.
25. Wang J, Teng C. Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A2 enzymes isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* Venom // *J Pharm Pharmacol*. 1990;(42):846–850. Doi: 10.1111/j.2042-7158.1990.tb07038.x.
26. Vargas F, Díaz Y, Yartsev V, Marciano A, Lappa A. Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media // *Cienc -MARACAIBO*. 2004;(12):70–77.
27. Файзуллина Д. П., Сухорукова Е. Г., Юкина Г. Ю. и др. Изменения микроциркуляции и структурных компонентов кожи при фотодинамическом воздействии // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция*. – 2020. – Т. 19, № 1 (73). – С. 73–81. [Faizullina DR, Sukhorukova EG, Yukina GYu, Petrishchev NN, Korneva EA. Changes in microcirculation and structural components of the skin under photodynamic effects // *Regional hemodynamics and microcirculation*. 2020;19(1):73–81. (In Russ.)]. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-1-73-81.
28. Strauss WSL, Sailer R, Schneckenburger H, Akgün N, Gottfried V, Chetwer L et al. Photodynamic efficacy of naturally occurring porphyrins in endothelial cells in vitro and microvasculature in vivo // *J Photochem Photobiol B Biol*. 1997;(39):176–184. Doi: 10.1016/S1011-1344(97)00002-X.
29. Sims DE, Miller FN, Donald A, Perricone MA. Ultrastructure of pericytes in early stages of histamine-induced inflammation // *J Morphol*. 1990;206(3):333–342. Doi: 10.1002/jmor.1052060310.
30. Speyer CL, Steffes CP, Ram JL. Effects of vasoactive mediators on the rat lung pericyte: quantitative analysis of contraction on collagen lattice matrices // *Microvasc Res*. 1999;57(2):134–143. Doi: 10.1006/mvre.1998.2134.
31. Bertlich M, Ihler F, Weiss BG, Freytag S, Strupp M, Canis M. Cochlear pericytes are capable of reversibly decreasing capillary diameter in vivo after tumor necrosis factor exposure // *Otol Neurotol*. 2017;38(10):e545–e550. Doi: 10.1097/MAO.0000000000001523.

32. Miller FN, Sims DE, Schuschke DA, Abney DL. Differentiation of light-dye effects in the microcirculation // *Microvasc Res.* 1992;44(2):166–184. Doi: 10.1016/0026-2862(92)90078-4.

33. O'Farrell FM, Mastitskaya S, Hammond-Haley M, Freitas F, Wah WR, Attwell D. Capillary pericytes mediate coronary no-reflow after myocardial ischaemia // *eLife.* 2017; (6):e29280. Doi: 10.7554/eLife.29280.

34. Cavin S, Riedel T, Roskopfova P, Gonzalez M, Baldini G, Zellweger M, Wagnières G, Dyson PJ, Ris HB, Krueger T, Perentes JY. Vascular-targeted low dose photodynamic therapy stabilizes tumor vessels by modulating pericyte contractility // *Lasers Surg Med.* 2019;51(6):550–561. Doi: 10.1002/lsm.23069.

35. Tilton RG, Kilo C, Williamson JR, Murch DW. Differences in pericyte contractile function in rat cardiac and skeletal muscle microvasculatures // *Microvasc Res.* 1979;18(3):336–352. Doi: 10.1016/0026-2862(79)90042-6.

36. Krosi G, Korbelik M, Dougherty GJ. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy // *Br J Cancer.* 1995;(71):549–555. Doi: 10.1038/bjc.1995.108.

37. Pineda B. Quinacrine, an old drug with potentially useful in the treatment for COVID-19 // *Arch Med Res.* 2021; 52(8):858–859. Doi: 10.1016/j.arcmed.2021.06.002.

38. Bauersachs J, Hecker M, Busse R. Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation // *Br J Pharmacol.* 1994; 113(4):1548–1553. Doi: 10.1111/j.1476-5381.1994.tb17172.x.

39. Ясенявская А. Л., Самотруева М. А., Башкина О. А. и др. Нейропептидная регуляция иммунитета // *Иммунология.* – 2018. – Т. 39, № (5-6). – С. 326–336. [Yasenyavskaya AL, Samotrueva MA, Bashkina OA, Andreeva LA, Myasov NF, Tyurenkov IN, Karaulov AV. Neuropeptide regulation

of immunity // *Immunologiya.* 2018;39(5-6):326–336. Doi: 10.18821/0206-4952-2018-39-5-6-326-336.

### Информация об авторах

**Сонин Дмитрий Леонидович** — канд. мед. наук, ведущий научный сотрудник, зав. Научно-исследовательским отделом микроциркуляции и метаболизма миокарда, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия.

**Файзуллина Динара Рафаэлевна** — ассистент кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия.

**Екатерина Андреевна Зайцева** — младший научный сотрудник Научно-исследовательского отдела микроциркуляции и метаболизма миокарда, Национальный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия.

**Петришев Николай Николаевич** — д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии, руководитель центра лазерной медицины Научно-образовательного института биомедицины, ПСПбГМУ им. И. П. Павлова.

### Authors information

**Faizullina Dinara R.** – assistant of the Department of Pathophysiology with a course of Clinical Pathophysiology, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia.

**Sonin Dmitry L.** – Cand. of Sci. (Med.), Head of the Department of microcirculation and cardiac metabolism, Pavlov University, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia.

**Zajtseva Ekaterina A.** – Junior Research Fellow of the Department of microcirculation and cardiac metabolism, Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia.

**Petrishchev Nikolay N.** – Doctor of Medical Sciences, Professor of the Department pathophysiology with a course of clinical pathophysiology, Head of the Center for Laser Medicine of Scientific and Educational Institute of Biomedicine, Pavlov University, Saint Petersburg, Russia.