

ГРИШАЧЕВА Т. Г.^{1, 2}, МИХАЙЛОВА И. А.^{1, 2},
ПАНЧЕНКО А. В.²

Влияние фотодинамического воздействия на адренореактивность сосудов микроциркуляторного русла

¹Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И. П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральный медицинский исследовательский центр им. В. А. Алмазова,
Санкт-Петербург, Россия
e-mail: info@lasmed.spb.ru

Реферат

Представлено исследование реактивности сосудов микроциркуляторного русла брыжейки тонкой кишки крыс Вистар при воздействии низкоинтенсивного лазерного излучения и фотодинамическом воздействии. Установлено, что низкоинтенсивное лазерное облучение приводит к отсроченной вазодилатации микрососудов. Введение фотосенсибилизатора радахлорина не оказывает влияния на состояние микрососудов. Фотодинамическое воздействие вызывает вазоконстрикцию артериол и венул. Лазерное облучение и фотодинамическое воздействие приводят к изменению адренореактивности микрососудов.

Ключевые слова: адренореактивность, лазерное облучение, фотодинамическая терапия, микроциркуляция.

Местное применение низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), главным образом красного и инфракрасного диапазонов, широко используется при лечении воспалительных процессов, трофических язв, для стимуляции заживления ран [7, 8, 10]. В качестве одного из механизмов терапевтического действия НИЛИ при этом рассматривается улучшение микроциркуляции (МЦ). В экспериментальных исследованиях установлено, что прямое действие НИЛИ на сосуды микроциркуляторного русла вызывает их расширение. По данным Y. Maegawa et al., через 20 минут после облучения брыжейки тонкой кишки крыс ИК лазером (830 нм, 38,2 мВт/мм²) диаметр артериол увеличился на 20 % [16]. В другом исследовании [12] показано, что при воздействии He-Ne-лазером величина дилатации артериол прямо пропорциональна времени воздействия и обратно пропорциональна диаметру микрососуда, при этом чувствительность венул к лазерному облучению была менее выражена.

Одним из показателей функционального состояния кровеносных сосудов является их адренореактивность. По данным Л. Н. Воробьевой, лазерное (632 нм) и светодиодное (670 нм) облучение брыжейки тонкой кишки крыс снижало чувствительность артериол к норадреналину и практически не влияло на адренореактивность венул [4]. В исследованиях Шуваевой В. Н. и соавт. показано, что адренореактивность пиальных артерий мягкой мозговой оболочки крыс зависит от исходного тонуса сосудов [13, 14].

В механизме фотодинамической терапии опухолей большое значение придается нарушению микроциркуляции [11, 15]. Вместе с тем прямые исследования влияния фотодинамического воздействия на МЦ немногочисленны. По данным Барабанщиковой Г. В. и соавт., облучение сосудов (630 нм, 12 Дж/см²) бры-

жейки тонкой кишки крыс на фоне предварительного введения фотосенсибилизатора (Копропорфин III) приводило к замедлению скорости кровотока, внутрисосудистой агрегации эритроцитов, маятниковому движению крови в венулах и последующей остановке кровотока [3]. В работе И. И. Хлудеева и соавт. приведен сравнительный анализ изменения микроциркуляции в коже крыс с использованием хлоринов еб в качестве фотосенсибилизатора (ФС). Показано, что введение хлоринов без облучения незначительно увеличивает кровоток, а через 30 минут после облучения наблюдалось уменьшение кровотока в 2 раза [11].

Целью исследования является изучение адренореактивности сосудов микроциркуляторного русла на фоне фотодинамического воздействия.

Материал и методы исследования

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 250–350 г (питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН) в полном соответствии с директивой ЕС (The European Council Directive (86/609/ЕЕС)) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными. Животные содержались на неограниченном потреблении корма (стандартный рацион для лабораторных крыс К-120 фирмы «Информ-корм», Россия) и воды при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч (свет:темнота). Температура поддерживалась в пределах 18–20 °С, относительная влажность — 50–70 %. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. Животных разделили на 4 группы: 1 группа — контрольная, интактные крысы; 2 группа — введение Радахлорина; 3 группа — лазерное облучение; 4 группа — лазерное облучение на фоне предваритель-

ного введения радахлорина. Исследование микроциркуляции проводили по методике, описанной ранее (И. А. Михайлова и др.) [6]. В работе использовали микроскоп МТ-9 (ЛОМО), объектив (ЛК 10×0,40). С помощью CCD-видеокамеры (Sony, Япония) производили видеозапись на персональный компьютер и проводили обработку данных программным пакетом «Мульти Медиа Каталог» (ММС, версия 2.2, Россия). В качестве источника лазерного излучения использовали полупроводниковый лазерный аппарат «Гранат» (ООО «Алком медика», Санкт-Петербург), длина волны — 662 нм, мощность — 22 мВт. Мощность контролировали с помощью измерителя мощности (Advantest Q8230) перед каждым экспериментом.

Лазерный луч вводили в оптическую систему микроскопа с помощью оптоволокну (400 мкм) в канал проходящего света микроскопа. Диаметр пятна — 1,5 см, плотность мощности в плоскости объекта — 12,5 мВт/см², плотность энергии при экспозиции в 30 с — 0,37 Дж/см². В работе был использован фотосенсибилизатор радахлорин («Радафарма» Россия); препарат в дозе 5 мг/кг вводили животным в хвостовую вену за 3 часа до облучения.

Животных наркотизировали (тиопентал-натрий 60 мг/кг подкожно) и через нижнесрединный доступ извлекали петлю тонкой кишки, примыкающую к мезоаппендиксу, для исследования микроциркуляции в артериолах (10–20 мкм) и венах брыжейки (15–30 мкм). Животное размещали на термостатируемый предметный столик (СНТ-1), имеющий наблюдательное окно для проходящего света, выполненное из кварцевого стекла, над которым размещали петлю брыжейки тонкой кишки. Исследуемый участок брыжейки постоянно орошали стерильным физиологическим раствором (NaCl, 0,9 %), температура раствора — 37,5 °С.

Аппликацию раствора норадреналина (НА, агетан) проводили путем орошения исследуемого участка брыжейки при помощи шприцевого дозатора ДШВ-01 со скоростью 40 мл/ч. Система подачи физраствора и норадреналина была настроена так, что можно было переключаться с одного раствора на другой. Концентрация норадреналина составляла 10⁻⁶ г/мл. Время орошения — 30 с. Орошение в группах 3 и 4 проводили через 6 минут после лазерного облучения. Реакцию на норадреналин регистрировали с момента начала орошения и в течение 5 минут.

Во время исследования во всех группах регистрировали следующие параметры: исходный диаметр артериол и венул, диаметр сосудов после воздействия, диаметр сосудов через 6 минут после воздействия, время латентного периода — время от момента аппликации НА до начала реакции сосудов и продолжительность реакции на НА — время до восстановления диаметра сосуда после воздействия.

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программного пакета «Statistica», версия 6.1. Значимость различий измеряемых параметров оценивали с помощью критерия Манна–Уитни, статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты исследования

В контрольной группе животных аппликация норадреналина вызывала значимое сужение артериол (на 14,64 %) и венул (10,17 %). Продолжительность реакции на НА в артериолах составила 80,5 с, в венах — 98 с. На фоне предварительно введения радахлорина (без облучения) адренореактивность сосудов, латентный период и продолжительность реакции на НА не изменялись по сравнению с контрольной группой (табл. 1). В группе 3 на фоне облучения лазером (662 нм) на первых минутах наблюдалось незначительное увеличение диаметра артериол, а через 6 минут зарегистрировано значимое расширение артериол (на 14 %, $p < 0,05$). Чувствительность венул к лазерному облучению была менее выражена, значимых изменений не наблюдалось (табл. 2). При аппликации НА диаметр артериол уменьшился на 19,5 % ($p < 0,05$), венул — на 17 % ($p < 0,05$), т. е. адренореактивность артериол и венул значительно увеличилась по сравнению с 1-й группой. Наблюдалось увеличение латентного периода на 61,6 % в артериолах и на 22,9 % в венах (табл. 1). Облучение лазером увеличило продолжительность реакции на НА почти в 2 раза.

После лазерного облучения сосудов на фоне предварительного введения радахлорина реакция сосудов существенно отличалась от той, которая наблюдалась в предыдущих группах. В то время как облучение сосудов без фотосенсибилизатора вызывало их дилатацию, на фоне введенного радахлорина после облучения диаметр артериол уменьшился на 17 % ($p < 0,05$), а диаметр венул значимо не изменился (табл. 2). Через 6 минут после облучения наблюдалось незначительное восстановление диаметра сосудов. Аппликация НА вызывала неоднозначную реакцию сосудов, в большей части сосудов после длительного латентного периода наблюдалось значительное замедление кровотока и развитие стаза.

Обсуждение результатов

По существующим представлениям, в механизме вазодилатации при воздействии НИЛИ в красном и инфракрасном диапазонах основное значение имеет увеличение образования оксида азота в эндотелиоцитах и уменьшение содержания кальция в гладкомышечных клетках сосудов микроциркуляторного русла [13, 16]. Значимое расширение сосудов в наших экспериментах наблюдалось только через 6 минут после прекращения облучения. Такая отсроченность эффекта НИЛИ на сосуды МЦ, тромбоциты отмечена и другими авторами [2, 9, 16]. Что касается адренореактивности сосудов, то ее изменения так же отмечались после завершения облучения. Как и в опытах В. Н. Шуваевой и др. [13, 14], мы отмечали некоторое повышение чувствительности к норадреналину.

Введение радахлорина, который, как известно, накапливается в эндотелиальных клетках [1, 5], не повлияло как на диаметр, так и на адренореактивность артериол и венул. После облучения наблюдалась вазоконстрикция артериол и венул, что свидетельствует об изменении функционального состояния гладкомышечных клеток. Это можно рассматривать

Адренореактивность артериол и венул

Таблица 1

Тип сосуда	Группа 1 (контроль)	Группа 2 (радахлорин)	Группа 3 (облучение лазером)
	Время латентного периода, с		
Артериола	13,3±3,24	12,0±2,33	21,5±2,73 *
Венула	23,0±6,14	21,0±2,03	29,0±2,98 *
Степень констрикции, %			
Артериола	14,6±2,44	14,1±3,01	19,5±4,06 *
Венула	10,2±1,63	10,9±1,72	17,1±5,92 *
Продолжительность реакции на НА, с			
Артериола	80,5±10,84	81±15,9	160±22,9 *
Венула	98±11,13	97±11,72	186±21,8 *

* — p<0,05 по сравнению с контрольной группой.

Влияние лазерного облучения на диаметр артериол и венул

Таблица 2

Тип сосуда	Группа 3 (облучение лазером)			Группа 4 (облучение лазером + радахлорин)		
	диаметр до облучения, мкм	диаметр через 6 минут после облучения, мкм	p*	диаметр до облучения, мкм	диаметр сразу после облучения, мкм	p*
Артериола	13,78±1,73	15,69±1,9	<0,05	13,64±1,73	11,36±1,81	<0,05
Венула	20,84±3,15	22,42±3,28	>0,05	17,88±3,92	15,04±4,28	>0,05

* — по сравнению с исходным значением в группе.

как проявление фотоповреждения, вызванного активными формами кислорода. Изменения функционального состояния сосудов микроциркуляторного русла после фотодинамического воздействия особенно ярко проявлялись после воздействия норадреналина. В этом случае мы наблюдали существенные нарушения микроциркуляции и реологических свойств крови.

Литература

1. Андреева Е.Р., Ударцева О.О., Возовиков И.Н. и др. Влияние фотодинамического воздействия на эндотелиальные клетки в модели *in vitro* // Бюлл. эксперимент. биол. и мед. 2010. Т. 149. №2. С.228–231.
 2. Барабанова В. В., Михайлова И.А., Чефу С.Г., Петрищев Н.Н. Влияние излучения He-Ne лазера на функциональную активность гладкомышечных клеток воротной вены крыс // Росс. физиолог. журн. им. И.М. Сеченова. 2001. Т. 87. №5. С.659–664.
 3. Барабанищикова Г.В., Кузьмин Д.Н., Кувалдин Э.В. и др. Влияние лазериндуцированной фотохимической реакции копропорфирина III на функциональные свойства сосудов микроциркуляторного русла // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2004. №3(11). С. 64–67.
 4. Воробьева Л.Н. Изучение влияния светодиодного и лазерного излучения на состояние микроциркуляции // Актуальные проблемы лазерной медицины: сб. науч. тр. / под ред. Н. Н. Петрищевой. – СПб.: СПбГМУ, 2001. С. 19–32.
 5. Зорин В.П., Хлудеев И.И., Кравченко И.Е. Физико-химические параметры распределения порфириновых фотосенсибилизаторов в крови и фотосенсибилизирован-

Выводы

Адренореактивность сосудов микроциркуляторного русла изменяется при воздействии как лазерного излучения, так и при фотодинамическом воздействии, причем изменения носят разнонаправленный характер.

ное повреждение кровеносных сосудов // IV съезд фотобиологов России: сб. тез. докл. Саратов, 2005. С. 51–53.
 6. Кондратьев А.С., Михайлова И.А., Петрищев Н.Н. Моделирование различных форм повреждения сосудистой стенки с помощью лазерного излучения // Росс. физиолог. журн. 2013. № 6. С.745–750.
 7. Лазерная терапия и профилактика / под ред. А.В. Картелишьева, А. Г. Румянцева, А.Р. Евстигнеева [и др.]. М.: Практ. мед., 2012. 400 с.:ил.
 8. Основы лазерной терапии / С. В. Москвин, А. А. Ачилов. – М.; Тверь: Триада, 2008. 256 с.
 9. Петрищев Н.Н., Зубов Б.В., Дементьева И.Н. Сравнительное изучение влияния модулированного светодиодного облучения крови (630 нм, 450 нм) на агрегационную активность тромбоцитов // Лазерная мед. 2011. Т.15. Вып.3. С. 49–51.в
 10. Самосюк И.З., Лисенюк В.П., Лобода М.В. Лазеротерапия и лазеропунктура в клинической и курортной практике. Киев: Здоров'я, 1997. 240 с.
 11. Хлудеев И.И., Терех А.С., Дик С.К., Зорин В.П. Неинвазивный метод оценки реакции васкулярной системы

на фотодинамическое воздействие с использованием производных хлорина еб // *Лазерная и фотодинам. терапия в мед.: сб. науч. тр. Гродно: ГрГМУ, 2011. С. 87–90.*

12. Черток В.М., Коцюба А.Е., Беспалова Е.П. Особенности реакции сосудов микроциркуляторного русла некоторых органов на воздействие гелий-неонового лазера // *Тихоокеан. мед. журн. 2007. №3. С. 48–52.*

13. Шуваева В.Н., Горшкова О.П., Костылев А.В., Дворецкий Д.П. Влияние лазерного излучения на адreno-реактивность артериальных сосудов у крыс // *Бюлл. эксперимент. биол. и мед. 2011. Т. 151. №1. С. 4–8.*

14. Шуваева В.Н., Костылев А.В., Линькова Н. С.

Горшкова О.П. Влияние He-Ne-лазерного излучения низкой мощности на адreno-реактивность артериальных сосудов и деформируемость эритроцитов крыс // *Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2008. №1 (25). С. 31–37.*

15. Chang C.-J., Sally M.H. Cheng, Nelson J.S. Microvascular effects of Photofrin-induced photodynamic therapy // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2007. № 4. P. 95–99.*

16. Maegawa Y., Itoh T., Hosokawa T. et al. Effects of Near-Infrared Low-Level Laser Irradiation on Microcirculation // *J. Lasers in Surgery and Medicine. 2000. № 27. P. 427–437.*

UDK 612.135 – 073.524

Grishacheva T. G.^{1,2}, Mihaylova I. A.^{1,2}, Panchenko A. V.²

The effect of photodynamic therapy on adreno-reactivity of microcirculatory vessels

¹ Pavlov First Saint-Petersburg state medical University, St. Petersburg, Russia

² Federal Almazov medical research centre, St. Petersburg, Russia

e-mail: info@lasmed.spb.ru

Abstract

The article represents data from study of mesenteric microvessels reactivity in Wistar rat after low dose laser irradiation and photodynamic treatment. It had been revealed that low dose laser irradiation induced postponed microvessels dilation. Exposure to photosensitizer Radahlorin did not influenced microvessels state. Photodynamic treatment caused constriction of arterioles and venules. Photodynamic treatment and laser irradiation affected adreno-reactivity of microvessels.

Keywords: adreno-reactivity, laser radiation, photodynamic therapy, microcirculation.

References

1. Andreeva E. R., Udarcheva O. O., Vozovikov I. N. et al. Vlijanie fotodinamicheskogo vozdeystviya na jendotelial'nye kletki v modeli in vitro // *Bulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny [Bull Exp. Biol. Med.] 2010. Vol. 149. No 2. P. 228–231. [The influence of photodynamic influence on endothelial cells in models in vitro]. [In Russian].*

2. Barabanova V. V., Mihajlova I. A., Chefu S. G., Petrishhev N. N. Vlijanie izlucheniya He-Ne lazera na funkcional'nuju aktivnost' gladkomyshechnyh kletok vorotnoj veny krys // *Ross. fiziolog. zhurn. im. I. M. Sechenova [Russian Journal of physiology]. 2001. V. 87. No 5. P. 659–664. [The influence of irradiation of He-Ne laser on functional activity of smooth muscle cells of rat's portal vein]. [In Russian].*

3. Barabanshnikova G. V., Kuz'min D. N., Kuvaldin Je. Vet al. Vlijanie lazerinducirovannoj fotohimicheskoj reakcii koproporfirina III na funkcional'nye svojstva sosudov mikroциркуляторного русла // *Regionarnoe krovoobrashhenie i mikroциркуляция. [Regional haemodynamics and microcirculation]. 2004. No 3 (11). P. 64–67. [The influence of laser-induced photodynamic reaction coproporphyrin III on function of microcirculatory vessels]. [In Russian].*

4. Vorob'eva L. N. Izuchenie vlijaniya svetodiodnogo i lazernogo izlucheniya na sostojanie mikroциркуляци. Aktual'nye problemy lazernoj mediciny: sb. nauch. tr. pod red. N. N. Petrishheva. Saint-Petersburg. 2001. P. 19–32. [The study of the influence of laser irradiation on microcirculation]. [In Russian].

5. Zorin V. P., Hludeev I. I., Kravchenko I. E. Fiziko-himicheskie parametry raspredeleniya porfirinovyh fotosensibilizatorov v krovi i fotosensibilizirovannoe

povrezhdenie krovenosnyh sosudov. IV s'ezd fotobiologov Rossii: sb. tez. dokl. Saratov. 2005. P. 51–53. [Physico-chemical parameters of photosensitizer's distribution in blood and photosensitizer's-induced vessel damage]. [In Russian].

6. Kondrat'ev A. S., Mihajlova I. A., Petrishhev N. N. Modelirovanie razlichnyh form povrezhdenija sosudistoj stenki s pomoshh'ju lazernogo izlucheniya // *Ross. fiziolog. zhurn. im. I. M. Sechenova [Russian Journal of physiology]. 2013. No 6. P. 745–750. [Modeling of various forms of damage of a vascular wall by means of laser radiation]. [In Russian].*

7. Lazernaja terapija i profilaktika pod red. A. V. Kartelishcheva, A. G. Rumjanceva, A. R. Evstigneeva Moscow. Prakt. med. 2012. 400 p. [Laser therapy and prophylactics]. [In Russian].

8. Osnovy lazernoj terapii S. V. Moskvina, A. A. Achilova. Moscow. Tver. 2008. 256p. [Basics of laser therapy]. [In Russian].

9. Petrishhev N. N., Zubov B. V., Dement'eva I. N. Sravnitel'noe izuchenie vlijaniya modulirovannogo svetodiodnogo oblucheniya krovi (630 nm, 450 nm) na agregacionnuju aktivnost' trombocitov // *Lazernaja med. [Laser medicine]. 2011. V. 15. (3). P. 49–51. [Comparative study of modulating light diode irradiation of the blood (630 nm, 450 nm) on aggregation activity of thrombocytes]. [In Russian].*

10. Samosjuk I. Z., Lisenjuk V. P., Loboda M. V. Lazeroterapija i lazeropunktura v klinicheskoj i kurortnoj praktike. Kiev: Zdorov'ja. 1997. 240 p. [Laserotherapy and laseropuncture in clinical and resort practice]. [In Russian].

11. Hludeev I. I., Tereh A. S., Dik S. K., Zorin V. P.

Neinvazivnyj metod ocenki reakcii vaskuljarnoj sistemy na fotodinamicheskoe vozdejstvie s ispol'zovaniem proizvodnyh hlorina e6. // Lazernaja i fotodinamicheskaja terapija v med. [Laser and photodynamic therapy in medicine]. Grodno: GrGMU. 2011. P. 87 – 90. [Noninvasive method of vessel system reaction assessment on photodynamic effect of chlorine e6]. [In Russian].

12. Chertok V. M., Kocjuba A. E., Bespalova E. P. *Osobennosti reakcii sosudov mikrocirkuljatornogo rusla nekotoryh organov na vozdejstvie gelij-neonovogo lazera // Tihookean. med. zhurn. [Pacific ocean medical journal]. 2007. No 3. P. 48–52. [Peculiarities of microcirculatory vessel reactivity of some organs on He-Ne laser irradiation]. [In Russian].*

13. Shuvaeva V. N., Gorshkova O. P., Kostylev A. V., Dvoreckij D. P. *Vlijanie lazernogo izluchenija na adrenoreaktivnost' pial'nyh arterial'nyh sosudov u krysov // Bjull. jeksperiment. biol. i med. [Bull Exp Biol Med]. 2011.*

V. 151. No 1. P. 4–8. [The influence of laser irradiation on adrenoreactivity of pial arterial vessels in rats]. [In Russian].

14. Shuvaeva V. N., Kostylev A. V., Lin'kova N. S., Gorshkova O. P. *Vlijanie He-Ne-lazernogo izluchenija nizkoj moshhnosti na adrenoreaktivnost' pial'nyh arterial'nyh sosudov i deformiruemost' jericitocitov krysov // Regionarnoe krovoobrashhenie i mikrocirkuljacija [Regional haemodynamics and microcirculation]. 2008. No 1 (25). P. 31–37. [The influence of low level He-Ne laser irradiation on adrenoreactivity of pial arterial vessels and erythrocytes' deformability in rats]. [In Russian].*

15. Chang C.-J., Sally M. H. Cheng, Nelson J. S. *Microvascular effects of Photofrin-induced photodynamic therapy // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2007. No 4. P. 95–99.*

16. Maegawa Y., Itoh T., Hosokawa T. et al. *Effects of Near-Infrared Low-Level Laser Irradiation on Microcirculation // J. Lasers in Surgery and Medicine. 2000. No 27. P. 427–437.*