

УДК 616.092-0091

DOI: 10.24884/1682-6655-2020-19-1-73-81

Д. Р. ФАЙЗУЛЛИНА<sup>1</sup>, Е. Г. СУХОРИУКОВА<sup>1</sup>,  
Г. Ю. ЮКИНА<sup>1</sup>, Н. Н. ПЕТРИЩЕВ<sup>1</sup>, Е. А. КОРНЕВА<sup>2</sup>

## Изменения микроциркуляции и структурных компонентов кожи при фотодинамическом воздействии

<sup>1</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

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12

e-mail: lasmed@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 10.01.19; принята к печати 14.02.20

### Резюме

**Введение.** Особенности изменений микроциркуляции и связь со структурными нарушениями в коже при фотодинамическом воздействии с использованием различных фотосенсибилизаторов (ФС) изучены недостаточно. **Цель** – сравнительный анализ соотношения между морфологическими нарушениями и изменением кровотока в коже при фотоактивации ФС различного химического строения с учетом влияния на тучные клетки (ТК), структурные элементы дермы и подлежащую мышечную ткань. **Материалы и методы.** В работе использовали крыс-самцов Wistar (n=46). ФС вводили внутривенно Радахлорин (РДХ) (5 мг/кг) за 3 ч, Копрпорфирин III (КПФ) (10 мг/кг) за 24 ч до облучения. Для контроля накопления ФС в коже использовали методы флуоресцентной видеодерматоскопии и конфокальной сканирующей лазерной микроскопии (КСЛМ). Лазерное облучение (662 и 635 нм) проводили с плотностью энергии 50 Дж/см<sup>2</sup>, площадь облучаемой поверхности составляла 0,78 см<sup>2</sup>. Для оценки микроциркуляции в коже использовали метод лазерной доплеровской флуометрии. **Результаты.** По данным видеодерматоскопии максимальные значения флуоресценции в R-канале регистрировали через 6–8 ч после введения и составляли 4901 [4190; 6732] усл. ед. для РДХ и 2997 [2678; 3351] усл. ед. для КПФ. Методом КСЛМ показано, что КПФ слабо визуализируется в стенках сосудов. В опытах с РДХ определяются структуры рыхлой соединительной ткани гиподермы. Через час после лазерного облучения в экспериментах с РДХ, так же как и с КПФ, отмечалось значимое снижение кровотока по сравнению с контролем до 3,61±0,7 и 4,27±1,4 пф. ед. соответственно. Структурные изменения при использовании обоих ФС проявлялись набуханием эндотелия, расширением и полнокровием сосудов, кровоизлияниями в дерме и подлежащей мышечной ткани. Число ТК было снижено. **Заключение.** Лазерное облучение с параметрами, использованными в работе, приводит к значимому снижению кровотока в коже у экспериментальных животных в результате фотоактивации ФС. КПФ требует более высокой плотности энергии облучения. Выявлены морфологические изменения не только на уровне эпидермиса, дермы и гиподермы, но и подлежащей поперечно-полосатой мышечной ткани. В ранние сроки после воздействия отмечается массивная дегрануляция ТК со снижением их числа.

**Ключевые слова:** фотодинамическая терапия, микроциркуляция русла кожи, тучные клетки, лазерная доплеровская флуометрия

**Для цитирования:** Файзуллина Д. Р., Сухорукова Е. Г., Юкина Г. Ю., Петрищев Н. Н., Корнева Е. А. Изменения микроциркуляции и структурных компонентов кожи при фотодинамическом воздействии. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2020;19(1):73–81. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-1-73-81.

UDC 616.092-0091

DOI: 10.24884/1682-6655-2020-19-1-73-81

D. R. FAIZULLINA<sup>1</sup>, E. G. SUKHORUKOVA<sup>1</sup>,  
G. Yu. YUKINA<sup>1</sup>, N. N. PETRISHCHEV<sup>1</sup>, E. A. KORNEVA<sup>2</sup>

## Changes in microcirculation and structural components of the skin under photodynamic effects

<sup>1</sup> Pavlov University, Saint Petersburg, Russia

6-8 L'va Tolstogo street, Saint Petersburg, Russia, 197022

<sup>2</sup> Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg, Russia

12 Academician Pavlov str., Saint Petersburg, Russia, 197376

e-mail: lasmed@yandex.ru

Received 10.01.19; accepted 14.02.20

### Summary

**Introduction.** Distinctive features of microcirculation and their connection with structural disorders in the skin during photodynamic exposure using various photosensitizers (PS) are not well understood. **Objective.** Comparative analysis of

the relationship between morphological abnormalities and changes in blood flow in the skin during photoactivation of PS, taking into consideration the influence on mast cells (MC), structural elements of the dermis and underlying muscle tissue. *Materials and methods.* In this work were used male Wistar rats ( $n=46$ ). PS were administered intravenously: Radachlorin (RDC) (5 mg/kg) 3 hours, Coproporphyrin III (CPP) (10 mg/kg) 24 hours before irradiation. To control the accumulation of PS in the skin, methods of fluorescence videodermatoscopy and confocal scanning laser microscopy (CSLM) were used. Laser irradiation (662 and 635 nm) was performed with an energy density of  $50 \text{ Jcm}^{-2}$ , the irradiated surface area was  $0,78 \text{ cm}^2$ . Laser Doppler flowmetry was used to assess microcirculation in the skin. *Results.* According to videodermatoscopy, fluorescence maximum values in the R channel were recorded 6-8 hours after administration, and amounted to 4901 [4190; 6732] a. u. for RDC and 2997 [2678; 3351] a. u. for CPP. Using the CSLM method, it was shown that CPP is poorly visualized in the walls of blood vessels. In experiments with RDC, the structures of areolar tissue of the hypodermis are determined. An hour after laser irradiation, in experiments with RDC, as well as with CPP, a significant decrease in blood flow was noted compared with the control to  $3,61 \pm 0,7$  and  $4,27 \pm 1,4 \text{ PU}$ , respectively. Structural changes when using both PS showed endothelial swelling, vasodilation and congestion, hemorrhages in the dermis, and underlying muscle tissue. The amount of MC was reduced. *Conclusions.* Laser irradiation with the parameters used in the work leads to a significant decrease in blood flow in the skin in experimental animals as a result of photoactivation of PS. CPP requires a higher radiation energy density. Morphological changes were revealed not only at the level of the epidermis, dermis and hypodermis, but also the underlying striated muscle tissue. In the early stages after exposure, massive degranulation of MC is noted with a decrease in their number.

**Keywords:** photodynamic therapy, microcirculation of the skin, mast cells, laser Doppler flowmetry

**For citation:** Faizullina D. R., Sukhorukova E. G., Yukina G. Yu., Petrishchev N. N., Korneva E. A. Changes in microcirculation and structural components of the skin under photodynamic effects. Regional hemodynamics and microcirculation. 2020;19(1):73–81. Doi: 10.24884/1682-6655-2020-19-1-73-81.

## Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) в настоящее время широко применяется не только в онкологии, но и в дерматологии, пластической хирургии, офтальмологии и других областях медицины [1–4]. В механизме фотодинамического воздействия на биологические ткани основное значение имеют активные формы кислорода, образующиеся в результате фотохимических реакций. Наиболее значимым фактором, оказывающим повреждающее действие на клетки при ФДТ, является синглетный кислород, индуцирующий, в зависимости от дозы облучения, некроз, апоптоз, аутофагию или парантоз [5]. Считается доказанным наличие иммуноопосредованного и сосудистого компонентов в механизме ФДТ [6]. В экспериментах на иммунодефицитных *scid*- (BALB/cByJ-*scid*.TO) и *nud*- (BALB/cBy-*nu*) мышах, которым перевивали ЕМТ6-опухоль, было показано, что противоопухолевый эффект ФДТ достигим только у иммунокомпетентных животных [7]. Данная работа и продолжение исследований в этом направлении позволили сформулировать положение о роли иммунной системы в ФДТ: активация местных, общих иммунных реакций и формирование долгосрочного противоопухолевого иммунного ответа [8]. Таким образом, только фототоксическое повреждение не всегда ведет к эрадикации опухоли за счет гибели всех опухолевых клеток, важную роль играют развитие острого воспаления и инфильтрация опухоли клетками иммунной системы, в первую очередь, за счет нейтрофилов, моноцитов и тучных клеток (ТК) [9]. Сосудистые эффекты при ФДТ связаны с нарушением микроциркуляции (вазоконстрикция, повышение сосудистой проницаемости, адгезия лейкоцитов, тромбоз) [8, 10].

ФДТ получила широкое распространение в дерматологии и онкодерматологии, поскольку кожа наиболее доступна для светового воздействия. Мишенями при этом являются эпидермис, сосуды микроциркуляторного русла и сопровождающие их клетки иммунной системы, соединительная, жировая ткани, придатки кожи, подлежащая мышечная ткань.

Для флуоресцентной диагностики и ФДТ заболеваний кожи чаще всего применяют ФС хлоринового ряда, предшественники протопорфирина IX, фталоцианины и некоторые красители, например, бенгальский розовый [11, 12]. Выраженность фотодинамического эффекта определяется не только физико-химическими свойствами препаратов (липофильность/гидрофильность, квантовый выход генерации синглетного кислорода, стабильность молекулы в реакциях окисления и др.), но и параметрами облучения, в том числе длиной волны, плотностью мощности, временем облучения, плотностью энергии, площадью воздействия и др. [13, 14]. Выбор ФС, интервала времени между введением ФС и облучением, параметры светового воздействия определяют выраженность эффекта ФДТ – преобладание повреждения (некроз клеток), нарушение микроциркуляции, иммуносупрессия или активация местного и общего иммунного ответа, стимуляция репарации [6, 15, 16].

Сравнительное изучение биологических эффектов ФС различного химического строения представляется важным как с научной, так и с клинической точки зрения, так как позволяет использовать преимущества каждого конкретного вещества. Для ФДТ злокачественных опухолей кожи разработаны подробные клинические протоколы, но создаются новые препараты, применение которых требует тщательного доклинического изучения. Патоморфологическое исследование необходимо для оценки структурных изменений клеток и тканей после фотодинамического воздействия. Важно учитывать, что структурные изменения при ФДТ происходят не только в зоне патологического процесса, но и в окружающих тканях, что важно для оценки безопасности препарата и выбора схемы лечения [17].

Малоизученными остаются особенности изменений микроциркуляции при ФДТ с использованием различных ФС, сравнение сосудистых эффектов которых представляется важным с точки зрения клинического применения препаратов. В механизмах регуляции микроциркуляции большое значение

имеют ТК. Несмотря на то, что первые эксперименты по оценке ФДТ-воздействия на ТК проводились еще в 1961 г., вопросы органоспецифической реакции в ранние сроки после облучения с учетом особенностей ФС остаются недостаточно изученными [18–21]. Так же, как и изменения подлежащей мышечной ткани в ответ на фотодинамическое воздействие на кожу, хотя эти изменения являются маркером глубины повреждения и, следовательно, определяют фактические возможности ФДТ, а не только расчетные, основанные на глубине проникновения излучения [22].

**Целью** исследования является сравнительный анализ соотношения между морфологическими нарушениями и изменением кровотока в коже при фотоактивации ФС различного химического строения с учетом влияния на ТК, структурные элементы дермы и подлежащую мышечную ткань.

### Материалы и методы исследования

В работе использовали крыс-самцов линии Wistar (n=46) с массой тела  $250 \pm 50$  г (питомник лабораторных животных «РАППОЛОВО»), в соответствии с «Руководством по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПбГМУ им. И. П. Павлова» (2014), разрешение этического комитета получено. Животных содержали в стандартных условиях.

В качестве ФС использовали Радахлорин (РДХ), («Радафарма», Россия); Копропорфинин III (КПФ), («Элест», Россия). ФС вводили внутривенно в *v. caudalis* крыс: РДХ (5 мг/кг) за 3 ч, КПФ (10 мг/кг) за 3 и 24 ч до облучения.

РДХ – препарат хлоринового ряда, используется для флуоресцентной диагностики и ФДТ злокачественных новообразований и имеет следующий состав: хлорин  $e^6$  (80–90 %), пурпурин-5 (5–20 %), пурпурин-18 – хлорин  $p^6$  (0–15 %). ФС получают из биомассы микроводоросли рода *Spirulina* [23]. Максимумы полос абсорбции водного раствора РДХ при pH=7 определяются на длинах волн 285, 402, 502, 655 нм, флуоресценции – с максимумом около 660 нм. Квантовый выход генерации синглетного кислорода ( $\phi_\Delta$ ) = 0,52 [24].

КПФ – раствор для инфузий, состоящий из водорастворимой тетракалиевои соли копропорфина III (89,25 %), не более чем на 1 % – из белковых и пептидных соединений и, приблизительно, на 10 % – из примесей других порфиринов, продуцентом которых является культура *Arthrobacter globiformis* [25]. Препарат в растворе фосфатного буфера (pH=7,0) и концентрации 20 мкМ имеет полосу Сорс 373 нм, ряд полос возбуждения в зеленом спектральном диапазоне: максимумы – на 500, 535 и 557 нм и слабую красную полосу – на 606 нм,  $\phi\Delta$  = 0,37 [26, 27].

Эксперименты проводили на наркотизированных животных, для этого внутривенно вводили препараты Золетил 50 (VIRBAC, Франция) и Ксила (De Adelaar B. V., Нидерланды) в равных объемах в дозе 0,5 мл/кг. Крыс помещали на термостатируемый столик TCAT-2 Temperature Controller (Physitemp, США) с постоянным поддержанием ректальной температуры в пределах 37,0–37,5 °С. Шерсть на коже спины удаляли

механически, затем маркером с учетом костных ориентиров размечали место воздействия.

Накопление в коже РДХ и КПФ (n=8) регистрировали методом флуоресцентной видеодерматоскопии «EcoSkin» (RSC, Респ. Корея), источник возбуждения – светодиоды с центральной длиной волны 405 нм [28]. Яркость флуоресценции оценивали при помощи специального программного обеспечения, которое позволяет проводить оценку выбранных параметров в определенных фрагментах изображения с учетом заранее проведенной калибровки по стандартным образцам. Регистрация результатов осуществлялась в виде фотоизображений, при этом выполнялись измерения сигналов в спектральных каналах *R*, *G* и *B* с максимумами чувствительности 620, 540 и 480 нм соответственно.

Накопление и распределение ФС в сосудах микроциркуляторного русла кожи (n=8) оценивали методом лазерной конфокальной сканирующей микроскопии. Взятие пленочного препарата рыхлой соединительной ткани кожи спины крыс производили через 3 ч после внутривенного введения ФС. Препарат помещали на предметное стекло, заключали в глицерин и анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 510 (Carl Zeiss, Германия) с программным обеспечением ZEN (Carl Zeiss, Германия). Для визуализации клеточных структур часть препаратов фиксировали в растворе Карнуа и после стандартной гистологической методики со спиртами возрастающей концентрации окрашивали гематоксилином Майера и эозином (Bio-Optica, Италия) с последующей световой микроскопией на приборе Leica DM 750 (Leica, Германия).

Облучение кожи проводили с использованием полупроводниковых лазерных аппаратов: АЛОД-01 («Алком медика», Россия), 662 нм, и ЛАХТА-МИЛОН («МИЛОН Лазер», Россия), 635 нм. В опытах применяли световод с линзой для наружного облучения биотканей («Полироник», РФ), диаметр светового пятна на поверхности кожи – 1 см, площадь воздействия – 0,78 см<sup>2</sup>. Используемые ФС и параметры облучения приведены в таблице.

Для оценки микроциркуляции в коже до и после лазерного воздействия использовали лазерный доплеровский флуометр Laser Doppler Monitor BLF21 (Transonik Systems Inc., США). Результаты приводятся в перфузионных единицах (пф. ед.), которые эквивалентны кровотоку в мл/мин/100 г ткани. Измерения проводили до облучения и через 1 ч после него.

Через 1 ч после облучения производили взятие образцов кожи в месте фотодинамического воздействия при помощи инструмента для панч-биопсии диаметром 0,8 см (MEDAX, Италия). Далее материал фиксировали в 10 % нейтральном формалине на фосфатном буфере (pH=7,4) не менее 24 ч. Образцы от всех животных обрабатывали параллельно, чтобы получить сопоставимые результаты и в одинаковых условиях. После формалиновой фиксации использовали стандартную гистологическую методику со спиртами возрастающей концентрации, материал заливали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 5 мкм готовили с помощью микротомы Accu-Cut SRT 200



## Варианты воздействия и параметры облучения кожи в эксперименте

## Variants of exposure and parameters of skin irradiation in the experiment

Группа животных	Фотосенсибилизатор	Параметры облучения кожи				
		длина волны ( $\lambda$ ), нм	плотность энергии ( $\rho$ ), Дж/см <sup>2</sup>	мощность, Вт	плотность мощности, Вт/см <sup>2</sup>	время облучения, мин
Контроль (n=6)	–	–	–	–	–	–
Введение ФС (n=12)	Радахлорин	–	–	–	–	–
	Копропорфирин	–	–	–	–	–
После ФДТ (n=12)	Радахлорин	662	50	0,1	0,128	6,5
	Копропорфирин	635	50	0,1	0,128	6,5

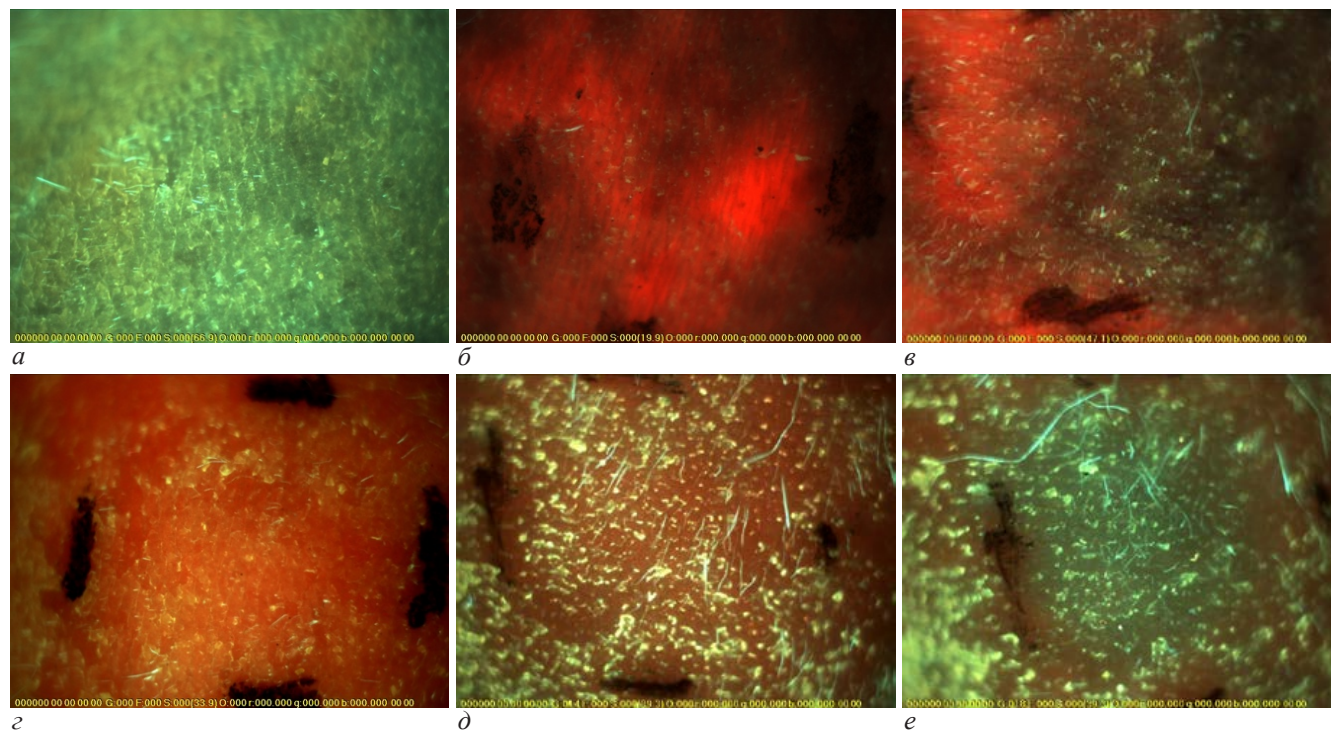


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции структур кожи после введения РДХ и КПФ, R-канал. Результаты видеодерматоскопии кожи животных: а – контроль; б – через 3 ч после введения РДХ; в – фотообесцвечивание сразу после облучения с  $\rho=50$  Дж/см<sup>2</sup>,  $\lambda=662$  нм на фоне РДХ; г – через 3 ч после введения КПФ; д – через 24 ч после введения КПФ; е – фотообесцвечивание сразу после облучения с  $\rho=50$  Дж/см<sup>2</sup>,  $\lambda=635$  нм на фоне КПФ

Fig. 1. The fluorescence intensity of the skin structures after the introduction of RDC and CPP, R-channel. The results of animal's skin videodermatoscopy: а – the control; б – 3 hours after the introduction of RDC; в – photobleaching immediately after irradiation with  $\rho=50$  J/cm<sup>2</sup>,  $\lambda=662$  nm against the background of RDC; г – 3 hours after the introduction of CPP; д – 24 hours after the introduction of CPP; е – photobleaching immediately after irradiation with  $\rho=50$  J/cm<sup>2</sup>,  $\lambda=635$  nm against the background of CPP

(Sakura, Япония) и окрашивали гематоксилином Майера и эозином (Bio-Optica, Италия). Визуализацию тучных клеток проводили окрашиванием толуидиновым синим («БиоВитрум», Россия). Микроскопический анализ проводили на световом микроскопе Leica DM750 (Leica, Германия) при окуляре 10, объективе 10 и 40. Фотосъемку гистологических объектов выполняли, используя цифровую микрофотокамеру ICC50 (Leica, Германия).

Статистическую обработку результатов производили с использованием стандартных программ («Statistica 7.0 Stat Soft» for Windows, «Sigma Plot 12.5»). Вид распределения количественных признаков оценивали по критерию Шапиро – Уилка. Данные в случае нормально распределенных признаков описаны средним значением и стандартным отклонением ( $M \pm SD$ ), а параметры, не имеющие нормального

распределения, – 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  $p < 0,05$  и  $p < 0,001$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

На рис. 1 показаны фотографии кожи крыс, полученные методом флуоресцентной видеодерматоскопии. Размеры представленных участков кожи – 14,5×11,5 мм, зона облучения отмечена черным маркером. До введения ФС аутофлуоресценция кожи крыс на исследуемом поле площадью 0,78 см<sup>2</sup> в R-канале (максимум спектральной чувствительности – 620 нм) составляла 390 [373; 412] усл. ед. Как следует из рис. 1, через 3 ч после введения РДХ

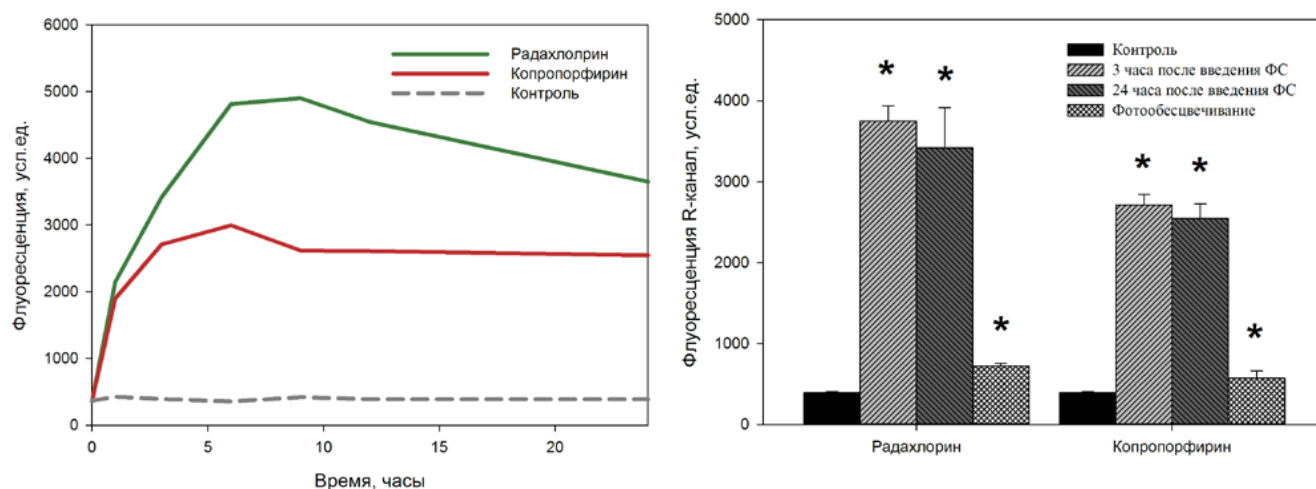


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции структур кожи крыс в течение 24 ч после внутривенного введения РДХ и КПФ в R-канале по результатам флуоресцентной видеодерматоскопии; \* –  $p < 0,05$  по сравнению с контролем

Fig. 2. The fluorescence intensity of rat skin structures within 24 hours after intravenous administration of RDC and CPP in the R-channel according to the results of fluorescence videodermatoscopy; \* –  $p < 0,05$  compared with the control

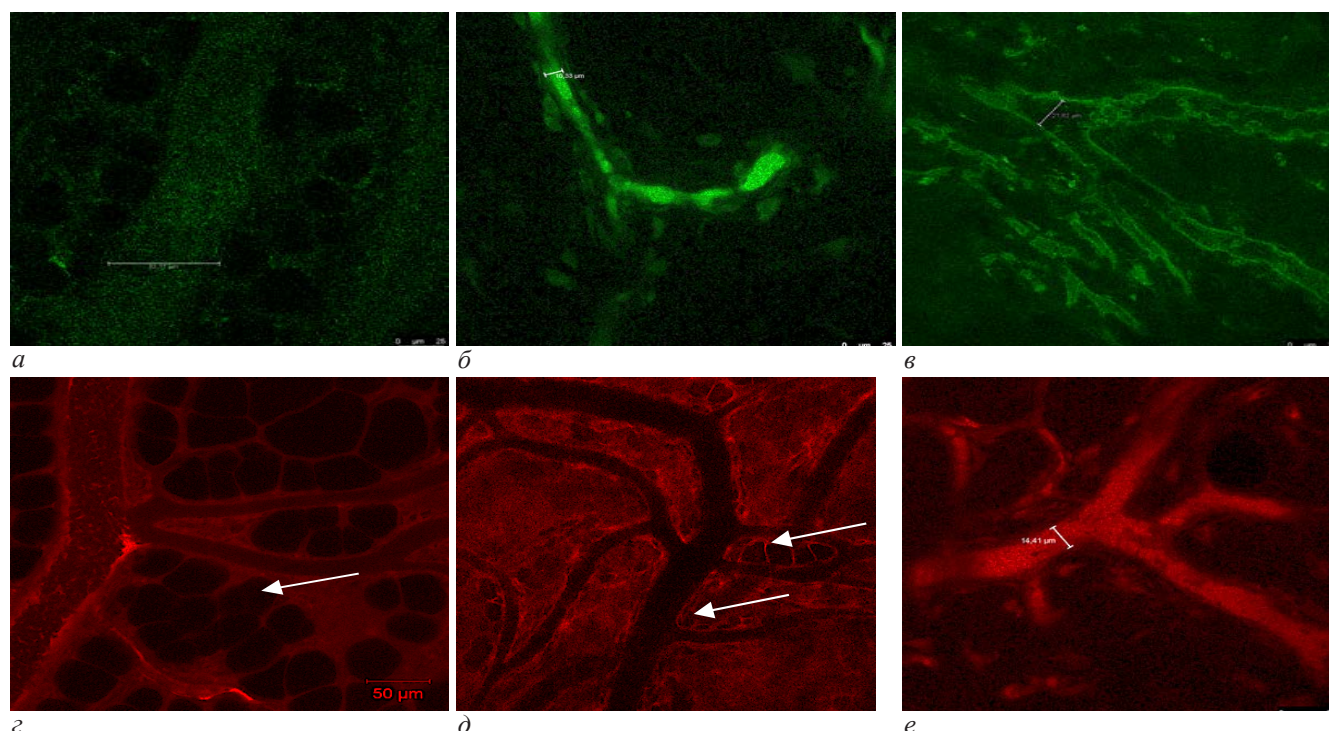


Рис. 3. Распределение ФС в сосудах микроциркуляторного русла рыхлой соединительной ткани подкожной жировой клетчатки крыс через 3 ч после внутривенного введения: а – контроль; б, в – КПФ; з–е – РДХ. Ув. 400 (об. 40×, ок. 10).

Стрелками показаны адипоциты, фибробласты, ТК

Fig. 3. The FS distribution in the microvasculature vessels of the rat's areolar tissue of the hypodermis 3 hours after intravenous administration: а – control; б, в – CPP; з–е – RDC. H 400 (about 40×, approx. 10). Arrows indicate adipocytes, fibroblasts, mast cells

и КПФ наблюдали многократное усиление интенсивности флуоресценции в коже животных. Сразу после лазерного облучения кожи животных, которым предварительно вводили ФС, интенсивность флуоресценции снижалась вследствие деградации флуорофоров («photobleaching»), наблюдаемый эффект служил одним из маркеров развития эффектов ФДТ (рис. 1, в, е). После фотоактивации РДХ отмечали снижение флуоресценции на 77 %, а в опытах с КПФ – на 78 %.

На рис. 2 показано изменение интенсивности флуоресценции кожи после введения ФС в течение суток. Через 3 ч после введения обоих ФС флуоресценция

значимо повышалась по сравнению с контролем ( $p=0,02$ ). Максимальную интенсивность флуоресценции регистрировали через 6–8 ч после введения ФС, затем она постепенно снижалась, но даже через 24 ч значимо превышала контрольные показатели. При сравнении флуоресценции через 3 и 24 ч значимых отличий не обнаружено.

Учитывая полученные данные, проведена серия экспериментов по оценке накопления и распределения ФС в сосудах микроциркуляторного русла гиподермы методом конфокальной сканирующей лазерной микроскопии. Как показано на рис. 3, КПФ слабо визуализируется в периваскулярных



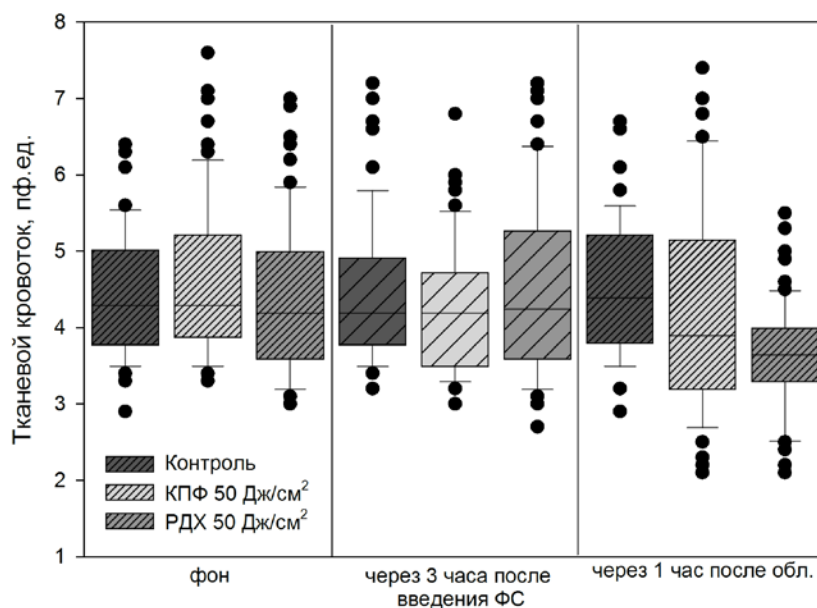


Рис. 4. Интенсивность перфузии кожи крыс через 1 час после ФДТ:

\* –  $p < 0,001$  по сравнению с контролемFig. 4. The rat's skin perfusion intensity 1 hour after PDT: \* –  $p < 0,05$ ;\*\* –  $p < 0,001$  compared with the control

участках, а также в стенках сосудов. В опытах с РДХ визуализируются структуры рыхлой соединительной ткани гиподермы – сосуды, адипоциты, фибробласты, ТК, что соответствует картине при окрашивании гематоксилином Майера и эозином пленочных препаратов.

В предварительных исследованиях было показано, что воспроизводимые результаты изменений тканевого кровотока после ФДТ наблюдаются при введении доз ФС и применении параметров облучения, указанных в таблице. Сроки облучения были выбраны в соответствии с используемыми в клинической практике.

В коже спины интактных крыс методом лазерной доплеровской флуометрии тканевой кровотока регистрировался на уровне  $4,61 \pm 0,91$  пф. ед. Как показано на рис. 4, введение РДХ и КПФ без последующего облучения через 3 ч не приводило к значимым изменениям кровотока.

Для оценки влияния лазерного облучения на тканевую кровотока была выполнена серия экспериментов без введения ФС. У животных через час после облучения с длиной волны 662 нм и  $50 \text{ Дж/см}^2$  тканевая перфузия составила  $4,33 \pm 1,1$  пф. ед. ( $p = 0,155$ ). Облучение длиной волны 635 нм и плотностью энергии  $50 \text{ Дж/см}^2$  также не приводило к значимым изменениям кровотока, который в этом случае был на уровне  $4,32 \pm 0,9$  пф. ед. ( $p = 0,158$ ).

Вне зависимости от длины волны, лазерное облучение без ФС приводило к набуханию и разрыхлению верхних слоев эпидермиса, дезорганизации и отеку пучков коллагеновых волокон, резкому расширению и полнокровию сосудов дермы и гиподермы. Наблюдался незначительный отек эндомизия и перимизия, разволокнение миофибрилл в мышечных волокнах, прилегающих к дерме, поперечная исчерченность сохранялась. ТК располагались периваскулярно группами по 3–6 клеток, признаки дегрануляции отсутствовали.

После ФДТ с РДХ наблюдали значимое снижение кровотока по сравнению с контролем – через час после воздействия перфузия кожи снижалась до  $3,61 \pm 0,7$  пф. ед. ( $p < 0,001$ ). Фотоактивированный РДХ приводил к разрыхлению рогового и набуханию зернистого слоев. В отличие от облучения в шиповатом слое, визуализировались единичные вакуолизированные клетки. Определялись многочисленные экстравазаты на фоне полнокровных сосудов дермы с набухшим эндотелием. В дерме наблюдались лейкоцитарная инфильтрация, дезорганизация и отек пучков коллагеновых волокон (рис. 5). В гиподерме сосуды полнокровны, резко расширены. В мышечном слое отмечается отек волокон, отсутствие поперечной исчерченности, лейкоцитарная инфильтрация. ТК в коже практически отсутствуют.

В опытах с КПФ также наблюдалось значимое снижение кровотока до  $4,27 \pm 1,4$  пф. ед. ( $p = 0,048$ ) по сравнению с контролем. При этом гистологические признаки повреждения напоминали таковые при ФДТ с РДХ. Отличия наблюдались в эпидермисе в виде единичных гиперхромных клеток в базальном слое, присутствии не только расширенных и полнокровных сосудов в дерме, но и спавшихся. Мышечные волокна сохраняли поперечную исчерченность. ТК также практически полностью отсутствуют.

После внутривенного введения ФС в коже и сосудах микроциркуляторного русла происходит накопление РДХ и КПФ, интенсивность флуоресценции быстро нарастает в течение первых 3 ч после введения и достигает максимума к 6–8-му часу после введения. Через 24 ч интенсивность флуоресценции кожи снижается, однако остается значимо высокой по сравнению с контролем. Лазерное облучение с выбранными для исследования параметрами приводит к фотообесцвечиванию, снижению интенсивности флуоресценции, что является дополнительным критерием развития фотодинамического эффекта и является перспективным методом дозиметрии ФДТ.

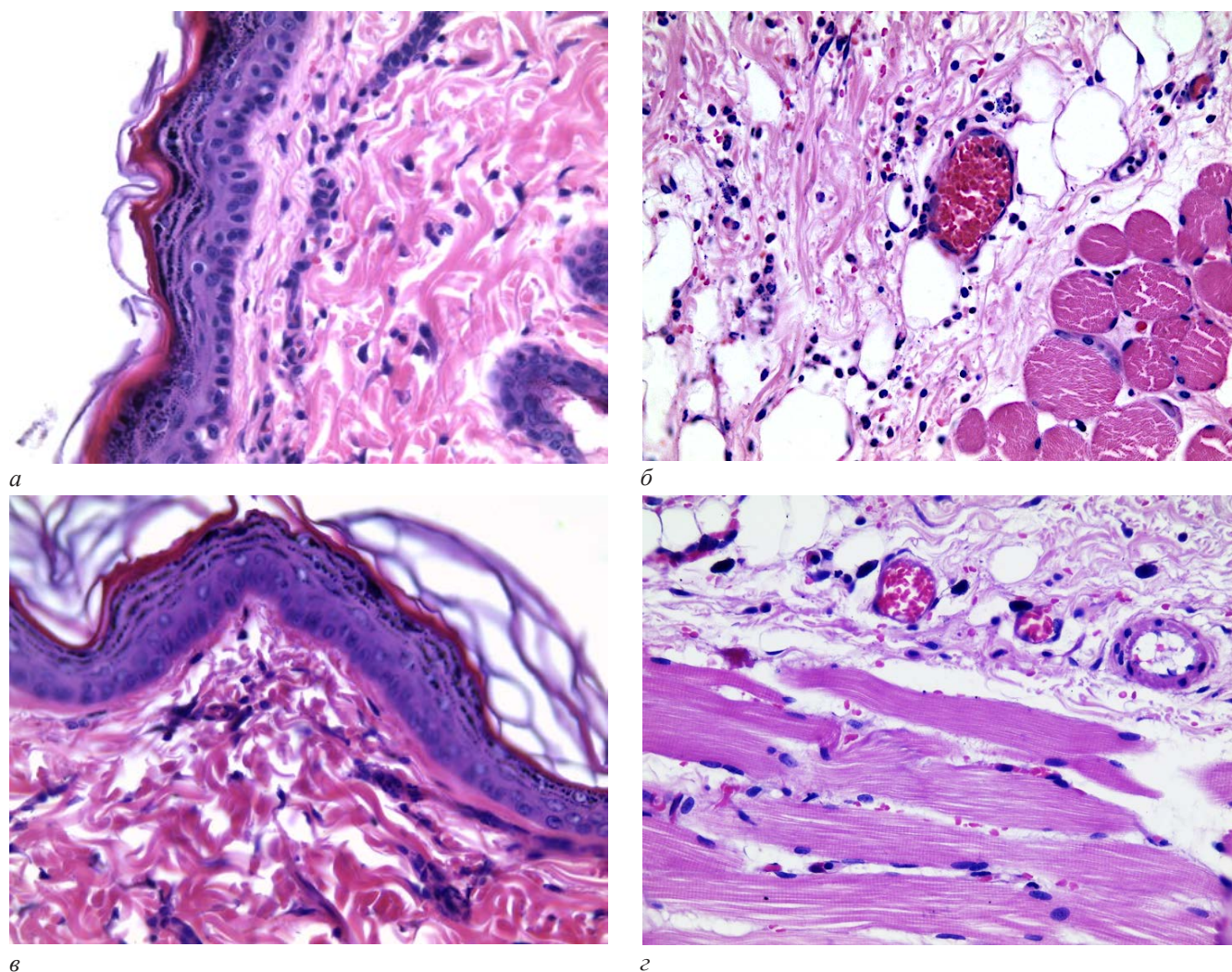


Рис. 5. Микрофотографии срезов кожи после ФДТ: а, б – с РДХ в качестве ФС; в, г – с КПФ в качестве ФС. Окраска гематоксилином и эозином, ув. 400 (об. 40×, ок. 10). Стрелками показаны полнокровные расширенные сосуды

Fig. 5. Micrographs of skin sections after PDT: а, б – with RDC as a FS; в, г – with CPF as a FS. Stained with hematoxylin and eosin, h. 400 (about 40×, approx. 10). Arrows indicate full-blooded dilated vessels

По результатам конфокальной сканирующей лазерной микроскопии пленочных препаратов рыхлой соединительной ткани гиподермы показано накопление ФС в просветах сосудов, в компонентах сосудистой стенки микроциркуляторного русла и окружающих тканях. Флуоресценция в структурах артериол, венул и капилляров с визуализацией таких структур, как адипоциты, фибробласты и ТК, выражена сильнее при использовании РДХ, в сравнении с КПФ. Распределение и накопление ФС в сосудах микроциркуляторного русла определяют выраженность фотодинамического эффекта, связанного с повреждающим действием на сосуды, и, следовательно, на развитие ишемии опухоли, как дополнительного фактора ее деструкции.

Выраженность снижения кожного кровотока при фотодинамическом воздействии в значительной степени соответствовала структурно-морфологическим изменениям, наблюдавшимся при гистологическом исследовании кожи. Не фотоактивированные ФС, с учетом зарегистрированной флуоресценции, не приводили к значимому снижению кровотока и патоморфологическим изменениям.

Оценка кровотока в сосудах микроциркуляторного русла кожи – это функциональный показатель,

отражающий соответствие кровотока потребностям тканей. При использовании РДХ в качестве ФС через час после облучения, в сравнении с КПФ, снижение кровотока выражено сильнее (28,3 и 6,3 % соответственно). Таким образом, РДХ приводит к более значимому снижению кровотока в сосудах микроциркуляторного русла, чем КПФ. При этом гистологические признаки повреждения напоминали таковые при ФДТ с РДХ, однако были менее выражены.

Лазерное облучение с параметрами, использованными в работе, приводит к значимому снижению кровотока в коже у экспериментальных животных в результате фотоактивации ФС и сопровождаются морфологическими изменениями не только на уровне эпидермиса, дермы и гиподермы, но и захватывают подлежащую поперечно-полосатую мышечную ткань. Данное наблюдение интересно в связи с тем, что проникающая способность красного света ( $\lambda=635, 662$  нм) составляет порядка 2–3 мм, и, с учетом толщины кожи крыс (собственно дерма спины –  $120\pm 14$  мкм), наблюдаемый эффект опосредован ФДТ-воздействием [29]. ФДТ оказывает повреждающее действие на ткани в результате снижения кровотока, возможной инициации апоптоза (как внутреннего, так и внешнего пути),



некроза, аутофагии, за счет активации иммунной системы. Каждый из компонентов повреждения может преобладать в зависимости от свойств ФС. В частности, внутриклеточное распределение ФС может играть ключевую роль в механизме клеточной гибели. Время жизни АФК крайне ограничено, поэтому для повышения эффективности ФДТ их образование должно происходить внутри клетки. Ядерный аппарат и митохондрии рассматриваются как основные мишени внутриклеточного действия ФС, поскольку они играют решающую роль в регуляции апоптоза. Так, повреждение митохондрий активирует апоптоз, цитохром С, каспазы-9 и -3 [30].

Таким образом, общими признаками реакции кожи на фотодинамическое воздействие с облучением красным светом являются повреждение эпидермиса (разрыхление и набухание рогового слоя, вакуолизация клеток шиповатого слоя, гиперхромность клеток базального слоя), дезорганизация и отек пучков коллагеновых волокон, набухание эндотелия, расширение и полнокровие сосудов дермы и гиподермы, экстравазаты в дерме и подлежащей мышечной ткани, лейкоцитарная инфильтрация, дегрануляция ТК со снижением их числа.

### Заключение

Для ФДТ характерно повреждение всех слоев эпидермиса, наличие признаков острого воспаления в дерме и гиподерме, расширение и полнокровие сосудов дермы и гиподермы, экстравазаты, повреждение подлежащей мышечной ткани, дегрануляция ТК со снижением их числа. При одинаковой дозе облучения – 50 Дж/см<sup>2</sup> – степень выраженности изменений микроциркуляции и структур кожи была значительно более выражена в опытах с РДХ. Полученные результаты подтверждают, что химическое строение ФС определяет характер сосудистых изменений и является важным фактором, определяющим успех ФДТ в клинической практике. Показанное в работе повреждение подлежащих мышц является важным для определения параметров облучения и выбора ФС для конкретной терапевтической задачи.

### Конфликт интересов / Conflict of interest

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

### Литература / References

1. Wen X, Li Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy in dermatology beyond non-melanoma cancer: An update. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;19:140–152. Doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.06.010.
2. Сажнев Д. И., Андреев А. А., Остроушко А. П. Фотодинамическая терапия в хирургической практике // *Вестн. эксперим. и клин. хирургии*. 2019;12(2):141–146. [Sazhnev DI, Andreev AA, Ostroushko AP. Photodynamic therapy in surgical practice. *Journal of experimental and clinical surgery*. 2019;12(2):141–146. Doi: 10.18499/2070-478X-2019-12-2-141-146. (In Russ.)].
3. Blasi AM, Pagliara MM, Angela L, Sammarco MG, Caputo CG, Grimaldi G, Scupola A. Photodynamic therapy in ocular oncology. *Biomedicine*. 2018;6:1–6. Doi: 10.3390/biomedicine6010017.
4. Le Pillouer-Prost A, Cartier H. Photodynamic photorejuvenation: A review. *Dermatologic Surg*. 2016;42:21–30. Doi: 10.1097/DSS.0000000000000528.
5. Nonell S, Flors C. Singlet oxygen applications in biosciences and nanosciences. 2016:75–91. Doi: 10.1039/9781782622208-00075.
6. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, Hahn SM, Hamblin MR, Juzeniene A. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61:250–281. Doi: 10.3322/caac.20114.PHOTODYNAMIC.
7. Korbely M, Krosz G, Krosz J, Dougherty GJ. The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Res*. 1996;56:5647–5652.
8. Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2005;2:91–106. Doi: 10.1016/S1572-1000(05)00060-8.
9. Krosz G, Korbely 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.
10. Busch TM. Local physiological changes during photodynamic therapy. *Lasers Surg Med*. 2006;38:494–499. Doi: 10.1002/lsm.20355.
11. Поняев А. И., Глухова Я. С., Черных Я. С. Фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии (обзор) // *Изв. СПбГТИ(ТУ)*. – 2017. – Т. 41. – С. 71–78. [Ponyaev AI, Gluhova YaS, Cherny Yh YaS. Photosensitizers for photodynamic therapy (review). *Bulletin of St Petersburg Technical University*. 2017;41:71–78. (In Russ.)]. Doi: 10.1155/2013/697850.
12. Шляхтин С. В., Трухачева Т. В. Возможности и перспективы использования производных хлорофилла для создания эффективных и безопасных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Обзор литературы // *Вестн. фармаци*. – 2010. – Т. 2. – С. 87–106. [Shlyaxtin SV, Truxacheva TV. Possibilities and prospects of using chlorophyll derivatives to create effective and safe photosensitizers for photodynamic therapy. Literature review. *Vestnik Farmacii*. 2010;2:87–106. (In Russ.)].
13. Hamblin MR, Huang Y-Y. *Handbook of photomedicine*. 2014.
14. Abrahamse H, Hamblin RM. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Physiol Behav*. 2017;176:139–148. Doi: 10.1016/j.physbeh.2017.03.040.
15. 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.
16. Inage K, Sakuma Y, Yamauchi K, Suganami A, Orita S, Kubota G, Oikawa Y, Sainoh T, Sato J, Fujimoto K, Shiga Y, Takahashi K, Ohtori S, Tamura Y. Effect of photodynamic therapy on local muscle treatment in a rat muscle injury model: A controlled trial. *J Orthop Surg Res*. 2015;10. Doi: 10.1186/s13018-015-0193-9.
17. Kübler AC, Stenzel W, Rühling M, Meul B, Fischer JH. Experimental evaluation of possible side effects of intra-operative photodynamic therapy on rabbit blood vessels and nerves. *Lasers Surg Med*. 2003;33:247–255. Doi: 10.1002/lsm.10220.
18. McGovern V. Mast cells in photosensitivity reactions. *Nature*. 1961;191:90–91.
19. Brooke RCC, Sinha A, Sidhu MK, Watson REB, Church MK, Friedmann PS, Clough GF, Rhodes LE. 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.



20. 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.
21. Prignano F, Lotti T, Spallanzani A, Berti S, De Giorgi V, Moretti S. Sequential effects of photodynamic treatment of basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2009;36:409–416. Doi: 10.1111/j.1600-0560.2008.01063.x.
22. de Bruijn HS, Meijers C, van der Ploeg - van den Heuvel A, Sterenborg HJCM, Robinson DJ. Microscopic localisation of protoporphyrin IX in normal mouse skin after topical application of 5-aminolevulinic acid or methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2008;92:91–97. Doi: 10.1016/j.jphotobiol.2008.05.005.
23. Решетников А. В., Залевский И. Д., Кемов Ю. В. и др. Фотосенсибилизатор и способ его получения: пат. Рос. Федерация № 2183956 от 21 декабря 2001 г. *United States Patent US 6,969,765 of Nov. 29, 2005*. [Reshetnikov AV, Zalevsky ID, Kemov YuV, Ivanov AV, Karmenyan AV, Gradyushko AT, Laptev VP, Neugodova NP, Abakumova OYu, Privalov VA, Lappa AV. Photosensitizer and method for its preparation. RF patent No. 2183956 dated December 21, 2001. *United States Patent US 6,969,765 dated November 29, 2005*. (In Russ.)].
24. 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.
25. Полатовская О. Г., Барабанищкова Г. В., Малков М. А. и др. Штамм бактерий *arthrobacter globiformis* – продуцент копропорфирина III и способ получения копропорфирина III: пат. Рос. Федерация № 2078138. 1993. [Polatovskaya OG, Drummers GV, Malkov MA, Vykhovsky VYa, Lukina OA. The bacterial strain *arthrobacter globiformis* is a producer of coproporphyrin III and a method for producing coproporphyrin III. RF Patent No. 2078138 of 1993. (In Russ.)].
26. Багров И. В., Белоусова И. М., Горелов С. И. и др. Сравнительные исследования процессов генерации синглетного кислорода при облучении водных растворов препаратов на основе хлорина еб и копропорфирина III // *Оптика и спектроскопия*. – 2017. – Т. 122. – С. 179–184. Doi: 10.7868/s0030403417020064. [Bagrov IV, Belousova IM, Gorelov SI, Dobrun MV, Kiselev VM, Kislyakov IM, Kris'ko AV, Kris'ko TK. Comparative studies of the processes of generation of singlet oxygen upon irradiation. *Optics and Spectroscopy*. 2017;122:179–184. (In Russ.)].
27. Муравьева Т. Д., Дадэко А. В., Киселев В. М. и др. Сравнительное изучение фотофизических свойств низкотоксичных фотосенсибилизаторов на основе эндогенных порфиринов // *Оптич. журн.* – 2018. – Т. 85. – С. 65–80. [Muravyova TD, Dadeko AV, Kiselev VM, Krisko TK, Kislyakov IM, Krisko AV, Starodubtsev AM, Bagrov IV, Belousova IM, Ponomarev GV. Comparative study of the photophysical properties of low-toxic photosensitizers based on endogenous porphyrins. *Journal of Optical Technology*. 2018;85:65–80. Doi: 10.17586/1023-5086-2018-85-11-65-80. (In Russ.)].
28. Флуоресцентный видеодерматоскоп / U. Kang, T. B. Папаян, S.-J. Bae, C. Kim // *Оптич. журн.* – 2008. – Т. 75. – С. 32–38. [Kang U, Papayan GV, Bae S-J, Kim S. Fluorescence videodermatoscope. *Opticheskiy zhurnal*. 2008;75:32–38. (In Russ.)].
29. Шаповалов Д. А., Голуб А. П. Особенности строения кожи крыс в норме и при действии пирогенала // *Морфология*. – 2008. – Т. 2. – С. 71–74. [Shapovalov DA, Golub AP. Structural features of rat skin in normal conditions and under the action of pyrogenal. *Morfologiya*. 2008;2:71–74. (In Russ.)].
30. Fitzgerald F. *Photodynamic therapy (PDT) principles, mechanisms and applications*. New York, Nova Science Publishers, Inc., 2017.

## Информация об авторах

**Файзуллина Динара Рафаэлевна** – ассистент кафедры патофизиологии с курсом клинической патофизиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург (Россия), e-mail: lasmed@yandex.ru.

**Сухорукова Елена Геннадиевна** – канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории патоморфологии Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург (Россия), e-mail: len48@inbox.ru.

**Юкина Галина Юрьевна** – канд. биол. наук, зав. лабораторией патоморфологии Научно-исследовательского центра ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург (Россия), e-mail: pipson@inbox.ru.

**Петришев Николай Николаевич** – д-р мед. наук, профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова» Минздрава России, Санкт-Петербург (Россия), e-mail: lasmed@yandex.ru.

**Корнева Елена Андреевна** – д-р мед. наук, профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, главный научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург (Россия), e-mail: lasmed@yandex.ru.

## Authors information

**Faizullina Dinara R.** – assistant of the Department of Pathophysiology with a course of clinical pathophysiology, Pavlov University, Saint Petersburg (Russia), e-mail: lasmed@yandex.ru.

**Sukhorukova Elena G.** – Cand. of Sci. (Med.), Senior Research Associate of the Laboratory of Pathomorphology of the Research Center, Pavlov University, Saint Petersburg (Russia), e-mail: len48@inbox.ru.

**Yukina Galina Yu.** – Cand. of Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Pathomorphology of the Research Center, Pavlov University, Saint Petersburg (Russia), e-mail: pipson@inbox.ru.

**Petrishchev Nikolay N.** – Dr. of Sci. (Med.), Professor of the Department of Pathophysiology with a course of clinical pathophysiology, Pavlov University, Saint Petersburg (Russia), e-mail: lasmed@yandex.ru.

**Korneva Elena A.** – Dr. of Sci. (Med.), Member of Russian Academy of Sciences, Professor of Institute of Experimental Medicine, Saint Petersburg (Russia), e-mail: lasmed@yandex.ru.