

## ВЛИЯНИЕ ФОТОАКТИВИРОВАННОГО БЕНГАЛЬСКОГО РОЗОВОГО НА МИКРОЦИРКУЛЯЦИЮ

Т.Г. Гришачёва<sup>1,2</sup>, И.А. Михайлова<sup>1</sup>, А.В. Струй<sup>1</sup>, С.Г. Чефу<sup>1,2</sup>, Н.Н. Петрищев<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр им. В.А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

### Резюме

В работе представлены исследования изменения кровотока в венах (15–30 мкм) брыжейки крысы при фотоактивации ( $\lambda = 532$  нм; 0,175 Вт/см<sup>2</sup>; 300 с) введенного внутривенно бенгальского розового (17 мг/кг). Методом прижизненной биомикроскопии регистрировали прогрессирующее уменьшение скорости кровотока как во время лазерного облучения, так и после прекращения процесса фотоактивации фотосенсибилизатора. Проведённые численные оценки тепловых эффектов в облучаемом участке микрососуда за счёт поглощения лазерного излучения гемоглобином крови и бенгальским розовым показали, что повышение температуры не превышает 0,2°C над исходным уровнем. Таким образом, термический эффект практически не оказывает существенного влияния на расстройство микроциркуляции, вызванное фотоактивацией бенгальского розового.

**Ключевые слова:** микроциркуляция, фотосенсибилизатор, бенгальский розовый, средняя скорость кровотока.

**Для цитирования:** Гришачёва Т.Г., Михайлова И.А., Струй А.В., Чефу С.Г., Петрищев Н.Н. Влияние фотоактивированного бенгальского розового на микроциркуляцию // *Biomedical Photonics*. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 11–15.

**Контакты:** Михайлова И.А., e-mail: fisika45@mail.ru

## INFLUENCE OF PHOTOACTIVATED ROSE BENGAL ON MICROCIRCULATION

Gryshachova T.G.<sup>1,2</sup>, Mikhailova I.A.<sup>1</sup>, Struy A.V.<sup>1</sup>, Chephu S.G.<sup>1,2</sup>, Petrishchev N.N.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>I.P. Pavlov State Medical University, St-Petersburg, Russia

<sup>2</sup>Medical Research Centre, St-Petersburg, Russia

### Abstract

The study of mean blood velocity changes in rat mesenteric venules (15–30  $\mu$ m) due to photoactivation ( $\lambda = 532$  nm, 0,175 W/cm<sup>2</sup>, 300 s) of i.v. injected Rose Bengal (17 mg/kg) is represented in the article. Using *in vivo* biomicroscopy the progressive decrease of mean blood velocity both during the laser irradiation and after it was registered. The calculation of thermal effects in the irradiated part of microvessel due to laser absorption by hemoglobin and Rose Bengal showed the rise of temperature was not exceed 0.2°C as compared to initial level. Thus, thermal effect has nearly no significant influence on microvascular disturbances caused by Rose Bengal photoactivation.

**Key words:** microcirculation, photosensitizer, Rose Bengal, mean blood velocity.

**For citations:** Grishacheva T.G., Mikhailova I.A., Struy A.V., Chephu S.G., Petrishchev N.N. Influence of photoactivated Rose Bengal on microcirculation. *Biomedical Photonics*, 2017, T. 6, No. 3, pp. 11–15 (in Russian).

**Contacts:** Mikhailova I.A., e-mail: fisika45@mail.ru

### Введение

В механизме фотодинамического действия на клетки большое значение имеет прямое воздействие активированного кислорода не только на клетки опухоли, но и на сосуды микроциркуляционного русла как самой опухоли, так и окружающих тканей. Наиболее характерные изменения проявляются в спазме сосу-

дов, замедлении кровообращения, внутрисосудистой агрегации эритроцитов и тромбоцитов, образовании тромбов. При фотодинамической терапии [1] фотосенсибилизатор вводят в организм либо внутривенно, либо локально. Затем проводят облучение области новообразования. Фотохимические реакции, приво-

дящие к появлению активных форм кислорода, либо непосредственно ведут к гибели опухолевых клеток, либо вызывают повреждение сосудистого русла опухоли или микрососудов в ее окрестности. Это прежде всего связано с увеличением проницаемости сосудистой стенки и сужением микрососудов. Структурно-функциональные изменения сосудов зависят от вида фотосенсибилизатора и условий облучения [2]. Реакции артериол и венул на фотодинамическое воздействие существенно отличаются. Так, по данным работы [3], у артериол (20–30 мкм) при воздействии лазерного облучения ( $\lambda = 630$  нм; 135 Дж/см<sup>2</sup>; время облучения 30 мин) после введения фотосенсибилизатора первого поколения (фотофрин, 10 и 25 мг/кг) в первые минуты облучения происходило резкое сужение артериол (15–20 мкм), хотя в некоторых случаях происходило расширение. Часть артериол стала неактивна для кровотока, по крайней мере, в течение 1 ч после окончания облучения, другая же часть быстро восстановила первоначальный диаметр. Отмечается, что при указанных концентрациях фотосенсибилизатора иногда образовывались тромбоцитарные тромбы. Влияние фотодинамического воздействия на венулы аналогичного диаметра было менее значительно. При дозе фотосенсибилизатора 10 мг/кг наблюдались незначительные изменения диаметров венул при увеличении плотности энергии до 135 Дж/см<sup>2</sup>, статистически не отличающиеся от контроля. Отмечено образование отдельных тромбов. При дозе фотосенсибилизатора 25 мг/кг происходило значительное (до 60% от начальной величины) сокращение диаметров венул, но без прекращения кровотока, и в течение 1 ч после окончания облучения не происходило восстановления первоначального диаметра [3].

Исследования изменения диаметра и скорости кровотока микрососудов кожи при совмещении изображений, полученных с помощью доплеровской оптической томографии и конфокальной биомикроскопии [4] в присутствии производного бензопорфирина на основе порфиринов (визудин), также показали, что при плотности энергии локального облучения около 260 Дж/см<sup>2</sup> артериола (40±4 мкм) начинала сокращаться, и кровоток полностью останавливался после 6-минутного облучения. В венулах аналогичного диаметра следствием такого же воздействия была адгезия тромбоцитов и последующее образование тромбов. Таким образом, изучение фотореактивности сосудов микроциркуляторного русла в присутствии фотосенсибилизаторов является необходимым этапом к изучению путей оптимизации режимов фотодинамической терапии (ФДТ).

## Материал и методы

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 250–350 г (питомник лабораторных

животных «Рапполово» РАМН) в полном соответствии с «Руководством по использованию лабораторных животных для научных и учебных целей в ПСПБГМУ им. акад. И.П. Павлова» (2014). Животные содержались на неограниченном потреблении корма (стандартный рацион для лабораторных крыс К-120 фирмы «Информкорм», Россия) и воды при фиксированном световом режиме 12.00:12.00 ч (свет:темнота). Температура поддерживалась в пределах 18–20°C, относительная влажность – 50–70%. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней. Животных разделили на 4 группы: 1-я группа – контрольная, интактные крысы; 2-я группа – введение бенгальского розового, 3-я группа – лазерное облучение; 4-я группа – лазерное облучение на фоне предварительного введения бенгальского розового.

Бенгальский розовый (Acros Organics, USA) в дозе 17 мг/кг вводили в хвостовую вену крысы за 1 ч до облучения (период максимальной концентрации в крови). Выбранная концентрация была ниже предельной, которая при выбранной дозе облучения приводит к образованию в микрососудах стабильного тромба [5].

Далее животных наркотизировали: смесь Золетил-50 (Virbac Sante Animale, Франция) – 2 мл и Ксила (Ксилазин гидрохлорид 20 мг/мл, «Interchemie werken «De Adelaar» B.V», Нидерланды) – 1 мл вводили внутримышечно в дозе 0,75 мл/кг.

Оценку фотоиндуцированных нарушений микроциркуляции проводили с использованием общепринятого метода прижизненной биомикроскопии. Через нижнесрединный доступ извлекали петлю тонкой кишки, примыкающую к мезоаппендиксу, для исследования микроциркуляции в венулах 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 с помощью шприцевого автоматизированного дозатора SK-500I стерильным физиологическим раствором (NaCl, 0,9%), температура раствора – 37,5°C.

Для визуальной фиксации нарушения микроциркуляции использовали Макроскоп Wild M420, объектив (Makrozoom 6.3-32x), быстродействующую цифровую камеру Basler acA2000-165uc USB3.0 с матрицей CMOSIS CMV2000 (180 кадров в секунду). Обработку результатов наблюдений проводили с помощью программного обеспечения «МультиМедиа Каталог» (Россия).

Фотоактивацию бенгальского розового *in vivo* проводили с помощью полупроводникового лазера с непрерывной генерацией (DPSS Laser,  $\lambda = 532$  нм, 34 мВт, Южная Корея) через 180 с после начала наблюдения в течение 300 с. Время наблюдения процесса состав-

ляло 300 с после окончания фотодинамического воздействия. Мощность облучения на объекте (0,35 мВт) контролировали с помощью измерителя мощности (Advantest Q8230) перед каждым экспериментом. Лазерный луч ( $\lambda = 532$  нм) в оптическую систему вводили с помощью световода. Для непосредственного воздействия лазерного излучения на микрососуд с целью подбора режима облучения для минимального теплового повреждения микрососуда, при котором начиналось тромбообразование, луч фокусировали через объектив микроскопа МТ-9 (ЛОМО, Россия) с входящим в комплект микроскопа опак-иллюминатором и водно-иммерсионным объективом (20×0,20, ЛОМО, Россия). При этом диаметр лазерного луча на объекте не превышал 20 мкм, а плотность мощности 318 Вт/см<sup>2</sup>, время облучения 0,1 с [6].

Данные по сосудам в каждой группе были объединены в один ряд. Все значения, попавшие в интервал, проинтегрированы и усреднены, получены средние интегральные для каждого интервала. Полученный временной ряд сглажен преобразованием Фурье с полосой пропускания 3 (использовали табличный процессор Microsoft Excel программную аналитическую платформу Deductor Studio). На графике отмечены пределы разброса данных ( $\pm$ SEM,  $p < 0,05$ ).

## Результаты

Воздействие на микрососуды сфокусированным лазерным излучением в присутствии фотосенсибилизаторов является в настоящее время наиболее адекватным способом моделирования расстройств микроциркуляции, инициированных ФДТ. В предварительных исследованиях подобные опыты производили в отсутствие фотосенсибилизаторов при использовании лазерного излучения на длине волн, хорошо поглощаемых гемоглобином крови. Прямое воздействие лазерного излучения на сосудистый эндотелий обусловлено поглощением энергии облучения белками крови (прежде всего, гемоглобином), повышением температуры внутри облучаемого объема крови, и, как следствие, тепловым повреждением луминальной поверхности микрососуда. Определяющими параметрами являются выходная мощность лазера и длительность облучения. При времени воздействия излучения, меньшем характеристического времени релаксации тепла из облучаемого объема микрососуда

$$\tau = \frac{d^2}{6\chi}$$

где  $\chi = 1,2 \cdot 10^{-7}$  м<sup>2</sup>/с – коэффициент термодиффузии и  $d$  – диаметр микрососуда), теплоотвод из нагретого объема сосуда практически отсутствует. Если в качестве объекта рассматривать венулы ( $d = 2 \cdot 10^{-5}$  мкм), то  $\tau = 0,5 \cdot 10^{-3}$  с.

В наших экспериментальных условиях тепло диффундирует в соседние области и происходит нагрев окружающей ткани в характерной зоне тепловой диффузии, где  $\Delta t > \tau$ , и  $L$  за время облучения достигает 0,1 мм. Тогда повышение температуры зоны тепловой диффузии ( $a$ , значит, и микрососуда) над температурой окружающей ткани не превысит

$$\Delta T = \frac{S \Delta t d}{\rho C L^2 \pi} = 32,4^\circ$$

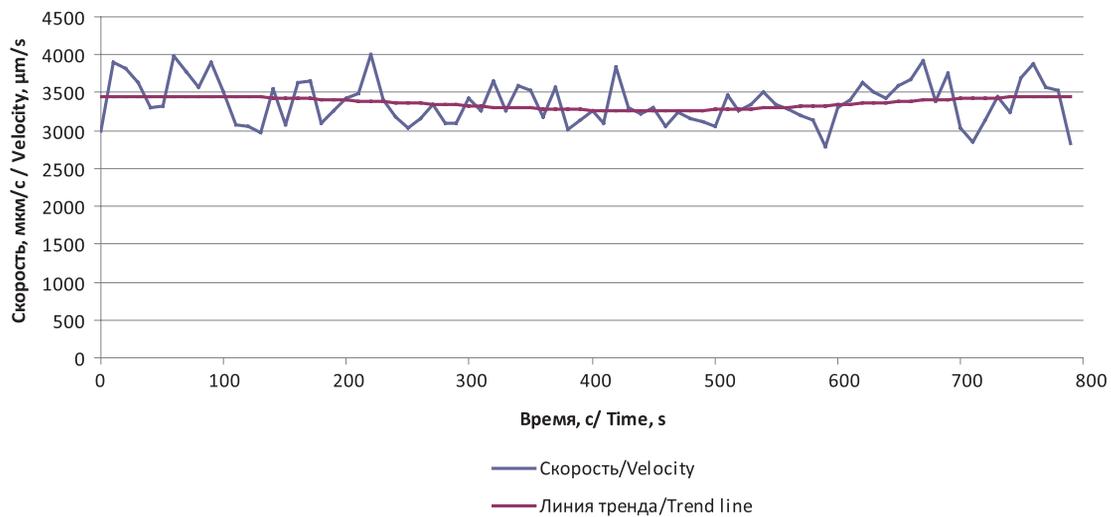
где  $S$  – плотность мощность излучения,  $C$  – удельная теплоемкость и  $\rho$  – плотность биологической ткани. В результате воздействия на эндотелий происходила адгезия и агрегация тромбоцитов к поврежденному участку луминальной поверхности микрососуда.

При исследовании реакции микрососуда на фотодинамическое воздействие в присутствии бенгальского розового у контрольных крыс 1-й группы при наблюдении в течение всего времени эксперимента (13 мин) изменений гидродинамических параметров сосудов достоверно не наблюдалось. Такая же картина наблюдалась и во 2-й группе животных, которым перед наблюдением вводили фотосенсибилизатор. При лазерном облучении на фоне предварительного введения бенгальского розового (4-я группа) наблюдали снижение скорости кровотока сразу после начала облучения (рис.), которое продолжалось и после прекращения процесса фотоактивации.

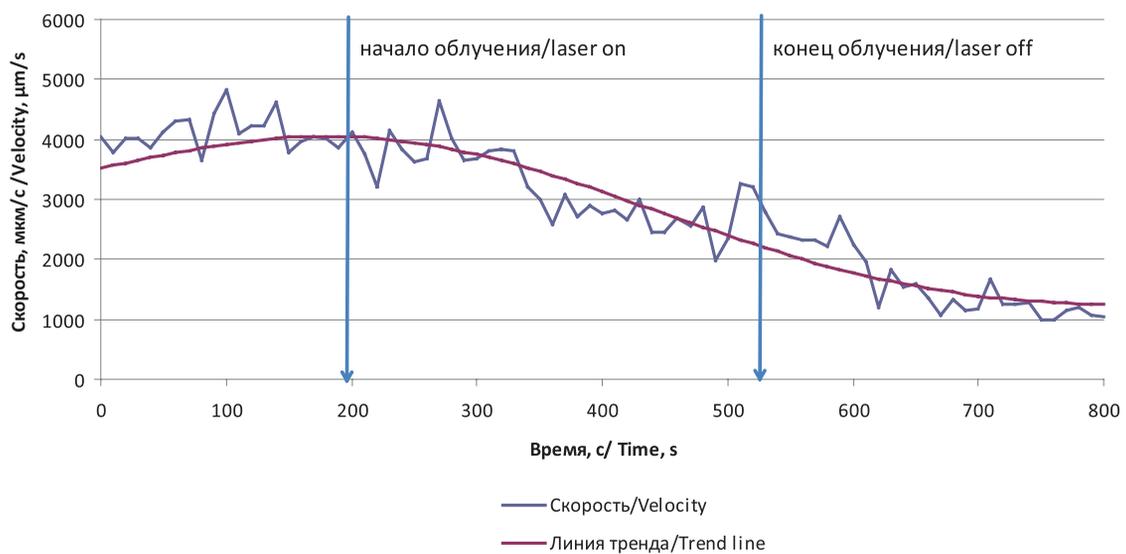
Оценка теплового эффекта в микрососудах крыс 3-й группы при длительности облучения лазером 300 с (плотность мощности 0,175 Вт/см<sup>2</sup>), проведенная по указанной выше формуле с учетом коэффициента экстинкции гемоглобина на длине волны лазера, показала, что в этих условиях повышение температуры облучаемой зоны над температурой окружающей ткани не превысит  $\Delta T = 0,15^\circ\text{C}$ . Такое повышение температуры не влияет на динамику кровообращения, тем более что микрососуды находились в режиме термостатирования [8]. Подобная оценка повышения температуры в присутствии бенгальского розового, коэффициент экстинкции которого на длине волны 532 нм сравним с коэффициентом экстинкции гемоглобина, показала, что при используемой концентрации фотосенсибилизатора она не превышает  $0,22^\circ\text{C}$ . Однако после окончания облучения в микрососудах этой группы крыс наблюдалось постепенное нарастание тромба, причем нарушения микроциркуляции наблюдались не только в районе непосредственного действия излучения, но и на соседних участках.

## Обсуждение

Бенгальский розовый – это фотосенсибилизатор из группы ксантеновых красителей (тетрайодо-



а



б

**Рис.** Влияние лазерного облучения на среднюю скорость кровотока в венах брыжейки крысы при внутривенном введении бенгальского розового (17 мг/кг):

а – в эксперименте без облучения;

б – в эксперименте с облучением ( $\lambda = 532$  нм;  $0,175$  Вт/см<sup>2</sup>)

**Fig.** Effect of laser irradiation on mean blood velocity in mesenteric rat venules for i.v. injected Rose Bengal (17 mg/kg):

а – in the experiment without irradiation;

б – in the experiment with irradiation ( $\lambda = 532$  nm;  $0,175$  W/cm<sup>2</sup>)

тетрахлоро-производное флуоресцеина), обладающий высоким коэффициентом поглощения в видимой области и достаточно большим квантовым выходом синглетного кислорода (0,76). Известно, что бенгальский розовый накапливается в эндотелии сосудов, и генерация синглетного кислорода происходит при воздействии облучения в области

его поглощения в районе 530–560 нм. Однако тенденция бенгальского розового агрегировать в растворе в физиологических условиях и сравнительно небольшая растворимость в липидах в настоящее время ограничивает его широкое применение в клинике для ФДТ. По данным электронной микроскопии [9] результатом этого воздействия является повреж-

дение эндотелиальных клеток, причем этот процесс выходит за область непосредственного воздействия облучения, видимо, вследствие диффузии молекул фотосенсибилизаторов, что наблюдалось и в наших опытах. При этом не происходит деэндотелизации субэндотелиальных слоев, что является хорошей моделью артериального тромбоза при разрушении атеросклеротической бляшки. Эта модель широко применяется для процессов моделирования внутрисосудистого тромбообразования в экспериментах на микрососудах животных [5].

Проведенное в работе [5] детальное исследование тромбоза микрососудов ушных раковин мышей с помощью аргонового лазера ( $\lambda = 514$  нм) показало, что образование тромба в результате прямого теплового воздействия и при предварительном введении бенгальского розового (40 мг/кг) в венулах (100–350 нм) являлись следствием адгезии и агрегации тромбоцитов к сосудистой стенке, что более характерно для артериального тромбоза. В модели прямого лазерного воздействия тромбообразование подавлялось антагонистом GPIIb/IIIa (G4120), влияние антикоагулянтов (ингибиторов тромбина) в этом случае минимально. Тромбы, образующиеся в результате

фотохимического повреждения, имеют более длительный период роста, на который могут оказывать действие как антикоагулянты, так и антиагрегационные препараты [5].

## Заключение

В результате проведенных исследований было установлено, что само по себе лазерное облучение ( $\lambda = 532$  нм) при указанных условиях не вызывает значимых изменений скорости кровотока в венулах брыжейки крысы. Хотя, как показали расчеты, повышение температуры облучаемого объема происходит (приблизительно на  $0,1^\circ\text{C}$ ), этого недостаточно для проявления расстройств в микроциркуляторном русле в отличие от опытов в работе [6], где условия облучения существенно отличались. Введение фотосенсибилизатора с последующим облучением приводит к резким изменениям кровотока, что свидетельствует о том, что расстройства микроциркуляции в присутствии бенгальского розового не связаны с повышением температуры внутри микрососуда (приблизительно на  $0,2^\circ\text{C}$ ), а определяются фотохимическим повреждением эндотелия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Филоненко Е.В. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в онкологии // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 2. – С. 85.
2. Wang W., Moriyama L.T., Bagnato V.S. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT // *Laser Phys. Lett.* – 2013. – Vol. 10(2) – 023001.
3. Fingar V.H., Wieman T.J., Wiehle S.A., Cerrito P.B. The Role of Microvascular Damage in Photodynamic Therapy: The Effect of Treatment on Vessel Constriction, Permeability and Leukocyte Adhesion // *Canc. Res.* – 1992. – Vol. 52. – P. 4914-4921.
4. Khurana M., Moriyama E.H., Mariampillai A., Wilson B.C. Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment // *J. Biomed. Opt.* – 2008. – Vol. 13, No. 4. – 040502.
5. Rosen E.D., Raymond S., Zollmann A., Noria F., Sandoval-Cooper M., Shulman A., Merz J.L., Castellino F.J. Laser-Induced Non-Invasive Vascular Injury Models in Mice Generate Platelet and Coagulation-Dependent Thrombi // *Am. J. Path.* – 2001. – Vol. 158, No. 5. – P. 1613-1622.
6. Кондратьев А.С., Михайлова И.А., Петрищев Н.Н. Моделирование различных форм повреждения сосудистой стенки с помощью лазерного излучения // *Рос. физиол. журнал им. И.М.Сеченова.* – 2013. – № 6. – С. 744-749.
7. Kelly K.M., Kimel S., Smith T.S., Stacy A., Hammer-Wilson M.J., Svaasand L., Nelson J.S. Combined Photodynamic and Photothermal Induced Injury Enhances Damage to In Vivo Model Blood Vessels // *Lasers Surg Med.* – 2004. – Vol. 34. – P. 407-413.
8. Zhu D., Lu W., Weng Y., Cui H., Luo Q. Monitoring Thermal-Induced Changes in Tumor Blood Flow and Microvessels with Laser Speckle Contrast Imaging // *Applied Optics.* – 2007. – Vol. 46, No. 10. – P. 1911-1917.
9. Kretz C.A., Vaezzadeh N., Gross P.L. Tissue Factor and Thrombosis Models // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2010. – Vol. 30. – P. 900-908.

## REFERENCES

1. Filonenko E.V. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in oncology, *Rossiiskii bioterapevticheskii zhurnal*, 2013, Vol. 12, No. 2, p. 85.
2. Wang W., Moriyama L.T., Bagnato V.S. Photodynamic therapy induced vascular damage: an overview of experimental PDT, *Laser Phys. Lett.*, 2013, Vol. 10(2), 023001.
3. Fingar V.H., Wieman T.J., Wiehle S.A., Cerrito P.B. The Role of Microvascular Damage in Photodynamic Therapy: The Effect of Treatment on Vessel Constriction, Permeability and Leukocyte Adhesion, *Canc. Res.*, 1992, Vol. 52, pp. 4914-4921.
4. Khurana M., Moriyama E.H., Mariampillai A., Wilson B.C. Intravital high-resolution optical imaging of individual vessel response to photodynamic treatment, *J. Biomed. Opt.*, 2008, Vol. 13, No. 4, 040502.
5. Rosen E.D., Raymond S., Zollmann A., Noria F., Sandoval-Cooper M., Shulman A., Merz J.L., Castellino F.J. Laser-Induced Non-Invasive Vascular Injury Models in Mice Generate Platelet and Coagulation-Dependent Thrombi, *Am. J. Path.*, 2001, Vol. 158, No. 5, pp. 1613-1622.
6. Kondrat'ev A.S., Mikhailova I.A., Petrishchev N.N. Modeling of different degrees of microvessel laser-induced endothelium damage, *Ros. fiziol. zhurnal im. I.M. Sechenova*, 2013, No. 6, pp. 744-749.
7. Kelly K.M., Kimel S., Smith T.S., Stacy A., Hammer-Wilson M.J., Svaasand L., Nelson J.S. Combined Photodynamic and Photothermal Induced Injury Enhances Damage to In Vivo Model Blood Vessels, *Lasers Surg Med.*, 2004, Vol. 34, pp. 407-413.
8. Zhu D., Lu W., Weng Y., Cui H., Luo Q. Monitoring Thermal-Induced Changes in Tumor Blood Flow and Microvessels with Laser Speckle Contrast Imaging, *Applied Optics*, 2007, Vol. 46, No. 10, pp. 1911-1917.
9. Kretz C.A., Vaezzadeh N., Gross P.L. Tissue Factor and Thrombosis Models, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, Vol. 30, pp. 900-908.