

УДК 577.12; 616.15: 615.849.5-085

## Неинвазивная методика оценки состояния поверхностной микрогемодинамики при фотодинамическом воздействии

С. К. Дик<sup>1</sup>, И. И. Хлудеев<sup>2</sup>, Л. А. ВАСИЛЕВСКАЯ<sup>3</sup>, В. П. ЗОРИН<sup>2</sup>

Метод фотодинамической терапии (ФДТ), первоначально развивавшийся как способ лечения злокачественных новообразований, находит все более широкое применение в терапии патологий неонкологической природы. В первую очередь это заболевания, характеризующиеся неконтролируемым ростом микроваскулярной системы пораженных органов и тканей. К ним относятся ревматоидный артрит, хориоидальная неоваскуляризация тканей глаза, диабетическая ретинопатия и ряд других [1-3]. Перспективы применения ФДТ для лечения подобных заболеваний связаны, прежде всего, с выраженными васкулярными эффектами, наблюдаемыми при использовании многих фотосенсибилизаторов (ФС). Следует отметить, что по данным ряда авторов, основной причиной возникновения некротических изменений в солидных опухолях, наблюдающихся при использовании большинства разрешенных для клинического применения ФС, является прекращение поступления в опухолевые ткани питательных веществ и кислорода в результате повреждения васкулярной системы опухоли и гемостаза [4-6]. Не удивительно, что кровеносная система солидных рассматривается в качестве важной мишени при развитии новых методических подходов ФДТ [7]. С целью повышения эффективности повреждения кровеносных сосудов при ФДТ ведется поиск новых ФС, а также отработка протоколов использования, включающая определение оптимальных режимов светового воздействия (мощность, доза, интервал между введением ФС и началом фотооблучения). Механизмы фотосенсибилизированного повреждения васкулярной системы до конца не выяснены, поскольку конечные эффекты фотодинамического воздействия сильно различаются в зависимости от используемого ФС. Например, ФДТ с Фотофрином ведет к сужению сосудов, адгезии лимфоцитов и образованию тромбов, связанному с активацией тромбоцитов и выбросом тромбосана [8], в то время как использование производных фталоцианина приводит к нарушению проницаемости сосудов [9]. Для оценки изменений состояния кровеносных сосудов при ФДТ в настоящее время наиболее часто используются гистологические методы, например, микроскопический анализ срезов тканей и сосудов органа-мишени. Для прижизненного контроля состояния васкулярной системы в процессе ФДТ в экспериментах применяются методики интравитальной микроскопии. Обычно для этого необходимо вживление подопытным животным специальных камер (ячеек) [10] или проведение хирургического препарирования тканей, наиболее подходящих для визуального контроля (например, брыжейки, cremaster muscle) [11]. В первом случае требуется длительная предварительная подготовка животного к эксперименту, во втором – продолжительность опыта ограничена временем поддержания жизнеспособности выделенных тканей. Инвазивность также можно отнести к недостаткам подобных методик исследования, поэтому в последнее время активно разрабатываются неинвазивные методы контроля состояния васкулярной системы, например, путем регистрации параметров циркуляции крови в сосудах с использованием лазерной доплеровской флоу-метрии. Появились сообщения о попытках применения данного метода для исследования микроциркуляторных нарушений при ряде патологий [12], а также при различных внешних воздействиях [13]. Весьма перспективной, по нашему мнению, является методика измерения, основанная на анализе амплитудно-частотных характеристик спектра флуктуации интенсивности динамического спекл-поля, образованного рассеянным от поверхностных слоев биологической ткани лазерным излуче-

нием [14].

В данной работе проведена оценка возможности применения спекл-оптического метода для контроля кожной микрогемодинамики (МГД) *in vivo* при фотосенсибилизированном воздействии.

**Материалы и методы.** Оценку изменения параметров микроциркуляции крови проводили с помощью оригинального спекл-метрического модуля собственной конструкции [15]. Анализировались следующие амплитудно-частотные характеристики спекл-поля: мощность спектра (МС), средняя частота  $\langle F \rangle$  и коэффициент асимметрии (As) спектра. Расчет спектров производился в диапазонах частот 1-1000 Гц и 50-1000 Гц. В качестве объекта исследования использовалась васкулярная система кожного покрова бедра белых крыс. Перед началом эксперимента проводили химическую депиляцию симметрично расположенных участков поверхности правого и левого бедра животного. Фотовоздействию подвергали поверхность кожных покровов только правого бедра крысы. Полученные в этом регионе результаты измерений сравнивали с контрольными показателями, регистрируемыми в симметричной зоне на левой нижней конечности.

При изучении влияния фотодинамического воздействия на параметры микроциркуляции в качестве ФС применялся хлорин  $e_6$  (Хл  $e_6$ ), водный раствор которого концентрацией  $8 \cdot 10^{-4}$  моль/л вводили в хвостовую вену крысы из расчета 2,5 мг/кг веса животного. Фотооблучение проводилось с помощью полупроводникового лазерного модуля с длиной волны излучения 660 нм, плотность мощности излучения составляла 10 мВт/см<sup>2</sup>.

В экспериментах с использованием интравитальной микроскопии самцов крыс с предварительно препарированной мышцей *stemaster muscle*, зафиксированных на термостабируемой площадке, помещали под объектив люминесцентного микроскопа ЛЮМАМ-ИЗ (ЛОМО, Россия), снабженного специализированной цифровой видеокамерой DCM35 (SCORPTEK, China). Контроль состояния кровеносной системы осуществлялся визуально и с помощью анализа соответствующих видеоизображений (в записи). Дозы вводимого внутривенно Хл  $e_6$  совпадали с указанными выше. Фотовоздействие начинали через 1 минуту после введения ФС и продолжали до наступления гемостаза. Исследуемый участок мышцы облучали светом лазера с длиной волны излучения 660 нм, плотность мощности излучения составляла от 10 до 50 мВт/см<sup>2</sup>.

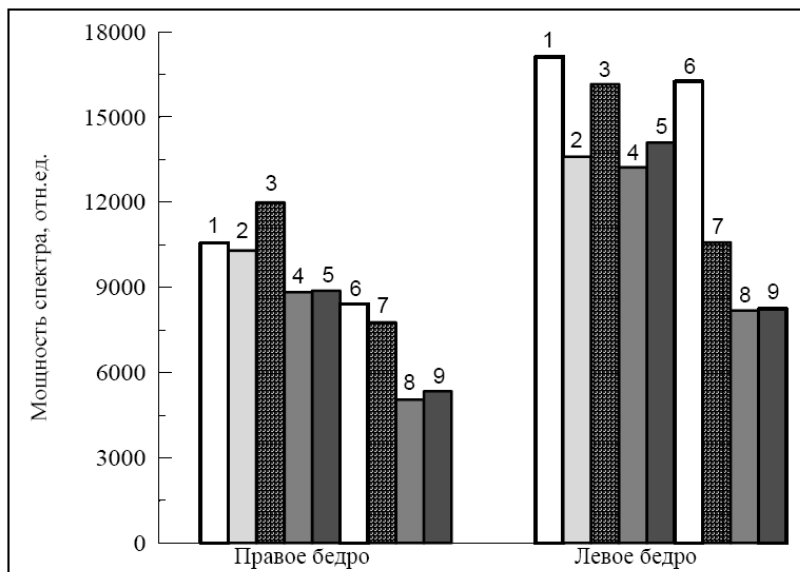


Рисунок 1 – Изменение мощности спектра динамического спекл-поля облученного (правое бедро) и необлученного (левое бедро) участков кожного покрова.

1 – контроль, 2 – введение Хл  $e_6$ , 3 – 30 минут фотовоздействия, 4 – 30 минут после окончания фотовоздействия, 5 – 60 минут после фотовоздействия, 6 – контроль через 23 часа после введения Хл  $e_6$ , 7 – повторное 30-минутное фотовоздействие, 8 – 30 минут после повторного фотовоздействия, 9 – 60 минут после повторного фотовоздействия.

**Результаты и обсуждение.** В серии опытов, результаты которых представлены на рисунке 1, после введения ФС и последующего 30-минутного светового воздействия на кожные покровы существенных изменений состояния поверхностной МГД не выявлено. Однако в области облученного бедра регистрировалась тенденция к возрастанию МС до 17% и незначительное увеличение  $\langle F \rangle$  и As, что, вероятно, является следствием теплового эффекта фотооблучения. Через 30 мин после окончания процедуры МС снижалась в среднем на 20%,

отражая ухудшение кожной МГД в этой области. Следует отметить, что пониженный уровень МС облученной конечности был стабилен спустя 60 мин после окончания облучения и сохранялся на протяжении 23 часов. Проведенное на вторые сутки повторное 30-минутное фотооблучение ухудшало состояние микрогемодинамики процессов в коже правого бедра, что проявлялось в еще более выраженном (в среднем на 30-50%) снижении МС, сохранявшемся через 30 и 60 мин после окончания светового воздействия.

Динамика изменений спекл-оптических параметров микрогемодинамики интактных кожных покровов левого бедра в первые сутки наблюдения сохраняла ту же направленность, что и в кожных покровах правого бедра, подвергавшихся лазерному воздействию. Контрольное измерение показателей через 23 часа, в отличие от результатов, зарегистрированных на правом бедре, выявило восстановление до исходных значений как МС, так и средней частоты спектра в диапазоне частот 50-1000 Гц (табл. 1). Повторное фотооблучение снижало амплитудные характеристики спектра, зарегистрированного на интактной конечности. При этом сразу после окончания 30-минутной световой процедуры МС падала на 35% и в течение 60 мин уменьшалась в 2 раза по сравнению с исходным уровнем. Анализ частотных спектральных параметров кожной МГД показал, что направленность изменений  $\langle F \rangle$  в полосе пропускания 50-1000 Гц на обеих конечностях в первые сутки эксперимента одинакова. Однако на интактной конечности восстановление средней частоты спектра происходило спустя 60 мин после окончания процедуры, сохранялось на этом уровне в течение 23 часов и после повторного 30-минутного сеанса. На облученном бедре значения средней частоты приближались к нормальным показателям позже – через 23 часа. Повторное фотовоздействие вызывало на правом бедре крысы более выраженный сдвиг  $\langle F \rangle$  в область высокочастотных колебаний, чем первичное. Спустя 60 минут после повторного облучения средняя частота спектра снижалась на обеих конечностях, достигая на правой конечности значений нормы.

Таблица 1.

Динамика изменений кожной МГД по данным средней частоты спектра спекл-поля у крыс при фотодинамическом воздействии,  $\bar{X} \pm s_x$ , (n=12)

Условия опыта	Правая конечность, подвергнутая фотооблучению		Левая конечность, интактная	
	Диапазон частот			
	1-1000 Гц	50-1000 Гц	1-1000 Гц	50-1000 Гц
Контроль	190±6	297±8	191±6	315±4
Хл е <sub>6</sub>	184±4	292±9	216±5 P<0,01	328±7
Хл е <sub>6</sub> + 30 минутное фотооблучение	194±4	311±4	232±7 P<0,001	333±6 P<0,01
30 мин после окончания фотооблучения	210±6 P<0,05	315±4 P<0,05	252±9 P<0,001	350±14 P<0,01
60 мин после окончания фотооблучения	209±6 P<0,05	332±7 P<0,01	228±8 P<0,01	313±9
Контроль через 23 час	200±8	304±8	207±9	315±8
Повторное 30 мин фотооблучение	227±5 P<0,001	322±11	199±6	310±8
30 мин после окончания фотооблучения	214±4 P<0,01	329±6 P<0,01	172±5 P<0,01	294±6 P<0,01
60 мин после окончания фотооблучения	185±9	298±4	194±6	300±7

Примечания: P – различия достоверны по отношению к контролю; n – количество исследований.

Проверка эффективности фотосенсибилизированного Хл е<sub>6</sub> повреждения сосудов



Рисунок 2 – Изменение состояния васкулярной системы cremaster muscle при сенсibilизированном Хл е<sub>6</sub> фотовоздействии.

Левый снимок – через 1 минуту после внутривенного введения раствора Хл е<sub>6</sub> до начала светового воздействия; правый снимок – через 80 минут фотооблучения.

проводилось также методом интравитальной микроскопии (рисунок 2). В этих опытах использовались более высокие мощности светового потока (до 50 мВт/см<sup>2</sup>) с целью достижения за время эксперимента полной остановки кровотока в области фотовоздействия. Облучение cremaster muscle крысы, которой введен Хл е<sub>6</sub>, светом в полосе поглощения пигмента приводит к значительным изменениям состояния сосудистой системы ткани. Спустя 20-25 минут после начала облучения наблюдается снижение скорости движения крови, вероятно, из-за сужения кровеносных сосудов и начала процесса тромбообразования. В последующие 10-15 минут вследствие образования тромбов движение крови по отдельным мелким сосудам прекращается. Дальнейшее облучение интенсифицирует реакцию васкулярной системы на фотосенсibilизированное воздействие, в результате чего, как видно из рисунка 2 (нижний снимок), появляются полностью тромбированные участки кровеносных сосудов, между которыми имеются разрывы (участки запустевания). Полный гемостаз сосудов исследуемой ткани наступает после 1,2-1,5 часов фотовоздействия. Кроме того, в случае прекращения фотооблучения через 30 минут после начала в ряде экспериментов наблюдалось восстановление кровотока в полном объеме и с прежней скоростью. Следует отметить, что в отсутствие светового воздействия, а также при фотооблучении контрольных животных не фиксируются изменения васкулярной системы в исследуемой ткани. При освещении участка мышцы светом лазера с плотностью мощности излучения 10 мВт/см<sup>2</sup> в течение 30 минут визуальных существенных изменений в состоянии васкулярной системы не наблюдалось. Отмечалось лишь незначительное изменение скорости движения клеток крови в некоторых кровеносных сосудах. Таким образом, данные наблюдений за состоянием васкулярной системы при фотосенсibilизированном Хл е<sub>6</sub> воздействии с помощью интравитальной микроскопии не противоречат результатам спекл-метрических измерений.

В силу специфики метода анализ параметров спекл-оптических измерений не позволяет определять направление движения потока крови или вычленять наличие либо отсутствие кровотока в отдельных кровеносных сосудах. Однако с помощью спекл-метрического метода можно регистрировать изменения интегрального кровотока в микрососудах, расположенных на контролируемом участке кожи или другой биологической ткани. На различных этапах фотосенсibilизированного повреждения кровеносных сосудов или при использовании различных ФС влияние ФДТ на кровоток может проявляться по-разному. Так, сужение сосудов или уменьшение просвета в результате адгезии клеток крови на стенках сосудов могут приводить на начальном этапе к увеличению скорости кровотока в них. И наоборот, увеличение проницаемости сосудов или инициация тромбообразования в крови вызывают за-

медление движения клеток крови по соответствующим сосудам. Такие разнонаправленные эффекты усложняют анализ уровня микрогемодинамики, однако при оценке интегральных эффектов фотосенсибилизированного воздействия на васкулярную систему спекл-оптический метод демонстрирует достаточную чувствительность. Возможность достоверного обнаружения ухудшения МГД в органе-мишени, регистрация гемостаза или, наоборот, восстановления кровотока крайне важны для мониторинга эффективности ФДТ и ее отдаленных последствий, а также для подбора оптимального режима светового воздействия.

Полученные результаты показывают, что на эффективность фотодинамического воздействия влияет величина интервала времени между введением ФС и началом облучения кожных покровов. Изменения МГД более выражены при повторном 30-минутном фотовоздействии спустя 23 часа после введения ФС, чем через 0,5 часа после окончания первой световой процедуры. Это коррелирует с ранее полученным нами и подтвержденным другими авторами данным о том, что максимум накопления Хл еб в органах и тканях наблюдается через 20-24 часа после введения пигмента [16]. Кроме того, индуцируемые при первичном облучении фотохимические реакции могут приводить к частичному повреждению клеток сосудистого эндотелия и стимуляции репаративных процессов в области фотовоздействия. Это, в свою очередь, может способствовать повышенному накоплению в зоне молекул ФС, что, вероятно, является причиной более сильного повреждения сосудов при повторном (через 23 часа) световом воздействии.

Необходимо отметить, что изменения МГД при фотосенсибилизированном Хл еб воздействии более отчетливо выражены в экспериментах, в качестве объекта исследования в которых использовалась кровеносная система уха кролика [17]. Данное обстоятельство может быть связано с влиянием условий измерения: большая прозрачность кожных покровов уха кролика и меньшая кривизна поверхности измерения способствуют увеличению относительного уровня полезного сигнала при использовании имеющегося в спеклометре оптического датчика. Доработка геометрической конфигурации принимающего элемента датчика, возможно, позволит нивелировать влияние данного фактора.

Таким образом, спекл-оптический метод позволяет достоверно регистрировать изменения состояния кожной МГД при фотодинамическом воздействии, и на его основе возможна разработка методики контроля параметров микроциркуляции при ФДТ. Планируемая модификация спекл-оптического модуля, включающая разработку сменных измерительных датчиков с оптимизированной для различных объектов геометрией, позволит повысить чувствительность метода.

**Abstract.** An instrument using the laser speckle phenomenon for non-invasive analysis of skin microcirculation was developed. The reaction of vasculature on sensitized by chlorine e6 photoirradiation was studied.

### Литература

1. J. Folkman, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, *Nat. Med.*, **1**(1), 27-31.
2. G. Donati, A.D. Kapetanios, C.J. Pournaras, Principles of treatment of choroidal neovascularization with photodynamic therapy in age-related macular degeneration, *Semin Ophthalmol.*, **14**,(1999), 210-216.
3. K.B. Trauner, T. Hasan T, Photodynamic treatment of rheumatoid and inflammatory arthritis, *Photochem. Photobiol.*, **64**,(1996), 740-750.
4. J.S. Nelson, L.H. Liaw, A. Orenstein, W.G. Roberts, M.W. Berns, Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, and phthalocyanine, *J Natl Cancer Inst*, **80**, (1988), 1599-1605.
5. D.J.H. Roberts, F. Cairnduff, I. Driver, B. Dixon, S.B. Brown, Tumour vascular shutdown following photodynamic therapy based on polyhaematoporphyrin or 5-aminolaevulinic

acid, *Int. J Oncol.*, **5**, (1994),763–768.

6. Q. Chen, H. Chen, F.W. Hetzel, Tumor oxygenation changes postphotodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, **63**, (1996),128–131.

7. C. Abels, Targeting of vascular system of solid tumors by photodynamic therapy (PDT), *Photochem. Photobiol. Sci.*, **3**, (2004),765-771

8. V.H. Fingar, T.J. Wieman, P.S. Haydon, The effects of thrombocytopenia on vessel stasis and macromolecular leakage after photodynamic therapy using photofrin, *Photochem. Photobiol.*, 1997;66:513–7.

9. Fingar VH, Wieman TJ, Karavolos PS, et al., The effects of photodynamic therapy using differently substituted zinc phthalocyanines on vessel constriction, vessel leakage and tumor response, *Photochem Photobiol* 1993;58:251–8.

10. B. Endrich, K. Asaishi, A. E. Goetz and K. Messmer, A new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters, *Res. Exp. Med.*, **177**, (1980), 125–134.

11. J.E. Hungerford, W.C. Sessa and S.S. Segal Vasomotor control in arterioles of the mouse cremaster muscle *The FASEB Journal*, **14**, (2000), 197-207.

12. Ю.А. Буров, Е.Г. Микульская, А.Н. Москаленко, Оценка изменений микроциркуляции у больных облитерирующим атеросклерозом артерий нижних конечностей после реконструктивных операций, *Материалы IV Всероссийского симпозиума «Применение ЛДФ в медицинской практике»*, М. (2002), 125-128.

13. Б.Ф. Немцов, Е.С. Пенкина, Изменение некоторых показателей микроциркуляции у больных ревматоидным артритом, *Материалы IV Всероссийского симпозиума «Применение ЛДФ в медицинской практике»*, М. (2002), 89-91.

14. T. Asakura, Dynamic properties of bio-speckles and their application to blood flow measurements, *Anritsu News*, **8**, N38, 4-9(1988), 152-157

15. С.К. Дик, И.В. Мархвида, Л.И. Рачковский и др. //А.с. №1620037 (СССР) от 08.09.90 г.

16. Т.Е. Зорина, И.И. Хлудеев, И.Е. Кравченко, Л.Н. Марченко, А.С. Федулов, Распределение и выведение порфириновых сенсibilizаторов из крови. Роль физико-химических характеристик пигмента, *Сб. статей Междунар. науч. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем»*, Минск (2004), **2**, 104-106.

17. И.И. Хлудеев, Л.А. Василевская, Н.И. Нечипуренко и др., Оценка состояния поверхностной микрогемодиализации при фотодинамическом воздействии, *Материалы Междунар. науч.-техн. конф. «Средства медицинской электроники и новые медицинские технологии»*, Мн.: БГУИР, (2004), 271-275.

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет информатики и радиоэлектроники

Поступило 11.09.06

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет

<sup>3</sup>ГУ НПИЦ неврологии и нейрохирургии МЗ РБ