- Moskovitz B., Meyer G., Kravtzov A. et al. Thermo-chemotherapy of intermediate or high-risk recurrence superficial bladder cancer patients // Ann. Oncol. 2005. Vol. 16. P. 585–589.
- Oosterlink W., Witres F., Sylvester R. Diagnostic and prognostic factors in non-muscle-invasive bladder cancer and their influence of treatment and outcomes // Eur. Urol. 2008. Vol. 4. P. 321–324.
- Oosterlink W., Lobel B., Jaksw G et al. European Assotiation of Urology (EAU) Working Group on Oncological Urology. Guidelines on bladder cancer // Eur. Urol. 2002. Vol. 41 (2). P. 105–112.
- 22. *Richie J.P., D'Amico A.V.* Онкоурология. М.: Бином, 2011. 896 с.
- 23. Shen Z., Shen T., Wientjes M.G. et al. Intervesical treatments of bladder cancer: review // Pharm. Res. 2008. Vol. 25 (7).
- 24. Sylvester R.J., van der Meijden A.P., Oosterlink W. et al. Predicting recurrence and progression in individual patients with stage TaT1 bladder cancer using EORTC risk tables: a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trails // Eur. Urol. 2006. Vol. 49. P. 466–475; discussion 475–477.
- Thomas K., O'Brein T. Improving transurethral resection of bladder tumor: the gold standard for diagnosis and treatment of bladder tumor // Eur. Urol. Suppl. 2008. Vol. 7. P. 524–528.

Поступила в редакцию 15.08.2014 г. Для контактов: Горчак Юрий Юрьевич E-mail: oncourolog05@mail.ru

УДК 612.13

Петрищев Н.Н.^{1,2}, Гришачева Т.Г.¹, Михайлова И.А.^{1,2}, Чефу С.Г.^{1,2}, Кувардин Е.С.¹

О возможном влиянии температурных эффектов на светочувствительность микрососудов в присутствии фотосенсибилизаторов

Petrishchev N.N., Gryshachova T.G., Mikhailova I.A., Chefu S.G., Kuvardin E.S.

Possible influence of temperature effects on microvessel photosensitivity in the presence of photosensitizers

¹ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, г. Санкт-Петербург ² Федеральный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова, г. Санкт-Петербург

Цель. Исследование фотореактивности сосудов микроциркуляторного русла при предварительном введении фотосенсибилизатора «Радахлорин». *Mamepuanы и методы*. Облучение микрососудов брыжейки крыс (d = 10–30 мкм) производилось излучением лазера («Гранат» (ООО «Алком медика», Санкт-Петербург), длина волны 662 нм, плотность энергии 0,37 Дж/см²). Фотосенсибилизатор «Радахлорин» (Радафарма, Россия); препарат в дозе 5 мг/кг вводили животным в хвостовую вену за 3 часа до облучения. *Pezyльтаты*. В группе интактных животных после облучения лазером наблюдалось на первых минутах 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. На фоне введенного радахлорина диаметр артериол после облучения уменьшился на 17% (p < 0,05), а диаметр венул значимо не изменился. *Выводы*. Проведенный теоретический анализ показал, что реакции микрососудов на лазерное облучение не связаны с тепловым эффектом в результате поглощения гемоглобина и фотосенсибилизатора, а их можно рассматривать как проявление фотодинамического повреждения. *Ключевые слова: микроциркуляция, фотосенсибилизатор*, *лазерное излучение*.

Purpose. The object of our study was to evaluate microvessels' photoreactivity under the preliminary intravenous injection of photosensitizer (Radachlorin®). *Materials and Methods.* Laser light with wavelength 662 nm, energy density 0.37 J/cm² emitted by laser device Granat (Alcom Medica, St.Petersburg, Russia) was delivered to rats' mesenteric microvessels ($d = 10-30 \mu m$). The rats were injected with the photosensitizer intravenously (5 mg/kg) 3 hours before the irradiation. *Results.* Laser irradiation was resulted in the immediate insignificant arteriole widening which was followed by a substantial increase of arteriole diameters (by 14%), (p < 0.05) in six minutes after the irradiation. After the Radachlorin intravenous injection and laser irradiation the arteriole diameter was reduced by 17% (p < 0.05), while the venule diameter was not considerably changed. *Conclusion.* A theoretical analysis has shown that microvascular reactions to laser irradiation were not the result of heat effects due to hemoglobin and photosensitizer absorption. These effects may be regarded as a result of photodynamic injury to microvessels. *Key words: microcirculation, photosensitizer, laser radiation.*

В механизме фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей большое значение придается нарушению микроциркуляции [7]. Как известно, одним из действующих на злокачественные новообразования факторов при ФДТ является накопление фотосенсибилизаторов в стенке микрососудов и генерация синглетного кислорода при облучении их лазерным излучением [3]. Нарушения кровотока, возникающие в микрососудах опухолевой ткани в процессе облучения, могут вызывать гипоксию и, в частности, снизить эффективность процедуры [10]. Местное применение низкоинтенсивного лазерного излучения (НИЛИ), главным образом красного и инфракрасного диапазонов, широко используют при лечении воспалительных процессов, трофических язв, для стимуляции заживления ран. Одним из вероятных акцепторов лазерного излучения в этой области являются эндогенные порфирины, входящие в состав ряда ферментов, в том числе NO-синтазы. Активация NO-синтазы в эндотелии приводит к увеличению образования монооксида азота (NO) и вазодилятации [2].

Изучение светочувствительности микрососудов в оптическом диапазоне в присутствии фотосенсибилизаторов дает возможность выявить пути оптимизации ФДТ. Целью данного исследования было изучение фотореактивности сосудов микроциркуляторного русла на фоне предварительного введения радахлорина.

Материал и методы исследования

Исследования выполнены на крысах-самцах линии Вистар массой 200–250 г (питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН) в полном соответствии с директивой ЕС (The European Council Directive (86/609/EEC)) 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). Температуру поддерживали в пределах 22–25 °С, относительную влажность – 50–70%. Длительность карантина (акклиматизационного периода) для всех животных составляла 14 дней.

Исследование микроциркуляции проводили по методике, описанной ранее [4]. Общую анестезию у животных осуществляли тиопентал-натрием (60 мг/кг подкожно), через нижнесрединный доступ извлекали петлю тонкой кишки, примыкающую к мезоаппендиксу, для исследования микроциркуляции в артериолах (10–20 мкм) и венулах брыжейки (15–30 мкм). Животное помещали на термостатируемый предметный столик (CHT-1), имеющий наблюдательное окно для проходящего света, выполненное из кварцевого стекла, над которым размещали петлю брыжейки тонкой кишки. Исследуемый участок брыжейки постоянно орошали физиологическим раствором (NaCl, 0,9%), температура раствора – 37,5 °C.

В работе использовали микроскоп МТ-9 (ЛОМО), объектив (ЛК 10 × 0,40). С помощью ССД-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 оптоволокна (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.

Результаты исследования и обсуждение

В группе интактных животных после облучения лазером (662 нм, 12 мВт/см², экспозиция – 30 с) на первых минутах наблюдалось незначительное увеличение диаметра артериол, а через 6 мин зарегистрировано значимое расширение артериол (на 14%) (рис. 1). Чувствительность венул к лазерному облучению была менее выражена, значимых изменений не наблюдалось. После лазерного облучения сосудов брыжейки на фоне предварительного введения «Радахлорина» реакция сосудов существенно отличалась от той, которую наблюдали 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% (р < 0,05), а диаметр венул значимо не изменился. Через 6 мин после облучения наблюдали незначительное восстановление диаметра сосудов.

При облучении микрососудов низкоинтенсивными лазерами оптического диапазона, применяющимися в настоящее время при ФДТ, наряду с фотохимическими воздействиями присутствует и тепловой эффект, оценка которого необходима при рассмотрении механизмов действия оптического излучения на микрососуды. Выделение тепла как следствие поглощения кровью и сосудистой стенкой определяется спектральными характеристиками тканей в области генерации используемого лазера. Единственные компоненты, обладающие существенным коэффициентом поглощения и содержащиеся в значительной концентрации в микрососуде, - это железосодержащие белки - гемоглобин и оксигемоглобин. Именно их порфириновая часть обладает полосами поглощения в видимой и ультрафиолетовой частях спектра, наиболее характерными для спектра крови. Отвод тепла из облученного объема происходит за счет диффузии и конвекционного сноса тепла кровотоком. Характерное время диффузии тепла из облученного объ-



Рис. 1. Реакция артериол и венул на лазерное облучение: а – контроль; б – при введении радахлорина

ема составляет по порядку величины $\tau_{dif} = \frac{D^2}{6\rho}$ [9], где *ρ* – коэффициент термодиффузии, а *D* – диаметр сосуда. В наших условиях $\tau_{dif} = 2 \cdot 10^{-3} c$. Характерное время конвекционного сноса тепла кровотоком может быть оценено как $\tau_{con} = \frac{L}{\nu}$, следовательно, лежит в интервале 10⁻² – 10⁻¹ с (в зависимости от длины сосуда). Таким образом, сравнительная оценка этих процессов показывает, что в нашем случае τ_{dif}/τ_{conv} варьируется в пределах от 0,2 до 2 · 10-2, а значит, тепловые потери вследствие термодиффузии идут значительно быстрее, чем за время конвекционного сноса. Так как время облучения существенно превышает характерное время термодиффузии, то в течение микросекунд установится равновесная температура внутри облучаемого объема микрососуда. Величина ее определяется равенством скоростей поглощения энергии лазерного излучения и диссипации тепловой энергии в окружающую среду.

Оценить повышение температуры внутри облучаемого микрососуда, находящегося в однородной и изотропной (с точки зрения распространения тепла) среде можно, используя стационарное уравнение теплопроводности при учете конвекционных потерь [9]. Решение этого уравнения представляет собой выражение для температуры T(x) в интересующей точке x:

$$T(x) = \frac{1}{4\pi\rho c\gamma} \int d^3x' \frac{n(x')}{x-x'}$$

где с – удельная теплоемкость крови, γ – плотность крови, n(x') – энергия, поглощенная в единице объема в точке x'. Поглощение энергии в нашем случае происходит в сосуде, т. е. в цилиндре длиной L и диаметром D равномерно по всей его длине. Выражение для равновесной температуры T_{∞} (превышение над исходной) с учетом термодиффузии и конвекции можно получить, используя подход, предложенный в [6].

$$T_{\infty} = \frac{16 N_{abs}}{\pi^2 c \gamma D} \cdot \frac{1}{(4\rho L^2 / A(k)D^2) + vL},$$

где $A\left(\frac{D}{L}\right) = A(k)$ – множитель, зависящий от относительных значений D и L, в наших условиях равный 1,5,

тельных значении *D* и *D*, в наших условиях равный 1,5, а N_{abs} – поглощенная мощность лазерного излучения в микрососуде. Поглощенная мощность в микрососуде определяется как $N_{abs} = N$, где N – мощность лазерного излучения, попадающего на микрососуд; $a_{ii}(x)$ – относительный коэффициент поглощения слоя крови толщиной *D*

$$a_{\prime\prime}(D) = 1 - e^{-D \cdot a(\lambda)}$$

Так как спектральная ширина излучения лазера достаточно мала, то коэффициент поглощения $a(\lambda)$ можно считать равным 0 во всем спектральном интервале, кроме $\lambda = 662$ нм. Используя полученное из спектральных характеристик гемоглобина и оксигемоглобина $a(\lambda) =$ 62,35 см⁻¹, получим, что в результате облучения микрососуда ($D = 2 \cdot 10^{-3}$ см, облучаемая длина 0,02 см) полупроводниковым лазером ($\lambda = 662$ нм) превышение температуры внутри сосуда – в пределах 0,01 °C, что можно считать пренебрежимо малым. Как было установлено [11] при лазерном спектр-анализе кровотока в микрососудах брыжейки крысы при повышении температуры, изменения диаметров микрососудов наблюдались при температурах 43–45 °C и достаточно длительном воздействии (60 мин). Вначале наблюдалась дилатация, а затем вазоконстрикция микрососудов, причем эти реакции происходили в течение времени теплового воздействия.

Введение в кровоток хромофоров (в частности, Evans blue) с целью вызвать тепловое повреждение эндотелия посредством облучения сфокусированным лазерным лучом [8] приводит к внутрисосудистому повышению температуры. Конечный результат микроциркуляторных расстройств зависит от концентрации хромофора в кровотоке, плотности мощности в сфокусированном на микрососуд лазерном луче и времени воздействия теплового фактора. Расчеты, проведенные по указанной выше схеме, показали, что при описанных в работе [8] условиях эксперимента (λ = 632 нм, выходная мощность лазера 10 мВт, диаметр луча на объекте 15 мкм, концентрация Evans blue, вводимого в кровоток животного, 80 мг/кг) повышение температуры внутри облученного объема микрососуда не превышает 6-7 °С в отсутствие хромофора (за счет поглощения гемоглобина). При этом для возникновения тромба воздействие лазерным лучом должно было продолжаться 60-120 с, в то время как введение хромофора сокращало это время до 15 с (температура внутри облучаемого объем микрососуда могла достигать 15-16 °C), и процесс тромбообразования значительно ускорялся. Из вышеизложенного можно сделать вывод, что в силу малого времени релаксации за счет термодиффузии и конвекции в сосудах малых диаметров возможные нарушения микроциркуляции вследствии теплового эффекта будут происходить либо в процессе нагревания, либо непосредственно после окончания действия внешнего фактора.

При введении в кровоток радахлорина, использующегося в качестве фотосенсибилизатора при ФДТ и, как известно, накапливающегося в эндотелиальных клетках [1, 5] и последующем облучении лазером при тех же выходных параметрах, что и у интактных крыс, наблюдалась вазоконстрикция микрососудов. Оценку возможного кумулятивного теплового эффекта в микрососуде как результат поглощения лазерного излучения железосодержащими белками и радахлорином производили по вышеуказанным формулам. По измеренным спектрам поглощения радахлорина (рис. 2) был рассчитан коэффициент поглощения в области 662 нм. Полученное значение превышения температуры над исходной в этом случае составляло не более 0,015 °C.

Таким образом, пренебрежимо малое увеличение температуры внутри микрососуда и отсроченность реакции вследствие поглощения излучения лазера гемоглобином и радахлорином дает возможность утверждать, что описанное выше изменение фотореактивности микрососудов при введении радахлорина и последующем облучении лазером свидетельствует об изменении функционального состояния эндотелия и гладкомышечных клеток, а не является следствием теплового эффекта. Это можно рассматривать как проявление фотоповреждения, вызванного активными формами кислорода.



Рис. 2. Спектры водных растворов радахлорина (1 – 0,05 г/л; 2 – 0,1 г/л)

Литература

- 1. Андреева Е.Р., Ударцева О.О., Возовиков И.Н. и др. Влияние фотодинамического воздействия на эндотелиальные клетки в модели *in vitro* // Бюлл. экспер. биол. и мед. 2010. Т. 149. № 2. С. 228–231.
- Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. М.: Дрофа, 2006. 285 с.
- Гейниц А.В., Сорокатый А.Е., Ягудаев Д.М., Трухманов Р.С. Фотодинамическая терапия. История создания метода и ее механизмы // Лазерная медицина. 2007. Т. 11. № 3. С.42–46.

- Гришачева Т.Г., Михайлова И.А., Панченко А.В. Влияние фотодинамического воздействия на адренореактивность сосудов микроциркуляторного русла // Регионар. кровообращ. и микроциркул. 2014. Т. 13. № 3 (51). С. 86–90.
- Зорин В.П., Хлудеев И.И., Кравченко И.Е. Физико-химические параметры распределения порфириновых фотосенсибилизаторов в крови и фотосенсибилизированное повреждение кровеносных сосудов. IV съезд фотобиологов России: Сб. тез. докл. Саратов, 2005. С. 51–53.
- Bebie H., Fankhauser F., Lotmar W., Roulier A. Theoretical estimate of temperature within irradiated retinal vessels // Acta Ophthalmologica. 1974. Vol. 52. P. 13–36.
- Chang C.-J., Sally M.H. Cheng, Nelson J.S. Microvascular effects of Photofrin-indeed photodynamic therapy // Photodiagn. and Photodynam. Therapy. 2007. Vol. 4. P. 95–99.
- Kovacs I.B., Czalay L., Gorog P. Laser-induced Thrombosis in the microcirculation of the hamster cheek pouch and its inhibition by acetylsalicylic acid // Microvasc. Res. 1979. Vol. 6 (2). P. 194–201.
- McKenzie A.L. Physics of thermal processes in laser-tissue interaction // Phys. Med. Biol. 1990. Vol. 35 (9). P. 1175–1209.
- Menezes da Silva F.A., Newman E.L. Dynamic capillaroscopy: a minimally invasive technique for assessing photodynamic effects in vivo // Photochem Photobiol. 1993. Vol. 58 (6). P. 884–889.
- 11. Weng Yang, Dan Zhu, Qian Liu, Qingming Luo. Monitoring thermally induced blood flow changes of rat mesentery by laser speckle imaging. Proc.SPIE 6026,IC020 (Jan. 11, 2006).

Поступила в редакцию 12.01.2015 г. Для контактов: Гришачева Татьяна Георгиевна E-mail: laser82@mail.ru