

РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КРОВИ И ПЛАЗМЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ (ОПУХОЛЕНОСИТЕЛЕЙ) ПОСЛЕ СОНО-ФОТОДИНАМИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРИ 37 °С

С. А. Губарев¹, С. В. Виланская¹, Ю. П. Истомин², В. Н. Чалов², Д. А. Церковский²

¹ *Институт тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова НАН Беларуси, г. Минск, Беларусь, vilan@hmti.ac.by*

² *Республиканский научно-практический центр онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, пос. Лесной, Минский район, Беларусь, istomin06@mail.ru*

Введение. В течение нескольких последних десятилетий онкологические заболевания наряду с сердечно-сосудистыми уверенно лидируют среди причин смертности. Множественность видов рака, ограниченность возможностей современной медицины перед некоторыми из них, отсутствие универсального подхода к лечению, частые случаи метастазирования и рецидивов, сложность диагностирования – вот неполный перечень проблем, с которыми приходится ежедневно сталкиваться тысячам онкологов. Поэтому весьма актуален поиск новых и совершенствование уже существующих методов борьбы с этой острой социальной проблемой.

Альтернативным способом лечения ряда злокачественных новообразований является фотодинамическая терапия (ФДТ). Она выгодно отличается от традиционных способов лечения селективностью воздействия (т. е. разрушаются в основном опухолевые ткани), локальностью и малой инвазивностью (не требуется хирургического вмешательства). Суть ФДТ состоит в избирательном разрушении злокачественных клеток под воздействием лазерного излучения, синглетного кислорода и специального препарата – фотосенсибилизатора (ФС). В настоящее время чаще всего используется излучение с максимумом поглощения в красном и инфракрасном спектрах. Селективность ФДТ определяется избирательностью накопления, более длительной задержкой ФС в опухолевой ткани и быстрым выведением его из окружающих тканей. Предполагается, что некоторые физиологические особенности опухолевой ткани (низкий уровень pH, аномальный характер строения стромы с обширными интерстициальными пространствами, повышенная проницаемость сосудов опухоли, нарушенный отток лимфы и др.) могут способствовать этой избирательности [1].

В Республике Беларусь исследования в области применения ФДТ ведутся совместно коллективами РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н. Н. Александрова, Белорусского государственного университета, Института физики им. Б. И. Степанова и «Института тепло- и массообмена имени А. В. Лыкова» Национальной академии наук Беларуси. РУП «Белмедпрепараты» разработан и серийно выпускается один из лучших в мире ФС «Фотолон».

По мнению академика В. С. Улащика, ФДТ является технологией XXI столетия, а весь потенциал этого метода возможно раскрыть лишь в результате взаимодействия врачей, биофизиков и физиологов [2].

Использование специальных световодов и лазерных аппаратов позволяет расширить область показаний к применению метода ФДТ в лечении поверхностных новообразований. Однако, большинство опухолей, особенно глубокорасположенных, обладают резистентностью к ФДТ по причине незначительной глубины проникновения лазерного излучения в биологические ткани. Использование ультразвука (УЗ) вместо света выгодно отличается большей глубиной проникновения. Это направление получило название

сонодинамической терапии (СДТ). Пионерами исследований, проводимых в данном направлении с конца 1980-х гг., были японские ученые Yumita N., Umemura S. и др. [3, 4].

В основе СДТ лежит тот факт, что при воздействии УЗ на опухолевые ткани в присутствии ФС даже без освещения наблюдается разрушение раковых клеток [5], а сочетанное их применение усиливает цитотоксический эффект [6, 7]. Совместное использование ультразвукового и фотодинамического воздействия на злокачественные новообразования получило название соно-фотодинамической терапии (СФДТ). О перспективности использования СФДТ свидетельствует факт проведения активных исследований в зарубежных центрах [7–11].

На сегодняшний день нет единого мнения о механизмах СДТ и СФДТ. Одной из важных предпосылок, которые позволили бы прояснить механизмы СДТ и СФДТ, является вопрос об их взаимосвязи с реологическими свойствами крови. С этой целью было проведено исследование влияния СДТ, ФДТ и СФДТ на реологические свойства цельной крови и плазмы лабораторных животных (крыс).

Материалы и методы. Экспериментальное исследование было выполнено на 18 белых беспородных крысах. Все животные были разделены по виду воздействия на шесть групп: по три животных в каждой.

В качестве модели опухоли головного мозга использовался штамм глиома С6, который перевивали подкожно в паховую область. Животных брали в эксперимент на 12–14-е сутки, когда опухоль достигала 1.5–3 см в диаметре.

Первая группа животных представляла собой интактный контроль (животным этой группы не осуществлялась трансплантация опухоли, не вводился ФС и не проводились ультразвуковое или фотодинамическое воздействие). Крысам второй группы (глиома С6) производилась трансплантация опухоли без каких-либо воздействий. Третья группа (глиомаС6 + Фотолон) состояла из животных с перевитой опухолью, которым внутривенно вводился ФС Фотолон производства РУП «Белмедпрепараты» в дозе 2.5 мг/кг массы тела животного. Животные-опухоленосители четвертой группы (глиомаС6+Фотолон+ФДТ) подвергались фотодинамическому воздействию после предварительного введения Фотолона. Фотооблучение осуществлялось через 2.5–3 ч полупроводниковым лазером с длиной волны 660 нм (Институт физики НАН Беларуси) со следующими параметрами: экспозиционная плотность энергии излучения 50 Дж/см², плотность мощности излучения 0.28 Вт/см². Животные-опухоленосители пятой группы (глиомаС6+Фотолон+СДТ) подвергались сонодинамическому воздействию после предварительного введения Фотолона. Локальное ультразвуковое воздействие на опухоль осуществлялось через 2.5 ч ультразвуковым аппаратом BTL-5710 Sono (BTL Industries Limited, Великобритания) с частотой излучения 1.0 МГц, интенсивностью 1.0 Вт/см² в течение 5 мин, мощность установки при этом составляла 4.4 Вт при диаметре зонда 2.5 см. Животные-опухоленосители шестой группы (глиомаС6+Фотолон+СФДТ) подвергались комбинированному соно-фотодинамическому воздействию, заключающемуся в воздействии ультразвука с последующим проведением ФДТ после предварительного введения Фотолона.

В образцах крови в качестве антикоагулянта использовался цитрат натрия в дозе 0.5 мкл. Плазму крови получали центрифугированием цельной крови в течение 10 мин при 3000 об/мин. Для коррекции реологических свойств крови определяли показатель гематокрита. Во всех случаях использовалась лабораторная клиническая центрифуга ОПн-3.02 «Дастан».

Аппаратура Реологические измерения проводились на программируемом реометре Brookfield LVDV-III Ultra CP со шпинделем CPE-40, чашка CPE-44Y, подключенном к циркуляционному термостату Brookfield TC-102 с цифровым контроллером при температуре (37±0.5) °С: для крови – в диапазоне скоростей сдвига $\dot{\gamma} = 7.5\text{--}525\text{ с}^{-1}$, для плазмы – при скоростях сдвига 225–525 с⁻¹. Погрешность измерения для шпинделя CPE-40, вращающегося при определенной скорости [12], представлена в таблице 1.

Установка для реологических исследований крови и плазмы показана на рис. 1. Измерительный узел реометра с геометрией конус/плита позволяют определить абсолютную вязкость малой пробы (объем 0.5 мл) исследуемой жидкости при определенной скорости сдвига [12].

Таблица 1

Погрешность измерения вязкости на разных скоростях сдвига

$\Delta\eta$, мПа·с	$\dot{\gamma}$, с ⁻¹	$\Delta\eta$, мПа·с	$\dot{\gamma}$, с ⁻¹	$\Delta\eta$, мПа·с	$\dot{\gamma}$, с ⁻¹
0.044	525	0.204	112.5	0.613	37.5
0.051	450	0.306	75	0.766	30
0.061	375	0.341	67.5	1.022	22.5
0.077	300	0.383	60	1.532	15
0.102	225	0.439	52.5	3.065	7.5
0.15	150	0.511	45		

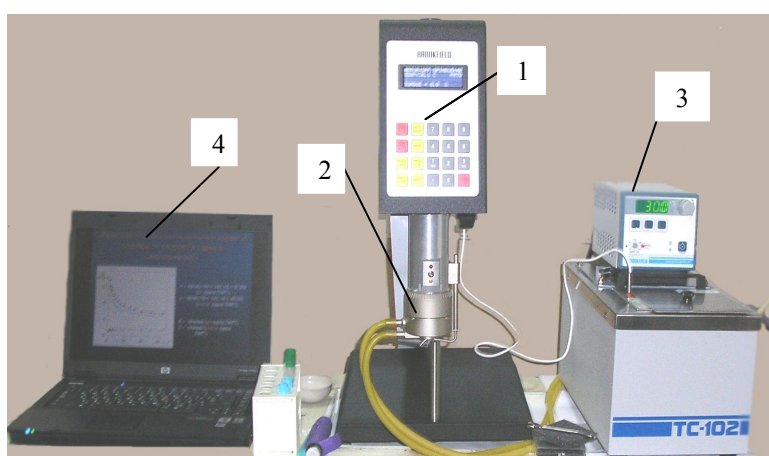


Рис. 1. Комплекс для реологических исследований маловязких жидкостей: 1 – реометр Брукфильда LVDV-III Ultra CP; 2 – измерительная ячейка; 3 – термостат TC-102; 4 – компьютер

Результаты. Перед проведением эксперимента были выполнены тестовые измерения вязкости эталонной жидкости дистиллированной воды (вязкость $\eta = 0.6947$ мПа·с при 37 °С) при температуре 37 °С в диапазоне скоростей сдвига 300–525 с⁻¹: $\eta = 0.69–0.7$ мПа·с.

Согласование результатов, полученных нами, с данными, описанными в [13], вполне удовлетворительное, что позволило после тестовых измерений приступить к экспериментам по определению вязкости крови и плазмы лабораторных животных.

Измеренные зависимости средней по группе вязкости в образцах цельной крови, приведенной к единому показателю гематокрита 40%, и плазмы от скорости сдвига для исследуемых животных представлены на рис. 2.

Обсуждение результатов. Для описания реологических свойств крови использована степенная модель [14] $\tau = K\dot{\gamma}^n$, или кажущаяся вязкость $\eta = \tau / \dot{\gamma} = K(\dot{\gamma})^{n-1}$. Для описания реологических свойств плазмы применялась ньютоновская модель $\tau = \mu\dot{\gamma}$. Для сопоставимости данные по η для крови приводились к единому стандартному показателю гематокрита (Ht=40%) по методике, представленной в [15].

В таблице 2 приведены значения параметров реологических моделей образцов цельной крови и плазмы крыс, полученные нами в результате экспериментов.

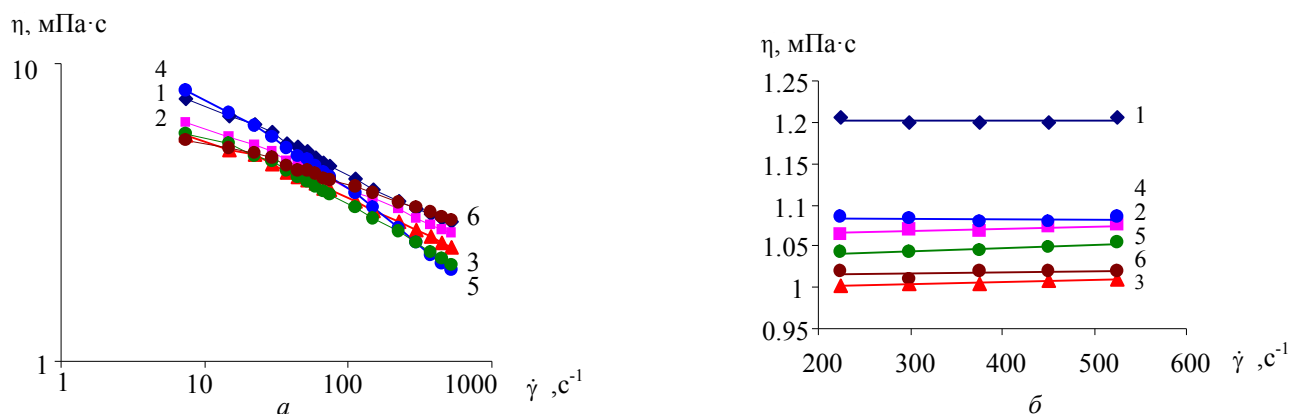


Рис. 2. Зависимость средней по группе вязкости крови (Ht=40%) (а) и вязкости плазмы (б) от скорости сдвига при 37 °С: 1 – интактные; 2 – глиома С6; 3 – глиома С6 + Фотолон; 4 – глиома С6 + Фотолон + ФДТ; 5 – глиома С6 +Фотолон +СДТ; 6 – глиома С6 +Фотолон +СДФТ (точки – эксперимент, кривые – расчет)

Таблица 2

Средние величины параметров реологических моделей образцов крови и плазмы крыс (параметры степенной модели приведены к показателю гематокрита 40%)

Группа	Кровь		Плазма	Ht,%
	$K, \text{мПа} \cdot \text{с}^n$	n	$\mu, \text{мПа} \cdot \text{с}$	
Интактные	12.7 ± 0.6	0.76 ± 0.01	1.2 ± 0.09	47.8 ± 0.8
Глиома С6	10.0 ± 0.9	0.79 ± 0.02	1.07 ± 0.02	48.5 ± 1.1
Глиома С6 + Фотолон	9.3 ± 0.1	0.79 ± 0	1.01 ± 0.04	48.7 ± 1.6
Глиома С6 + Фотолон + ФДТ	17.6 ± 1.8	0.66 ± 0.02	1.08 ± 0.05	56.5 ± 2.4
Глиома С6 + Фотолон + СДТ	10.7 ± 1.7	0.75 ± 0.02	1.05 ± 0.01	53.3 ± 1.9
Глиома С6 + Фотолон + СДФТ	7.95 ± 0.1	0.84 ± 0.01	1.02 ± 0.01	46.2 ± 0.8

Как видно из таблицы 2 и рис. 2, б, наибольшее среднее значение вязкости плазмы наблюдалось у крыс интактной группы. По литературным данным наличие опухоли на ранних стадиях может не оказывать влияние на вязкость плазмы, а в дальнейшем приводит к увеличению вязкости плазмы [16]. Снижение вязкости плазмы у остальных групп крыс, вероятно, связано с введением ФС «Фотолон».

В наших экспериментах наличие опухоли у крыс практически не изменяет характер кривой течения плазмы. Наблюдалось небольшое (в пределах ошибок измерений) увеличение кажущейся вязкости плазмы с увеличением скорости сдвига у животных с глиомой С6, а также у крыс третьей (глиома С6+ФС) и пятой (глиома С6+ФС+СДТ) групп.

Как видно из таблицы 2 и рис. 2, а, наличие перевитой опухоли глиомы С6 слабо влияет на показатель гематокрита (он увеличился на 1.5 %), но уменьшает кажущуюся вязкость и параметр консистентности K (на 21.2%), что частично объясняется снижением вязкости плазмы на 11%. Добавление ФС «Фотолон» в терапевтической дозе уменьшило вязкость плазмы на 5.6% и параметр консистентности на 7.1% без изменения показателя гематокрита. Данное снижение было менее выражено, чем во второй группе.

Проведение ФДТ привело к увеличению Ht на 16.0 %, а также изменению кажущейся вязкости (в области скоростей сдвига до 225 с^{-1} она увеличилась, а в области более 225 с^{-1} – уменьшилась) по сравнению с третьей группой. При этом параметр K увеличился на 89.2%. Вязкость плазмы увеличилась на 7%. Эти данные согласуются с ранее полученными нами

результатами для фотодинамического воздействия [17] и могут объясняться разбуханием эритроцитов и частичным гемолизом.

В пятой группе (СДТ) также наблюдалось увеличение Ht на 9.4 %. Параметр консистентности увеличился на 15%, а вязкость плазмы – на 4 %. При этом кривая течения для пятой группы лежала ниже кривой течения для четвертой в области скоростей сдвига менее 300 c^{-1} , что означает более слабое воздействие СДТ на реологические свойства крови, чем ФДТ.

В шестой группе (СФДТ) наблюдалось повышение вязкости крови на высоких скоростях сдвига и снижение вязкости крови на средних и низких. Параметр консистентности уменьшился на 14.5%, Ht – на 5.1%. Вязкость плазмы изменилась менее чем на 1%. Для выявления причин такого эффекта СФДТ на реологические свойства крови по сравнению с СДТ и ФДТ необходимо проведение более обширных исследований, включающих анализ биохимического состава крови и других свойств.

Заключение. Приведены результаты впервые выполненного экспериментального исследования зависимости от скорости сдвига кажущейся вязкости цельной крови и плазмы лабораторных животных (белых беспородных крыс) с перевитой подкожно глиомой С6 после сонодинамического, фотодинамического и соно-фотодинамического воздействия и интактных крыс при температуре $(37 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$ в диапазоне скоростей сдвига $7.5\text{--}525 \text{ c}^{-1}$ (для крови) и $225\text{--}525 \text{ c}^{-1}$ (для плазмы). В исследованиях использован фотосенсибилизатор «Фотолон» (РУП «Белмедпрепараты»).

Установлено, что кривые течения крови белых беспородных крыс после всех рассмотренных видов воздействий, а также интактных крыс описываются степенной реологической моделью, а плазма крови сохраняет свойства ньютоновской жидкости.

Обнаружено, что в результате сонодинамической терапии показатель гематокрита увеличился на 9.4%, параметр консистентности, приведенный к показателю гематокрита 40%, – на 15%, вязкость плазмы – на 4%; после фотодинамической терапии показатель гематокрита увеличился на 16.0 %, параметр консистентности, приведенный к показателю гематокрита 40%, – на 89.2%, вязкость плазмы – на 7%; после соно-фотодинамической терапии показатель гематокрита снизился на 5.1%, параметр консистентности, приведенный к показателю гематокрита 40%, уменьшился на 14.5%, вязкость плазмы изменилась менее чем на 1%.

Исследования влияния сонодинамического, фотодинамического и соно-фотодинамического воздействия на реологические свойства крови лабораторных животных являются пионерскими. Они показывают значительное (почти двукратное) увеличение кажущейся вязкости крови у животных после ФДТ, небольшое увеличение ее после СДТ и небольшое ее снижение после СФДТ. Также отмечено небольшое увеличение вязкости плазмы после ФДТ и СДТ, а после СФДТ вязкость плазмы практически не изменилась.

Таким образом, выявлено, что соно-, фото- и соно-фотодинамическое воздействия оказывают разнонаправленное влияние на объемную концентрацию красных кровяных клеток и реологические свойства крови и плазмы.

Изменение параметров реологических моделей цельной крови и плазмы и показателя гематокрита в результате ФДТ, СДТ и СФДТ могут происходить вследствие ряда причин, в частности, разбухания эритроцитов, нарушения их агрегируемости и деформируемости и т.д. Необходимы более развернутые исследования с проведением биохимического анализа крови, а также анализом агрегируемости и деформируемости эритроцитов.

Данная работа выполнена в рамках задания 1.1.08 «Разработать в эксперименте на животных методику сонофотодинамической терапии с Фотолоном мозговых опухолей на основе оптимизации ультразвукового и фотодинамического воздействий с учетом массообменного и реофизического факторов» (ГПНИ «Фундаментальная и прикладная медицина и фармация»).

Обозначения

τ – напряжение сдвига, мПа; η – вязкость, мПа·с; K – показатель консистенции, мПа·сⁿ; n – индекс течения; $\dot{\gamma}$ – градиент скорости сдвига, с⁻¹.

Литература

1. Friberg E.G., Cunderlíková V., Pettersen E.O., Moan J. pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer // *Cancer Lett.* 2003. Vol. 195, No. 1. Pp. 73–80.
2. Улащик В. С. Фотодинамическая терапия и ее применение в клинической практике // *Здравоохранение.* 2006. № 6. С. 24–28.
3. Yumita N., Nishigaki R., Umemura K. Hematoporphyrin as a sensitizer of cell-damaging effect of ultrasound // *Jpn. J. Cancer Res.* 1989. Vol. 80. Pp. 219–222.
4. Umemura S. I., Yumita N., Nishigaki R. Enhancement of ultrasonically induced cell-damage by a gallium-porphyrin complex, ATX-70 // *Jpn. J. Cancer Res.* 1993. Vol. 84. Pp. 582–588.
5. Patent 5817048 US.
6. Qi H., Tan S., Ma Y., Song C. Synergistic effects of focus ultrasound with different frequency and hematoporphyrin on human tumor cells // *Science in Ching. Ser. C.* 1998. Vol. 28, No. 5. Pp. 477–480.
7. Kenyon J. N., Fuller R. J. Outcome Measures Following Sonodynamic Photodynamic Therapy – A Case Series // *Current Drug Therapy.* 2011. Vol. 6. Pp. 12–16.
8. Kolarova H. et al. In vitro study of reactive oxygen species production during photodynamic therapy in ultrasound-pretreated cancer cells // *Physiol. Res.* 2007. Vol. 56. Suppl. 1. S27 – S32.
9. Kenyon J.N., Fuller R.J. Activated cancer therapy using light and ultrasound – a case series of sonodynamic and photodynamic therapy in 115 patients over a 4 year period // *Current Drug Therapy.* 2009. Vol. 4. Pp. 179–193.
10. Meng Y. et al. Water-soluble and biocompatible sono/photosensitizer nanoparticles for enhanced cancer therapy // *Nanomedicine.* 2010. Vol. 5, No.10. Pp. 1559–1569.
11. Bakhshizaden M. et al. Effects of combined sonodynamic and photodynamic therapies on a colon carcinoma tumor model // *Iranian J. of Basic Medical Sciences.* 2011. Vol. 14, No. 3. Pp. 205–212.
12. Программируемый вискозиметр Брукфильда. Модель LVDV-III Ultra CP / Инструкция по эксплуатации № M/98-211-B0104.– 97 с.
13. Справочник химика. Т.1. Л, М.: Госхимиздат. 1962. С.985.
14. Смольский Б.М., Шульман З.П., Гориславец В.М. Реодинамика и теплообмен нелинейно-вязкопластичных материалов. Минск: Наука и техника, 1970. – 448 с.
15. Виланская С.В., Мансуров В.А., Митьковская Н.П. Реологические свойства цельной крови ревматологических больных // *ИФЖ.* 2000. Т. 73, № 4. С.792–794.
16. Реологические особенности плазмы человеческой крови при изменениях ее белкового состава: Отчет о НИР (заключит.) /ИТМО НАН Беларуси; рук. В.А. Мансуров, Минск, 2006. – 64 с. № ГР20042397.
17. Маханёк А. А., Жаврид Э. А., Истомин Ю. П., Шульман З. П., Ходина Т. В., Шелег С. В., Виланская С. В., Губарев С. А., Букштынов В. В., Хлюстов С. В., Пленина Л. В. Физико-математическое описание процессов тепло- и массопереноса в коже человека при фотодинамической терапии опухолей. Минск. 2002. – 54 с. (Препринт / Институт тепло- и массообмена им. А. В. Лыкова НАН Беларуси, № 4).