

УДК 577.344.3:591.491

## ВЛИЯНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ПРИ ИХ ВНУТРИБРЮШИННОМ ВВЕДЕНИИ НА СОСТОЯНИЕ ГОМЕОСТАЗА ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

В.И. Русин; В.М. Шейбак, д.м.н., доцент; М.В. Горецкая, к.б.н., доцент;

С.М. Смотрин, д.м.н., профессор

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*В статье приведены результаты исследования по изучению влияния спиртовых растворов фотосенсибилизаторов родамина, кумарина, нильского синего и хлорофиллипта при их введении в свободную брюшную полость на некоторые биохимические показатели крови и неспецифическую резистентность организма белых крыс.*

*Проанализированы изменения в общем и биохимическом анализах крови, некоторых показателях неспецифического иммунитета, рассчитаны индекс лейкоцитарной интоксикации по Н.И. Ябчинскому и лейкоцитоинтоксикационный индекс. Установлено, что фотосенсибилизаторы родамин, кумарин, нильский синий и хлорофиллипт в концентрации спиртового раствора 0,1% не вызывают существенных сдвигов гомеостаза организма опытных животных, что свидетельствует о возможности применения их в перспективе опосредованно в фотодинамической терапии через лазерное излучение при лечении воспаления брюшины и органов брюшной полости в лечебной практике медицинских стационаров.*

**Ключевые слова:** фотосенсибилизаторы родамин, кумарин, нильский синий, хлорофиллипт, токсичность, внутрибрюшинное введение, неспецифическая резистентность.

*The article describes the effect of alcohol solutions of rhodamine, coumarin, Nile blue and chlorophyllipt photosensitizers, introduced into the free abdominal cavity, on biochemical blood indices and nonspecific resistance of white rat organism.*

*The changes in general and biochemical blood tests as well as in certain indices of nonspecific immunity were analyzed, the index of leukocyte intoxication by N.I. Jabchinski and leukocyte intoxication index being calculated. It has been established that 0.1% alcohol solutions of rhodamine, coumarin, Nile blue and chlorophyllipt do not cause any considerable changes in homeostasis in experimental animals which proves the possibility of their prospective application by means of photodynamic laser therapy in the treatment of peritoneal and visceral inflammation in clinical practice in the in-patient settings.*

**Key words:** rhodamine, coumarin, Nile blue, chlorophyllipt photosensitizers, toxicity, intraabdominal introduction, nonspecific resistance.

### Введение

В настоящее время внимание исследователей привлекает использование фотодинамической терапии для лечения различных заболеваний как терапевтического, так и хирургического профиля [1, 2, 3, 10]. Большое количество существующих фотосенсибилизаторов обуславливает интерес исследователей к изучению их влияния на состояние гомеостаза организма, так как клиническое применение фотосенсибилизаторов существенно ограничено. Поиск оптимального сочетания применения различных фотосенсибилизаторов с лазерным излучением определённых длин волн является перспективным направлением повышения эффективности антимикробного эффекта фотодинамической терапии. Фотосенсибилизаторы по своей природе можно разделить на эндогенные и экзогенные. К первой группе относятся эндогенные порфирины крови [4], вторые (синтетические либо выделенные из растительных источников) широко используются в медицинской практике для лечения различных заболеваний [6, 9, 11, 12, 13]. Одним из важнейших свойств фотосенсибилизаторов является полное отсутствие или минимальное проявление ими световой и темновой токсичности при использовании в медицинских целях [6].

**Цель исследования:** изучить влияние растворов фотосенсибилизаторов родамина, кумарина, нильского синего, хлорофиллипта на основные биохимические и иммунологические показатели крови животных при их внутрибрюшинном введении.

### Материал и методы

Исследование проведено на 42 беспородных белых крысах. В качестве основного контроля использовали интактных животных. После проведения срединной ла-

паротомии в брюшную полость вводили 2 мл физиологического раствора (позитивный контроль – 2 группа), 2 мл 0,1% этилового спирта (негативный контроль – 3 группа). Опытным группам после проведения срединной лапаротомии в брюшную полость вводилось 2 мл 0,1% этилового спирта, 2 мл 0,1% спиртового раствора фотосенсибилизатора родамина, 2 мл 0,1% спиртового раствора фотосенсибилизатора кумарина, 2 мл 0,1% спиртового раствора фотосенсибилизатора хлорофиллипта, 2 мл 0,1% спиртового раствора фотосенсибилизатора нильского синего. Лапаротомная рана послойно ушивалась.

Через 48 часов у крыс осуществлялся забор крови. Для проведения биохимического анализа забиралось 0,5 мл сыворотки крови, после чего на автоматическом биохимическом анализаторе Konelab 30i проводилось определение в ней основных биохимических показателей, таких как АЛТ (метод IFCC 37°), АСТ (метод IFCC 37°), мочевины (уреазный метод), креатинина (метод Яффе), общего белка (биуретовый метод), триглицеридов (энзиматический метод), холестерина (энзиматический метод), глюкозы (глюкозооксидазный метод).

Определение содержания в крови лейкоцитов и количественную оценку основных типов клеток (лейкоцитарная формула крови) осуществляли с применением микроскопического исследования. Количество лейкоцитов крови определяли с использованием счетной камеры Горяева по общепринятой методике. Лейкоцитарную формулу подсчитывали в мазках крови, окрашенных по Романовскому.

Производили подсчёт индекса сдвига лейкоцитов по Н.И. Ябчинскому и лейкоцитоинтоксикационного индекса [5, 7].

Индекс сдвига лейкоцитов по Н.И. Ябчинскому подсчитывали по формуле:

$$\text{ИСЛ} = \frac{\text{Э} + \text{П} + \text{С}}{\text{Л} + \text{М}}, \text{ где}$$

ИСЛ - индекс сдвига лейкоцитов по Н.И. Ябчинскому;

Э - эозинофилы (%);

П - палочкоядерные нейтрофилы (%);

С - сегментоядерные нейтрофилы (%);

Л - лимфоциты (%);

М - моноциты (%).

Лейкоцитointоксикационный индекс подсчитывали по формуле:

$$\text{ЛИИ} = \frac{\text{Лейк.} + \text{П} + \text{С}}{\text{Э} + \text{Л} + \text{М}}, \text{ где}$$

ЛИИ - лейкоцитointоксикационный индекс;

Лейк. - лейкоциты ( $10^9/\text{л}$ );

П - палочкоядерные нейтрофилы (%);

С - сегментоядерные нейтрофилы (%);

Э - эозинофилы (%);

Л - лимфоциты (%);

М - моноциты (%).

Для оценки функциональных свойств нейтрофилов крови крыс воспроизводили модель фагоцитоза. Тест-объектом служил штамм *Staphylococcus aureus* 209Р, полученный из коллекции музейных штаммов кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. С.И. Гельберга УО «ТрГМУ». Из 18-24-часовой культуры *Staphylococcus aureus* 209Р готовили взвесь в 0,85% растворе хлорида натрия из расчета  $1,0 \times 10^9$  микроорганизмов в 1 мл. Определяли следующие фагоцитарные показатели: фагоцитарный индекс (ФИ) – количество активно фагоцитирующих нейтрофилов, показатель выражали в процентах; фагоцитарное число – среднее число поглощенных микробных клеток одним фагоцитирующим нейтрофилом, показатель выражали в абсолютных числах.

Уровень циркулирующих иммунных комплексов определяли с помощью иммуноферментного анализатора Sunrise TECAN (Austria) с использованием светофильтра 450 нм. Вычисляли разность показателей сыворотки крови с полиэтиленгликолем (опытная лунка) и сыворотки с буфером (контрольная лунка) и умножали на 100, что и является величиной ЦИК, выраженной в единицах оптической плотности.

Определяли активность комплемента в реакции гемолиза с использованием гемолитической системы. Эта система состоит из эритроцитов барана, обработанных гемолитической сывороткой. Единицей измерения активности комплемента является 50% единица (СН50) – коли-

чество комплемента, вызывающее 50% лизис сенсibilизированных эритроцитов. По степени гемолиза судили о гемолитической активности комплемента.

Статистическая обработка информации проводилась с помощью программы Statistica 7.0. Рассчитывали средние значения показателей (М), ошибку среднего (m), достоверность различий между группами животных (р).

### Полученные результаты и их обсуждение

После внутрибрюшинного введения 0,1% раствора этилового спирта, спиртовых растворов нильского синего и родамина отмечается невыраженный лейкоцитоз. При этом существенных сдвигов в лейкоцитарной формуле не отмечается (таблица 1).

При анализе индекса сдвига лейкоцитов по Н.И. Ябчинскому и лейкоцитointоксикационного индекса достоверных отличий опытных групп от контрольных не выявлено (таблица 2).

Используемые спиртовые растворы фотосенсибилизаторов не влияют на уровень глюкозы и, вероятно, не нарушают функцию эндокринной части поджелудочной железы. Изменения активности ферментов, принимающих участие в реакциях трансаминирования – АЛТ и АСТ, являющихся маркерами поражения ткани печени и некоторых других органов, – носят минимальный характер и находятся в пределах контрольных значений (таблица 3). Некоторое увеличение концентрации мочевины отмечается в группе крыс, которым вводили спиртовые растворы родамина, кумарина и нильского синего. Однако отсутствие поражения тканей почек после внутрибрюшинного введения 0,1% спиртовых растворов фотосенсибилизаторов подтверждают неизменённые концентрации креатинина в анализируемых группах (таблица 3). Несколько повышенный уровень триглицеридов в группе животных, которым вводили 0,1% спиртовой раствор нильского синего, вероятно, можно объяснить влиянием собственно нильского синего на обмен липидов, которое усиливается действием этанола на организм животных [8]. Однако определение концентрации холестерина в сыворотке крови не подтверждает наличие токсического воздействия нильского синего на печень (таблица 3). Отсутствие изменений концентрации общего белка у животных, получавших фотосенсибилизаторы, указывает на сохранение белок-синтетической функции печени и онкотического давления в плазме крови.

При исследовании спиртовых растворов фотосенсибилизаторов *in vivo* отмечали активацию поглотительной способности нейтрофилов крови крыс. Так, в группе после введения спиртового раствора родамина наблюдали достоверное увеличение

фагоцитарного числа относительно интактного контроля (1 группа). При введении других спиртовых растворов фотосенсибилизаторов регистрировали тенденцию к повышению функциональной активности фагоцитов. Следует отметить, что при этом количество фагоцитирующих нейтрофилов оставалось неизменным.

Через 48 часов после внутрибрюшинного введения спиртовых растворов фотосенсибилизаторов наблюдали достоверное повышение

Таблица 1 – Количество лейкоцитов и клеток лейкоцитарной формулы крови лабораторных животных после внутрибрюшинного введения фотосенсибилизаторов

Показатели	Лейкоциты $\times 10^9/\text{л}$	Лимфоциты, %	Палочкоядерные, %	Сегментоядерные, %	Эозинофилы, %	Моноциты, %
Группы животных						
Интактные животные (1 группа), n=6	6,9±0,9	80,9±3,0	-	16±2,9	1,5±0,4	1,7±0,4
Физиологический р-р (2 группа), n=6	5,9±0,4	71,7±5,8	0,7±0,5	26±5,6	1,5±0,6	-
0,1% р-р этанола (3 группа), n=6	8,5±1,0	76,7±2,8	0,3±0,2	16,8±2,0	3,8±1,08	2,3±1,0
0,1% спиртовой р-р родамина (4 группа), n=6	11,9±2,1*	78,3±3,4	0,2±0,2	18±3,2	1,0±0,4	2,5±0,6
0,1% спиртовой р-р кумарина (5 группа), n=6	9,2±1,9	70,8±5,1	0,5±0,3	25,2±4,8	1,0±0,4	2,5±0,6
0,1% спиртовой р-р нильского синего (6 группа), n=6	10,9±1,7	68,8±5,9	-	28,3±6,7	2,0±0,8	0,8±0,4
0,1% спиртовой р-р хлорофиллипта (7 группа), n=6	8,8±1,4	71,7±6,1	0,3±0,2	23,7±4,7	1,5±0,4	2,8±1,7

Примечание: \* Изменения достоверны по отношению к контролю (p<0,05).

**Таблица 2** – Показатели индекса сдвига лейкоцитов по Н.И. Ябчинскому и лейкоцитоинтоксикационного индекса после внутрибрюшинного введения фотосенсибилизаторов

Группа животных	Индекс сдвига лейкоцитов по Н.И. Ябчинскому	Лейкоцитоинтоксикационный индекс
Интактные животные (1 группа), n=6	0,22±0,05	0,28±0,12
Физиологический р-р (2 группа), n=6	0,44±0,32	0,5±0,35
0,1% р-р этанола (3 группа), n=6	0,27±0,08	0,31±0,11
0,1% спиртовой р-р родамина (4 группа), n=6	0,24±0,11	0,38±0,12
0,1% спиртовой р-р кумарина (5 группа), n=6	0,39±0,26	0,5±0,28
0,1% спиртовой р-р нильского синего (6 группа), n=6	0,51±0,42	0,62±0,43
0,1% спиртовой р-р хлорофиллипта (7 группа), n=6	0,37±0,23	0,46±0,26

**Таблица 3** – Некоторые биохимические показатели крови лабораторных животных после внутрибрюшинного введения фотосенсибилизаторов

Показатели Группы животных	АлАТ, Ед/л	АсАТ, Ед/л	Моче- вина, ммоль/л	Креа- тинин, мкмоль/л	Тригли- цериды, ммоль/л	Холесте- рин, ммоль/л	Общий белок, г/л	Глю- коза, ммоль/л
	Интактные живот- ные (1 группа), n=6	72, 3±3,7	194,5±10,5	3,6±0,2	50,7±2,7	0,6±0,1	2,1±0,2	71,7±1,05
Физиологический р-р (2 группа), n=6	114,8±23,1	231,5±18,5	4,0±0,3	43,2±1,4	0,8±0,1	2,7±0,3	72±3,0	8,3±0,5
0,1% р-р этанола (3 группа), n=6	56,3±4,9*	180,0±11,7	5,7±0,9*	45,2±4,5	0,7±0,1	2,9±0,3*	72,9±3,1	7,9±0,3
0,1% спиртовой р-р родамина (4 группа), n=6	82,2±4,8	215,8±18,3	9,0±2,3*	47,7±1,4	0,7±0,1	2,8±0,6	76,2±1,8	7,2±0,7
0,1% спиртовой р-р кумарина (5 группа), n=6	83,8±3,6	199,7±12,9	8,5±1,1*	47,2±4,1	0,6±0,04	2,0±0,3	71,2±2,9	7,8±0,6
0,1% спиртовой р-р нильского синего (6 группа), n=6	80,8±10,3	189,5±9,8	5,4±0,3*	46,6±2,3	0,9±0,1*	2,3±0,2	70,0±2,0	8,3±0,3
0,1% спиртовой р-р хлорофиллипта (7 группа), n=6	74,3±7,0	230,0±29,8	5,8±1,3	54,8±6,1	0,8±0,1	2,6±0,3	70,7±5,1	7,4±0,6

Примечание: \* Изменения достоверны по отношению к контролю (p<0,05).

**Таблица 4** – Некоторые показатели неспецифической резистентности организма лабораторных животных после внутрибрюшинного введения фотосенсибилизаторов

Показатели Группы животных	ЦИК	Комплемент, СН50	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число
	Интактные животные (1 группа), n=6	13,3±3,1	68,9±8,6	72,3±2,5
Физиологический р-р (2 группа), n=6	11,0±2,2	73,1±2,1	80,5±2,4*	8,2±0,2*
0,1% р-р этанола (3 группа), n=6	50,0±5,4*	89,8±2,1	69,5±3,8	9,1±0,6*
0,1% спиртовой р-р родамина (4 группа), n=6	33,3±3,4*	75,2±14,9	66±9,8	8,8±0,4*
0,1% спиртовой р-р кумарина (5 группа), n=6	52,3±4,9*	81,4±6,3	70,3±9,2	8,1±0,8
0,1% спиртовой р-р нильского синего (6 группа), n=6	88±27,6*	85,6±4	71±5,7	8,8±0,7
0,1% спиртовой р-р хлорофиллипта (7 группа), n=6	42±4,4*	91,9±5,9	70,5±6,0	7,7±0,7

Примечание: \* Изменения достоверны по отношению к контролю (p<0,05)

количества ЦИК в сыворотке крови. Одновременно отмечали некоторое увеличение гемолитической активности комплемента, что свидетельствовало о повышении неспецифической резистентности организма животных.

### Выводы

Однократное внутрибрюшинное введение фотосенсибилизаторов родамина, кумарина, нильского синего и хлорофиллипта в 0,1% спиртовом растворе не оказывает негативного влияния на определяемые иммунные и биохимические параметры организма животных и не вызывает воспалительной реакции со стороны внутренних органов.

### Литература

- Ишук, А.В. Фотодинамическая терапия: история развития метода и его практическое применение в лечении гнойных ран и трофических язв нижних конечностей Медицинский журнал. – 2007. – № 4. – Режим доступа: [http://www.bsmu.by/index.php?option=com\\_content&task=view&id=85&Itemid=52](http://www.bsmu.by/index.php?option=com_content&task=view&id=85&Itemid=52). – Дата доступа: 15.11.2010.
- Ишук, А.В. Использование фотодинамической терапии лазерным аппаратом «Родник-1» с фотосенсибилизатором «хлорофиллипт» в лечении гнойных ран и трофических язв нижних конечностей / А.В. Ишук, С.И. Леонович // Новости хирургии. – 2008. – № 1. – с. 44-54.
- Бутов, Ю. С., Ахтямов С. Н., Демина О. М., Каримова Л. Н., Кузьмин С. Г., Лощенов В. Б. Фотодинамическая терапия угревой болезни / Ю.С. Бутов, С.Н. Ахтямов, О.М. Демина, Л.Н. Каримова, С.Г. Кузьмин, В.Б. Лощенов // Российский журнал кожных и венерических болезней. – 2007. – №3. – Режим доступа: <http://www.medlit.ru/medrus/koz/koz07.htm> – Дата доступа: 30.11.2010.
- Клебанов, Г.И. Влияние эндогенных фотосенсибилизаторов на лазер-индуцированный прайминг лейкоцитов крови / Клебанов Г.И. [и др.] // Биол. мембраны – 1998. – Т.15. – №3. – С. 273 – 285.
- Клиническая иммунология и аллергология: Учеб. пособие / А.В. Караулов [и др.]; под ред. А.В. Караулова. – М. / ООО «Мед. информ. агентство», 2002. – 651 с.
- Медицинская микробиология, вирусология и иммунология: Учебник для студентов медицинских институтов / Л.Б. Борисов [и др.]; под ред. Л.Б. Борисова. – М. / ООО «Мед. информ. агентство», 2002. – 736 с.
- Лекции по онкологии: лекция №2 Исторические аспекты развития фотодинамической терапии / / Центр лазерной медицины «Волшебный луч» (Москва) [Электронный ресурс]. – 2006. – Режим доступа: <http://oncologic.narod.ru/Lekcii/fdt/1-fdt-2.html> – Дата доступа: 17.11.2010.
- Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения // Справочник врача [Электронный ресурс]. – Режим доступа: 17.01.2010. <http://www.med2000.ru/article/sd3.htm> Дата доступа: 27.11.2010.
- Соколов, В.В. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей основных локализаций с препаратами фотогем и фотосенс (результаты трехлетних наблюдений) / В.В. Соколов [и др.] // Вопросы онкологии. – 1995. – №41. – С. 134 – 138.
- Странадко, Е.Ф. Фотодинамическая терапия при гнойных заболеваниях мягких тканей / Е.Ф. Странадко, У.М. Корбаев, М.П. Толстых // Хирургия. – 2000. – № 9. – с. 67-70.
- Dougherty, T.J. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II / T.J. Dougherty // Photochem. Photobiol. – 1987. – Vol. 46 (5). – P. 569.
- Dougherty, T.J. Use of hematoporphyrin in photodynamic therapy / T.J. Dougherty // Photochem. Photobiol. – 1993. – V. 58. – P. 895 – 900.
- Orenstein, A. The use of porphyrins for eradication of Staphylococcus aureus in burn wound infections / A. Orenstein [et al.] // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 1997. – V. 19(4). – P. 307-314.

Поступила 16.12.2010