

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЭРИТРОЦИТОВ НА ФОНЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ С ПРИМЕНЕНИЕМ БАКТЕРИОХЛОРИНА У ЖИВОТНЫХ ПРИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ

Арина Вадимовна Марюшина¹

¹Российский биотехнологический университет «РОСБИОТЕХ», г. Москва, Российская Федерация
¹аспирант, maryshinaarina@mail.ru

РЕФЕРАТ

Морфологические изменения эритроцитов являются первостепенными показателями воздействий различного генеза на организм. При проведении фотодинамической терапии (ФДТ) повреждаются и нарушаются микроструктуры патологических тканей, их сосудистого (микроциркуляторного) русла, при этом основные видимые изменения появляются непосредственно на месте облучения, а достоверных данных о трансформации красных клеток крови у животных ранее описано не было. Фотосенсибилизатор (ФС) «Бактериохлорин» представляет собой современное и эффективное соединение для ФДТ благодаря своим оптическим свойствам и активации при длине волны 750 нм. В настоящее время также недостаточно данных о влиянии фотосенсибилизаторов из группы бактериохлоринов на структурно-функциональное состояние поверхности эритроцитов и о других специфических токсических изменениях, происходящих с клетками крови. Данное исследование показало, что фотодинамическая терапия с использованием бактериохлорина оказывает одинаковое влияние на морфологические изменения эритроцитов как у собак, так и у кошек. Выявленные случаи пойкилоцитоза после ФДТ были незначительными и не могут быть однозначно связаны с этим фотосенсибилизатором. Также было зафиксировано умеренное снижение агрегации эритроцитов, что проявлялось в укорочении цепочек «монетных столбиков», вероятно, благодаря активации тканевого дыхания. Наряду с этим было отмечено увеличение численности лимфоцитов и моноцитов, что косвенно свидетельствует о повышении активности клеточного иммунитета. Среди всех животных отмечалось незначительное снижение эритроцитарной массы (4,5%), гемоглобина (8,5%) и гематокрита (4,9%). Аллергических реакций в виде повышения количества эозинофилов у 6-ти животных опытной группы и 1-го контрольного животного не отмечалось, также не выявлено иных побочных действий, связанных с введением ФС. В результате проведенных исследований, были сделаны выводы, что фотодинамическая терапия с использованием фотосенсибилизатора «Бактериохлорин» является безопасной для красных кровяных клеток, при условии соблюдения оптимальных дозировок вводимого вещества, точного соблюдения временных интервалов и мощности лазерного облучения.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, эритроциты, бактериохлорин, злокачественные новообразования.

Для цитирования: Марюшина А.В. Морфологические изменения эритроцитов на фоне фотодинамической терапии с применением Бактериохлорина у животных при злокачественных новообразованиях // Нормативно-правовое регулирование в ветеринарии. 2025. №1. с. 144-148. <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2025.1.144>

MORPHOLOGICAL CHANGES IN ERYTHROCYTES AGAINST THE BACKGROUND OF PHOTODYNAMIC THERAPY USING BACTERIOCHLORIN IN ANIMALS WITH MALIGNANT NEOPLASMS

Arina V. Maryushina¹

¹Russian Biotechnological University "ROSBIOTECH", Moscow, Russian Federation
¹Postgraduate student, maryshinaarina@mail.ru

ABSTRACT

Morphological changes in red blood cells are the primary indicators of the effects of various origins. During photodynamic therapy (PDT), the microstructures of pathological tissues and their vascular (microcirculatory) bed are damaged and disrupted, while the main visible changes appear directly at the site of irradiation, and reliable data on the transformation of red blood cells in animals have not been previously described. The photosensitizer "Bacteriochlorin" is a modern and effective compound for PDT due to its optical properties and activation at a wavelength of 750 nm. Currently, there is also insufficient data on the effect of photosensitizers from the bacteriochlorin group on the structural and functional state of the surface of red blood cells and other specific toxic changes occurring with blood cells. This study showed that photodynamic therapy using bacteriochlorin has the same effect on morphological changes in red blood cells in both dogs and cats. The identified cases of poikilocytosis after PDT were insignificant and cannot be unambiguously associated with this photosensitizer. There was also a moderate decrease in erythrocyte aggregation, which manifested itself in shortening the chains of "coin columns", probably due to the activation of tissue respiration. Along with this, an increase in the number of lymphocytes and monocytes was noted, which indirectly indicates an increase in the activity of cellular immunity. Among all animals, there was a slight decrease in erythrocyte mass (4.5%), he-

moglobin (8.5%) and hematocrit (4.9%). There were no allergic reactions in the form of an increase in the number of eosinophils in 6 animals of the experimental group and the 1st control animal, and no other side effects associated with the administration of PS were detected. As a result of the conducted research, it was concluded that photodynamic therapy using the Bacteriochlorin photosensitizer is safe for red blood cells, provided that optimal dosages of the injected substance are observed, time intervals and laser irradiation power are precisely observed.

Key words: photodynamic therapy, red blood cells, bacteriochlorin, malignant neoplasms.

For citation: Maryushina A.V. Morphological changes in erythrocytes against the background of photodynamic therapy using Bacteriochlorin in animals with malignant neoplasms. Normative-legal regulation in veterinary medicine. 2025;1: 144-148. (in Russ.) <https://doi.org/10.52419/issn2782-6252.2025.1.144>

ВВЕДЕНИЕ

Эритроциты — это безъядерные, имеющие в физиологически нормальном состоянии двояковогнутую форму, единицы клеточного гомеостаза крови, в состав которых входит гемоглобин. Основная функция эритроцитов - перенос кислорода и углекислого газа от легких к тканям организма. Морфология и размер эритроцитов могут отличаться в зависимости от вида животного [2].

Эритроциты, ввиду особенностей микроструктуры, являются легко деформируемыми клетками. Изменения в количестве и целостности эритроцитов указывают на различные патологические процессы, происходящие в организме. К нарушениям морфологии (вариациям формы, размера, и следующими за ними процессам агрегации и агглютинации), приводят, как правило, отклонения биохимического состава крови, попадания в кровотоки ферментов, липидов, химических соединений, изменение температуры, наличие модифицирующих агентов.

Фармакологические препараты могут в значительной мере влиять на гематологические показатели. Так, например, местное введение противогрибковых препаратов (микафунгин и вориконазол) вызывают изменения структуры и фрикционных свойств поверхности эритроцитов у кроликов [5]. Известны некоторые побочные эффекты лечения микафунгином (например, микроангиопатическая гемолитическая анемия, тромбоцитопения, микрососудистый тромбоз и эриптоз) [5]. Ацетилсалициловая кислота *in vitro* в дозе (1,0 мг/мл) может изменить морфологию эритроцитов, что было отмечено качественным анализом и подтверждено морфометрическим измерением соотношения периметра и площади клеток [4]. Пропофол отвечает за нарушение взаимодействия внутри мембран эритроцитов, обуславливает процессы перекисного окисления и приводит к изменению электрического заряда на поверхности мембраны. Такие изменения создают условия к возникновению агрегации эритроцитов, особенно при изменении их формы от дисковидной до сферической [1].

Онкологические заболевания животных также влияют на изменение структуры клеток крови. Паранеопластический синдром (ПНС), проявляющийся как опосредованное действие опухолевых клеток на иммунную, метаболическую и регуляторную системы организма, сопровождается анемией, изменением морфологии эритроцитов (в зависимости от вида новообразования (шистоциты - гемангиосаркома, акантоциты - остеосаркома, лимфома и т.д.), лейкоцитозе, тромбоцитозе или лейкопении и тромбоцитопе-

нии, агрегации, агглютинации и гемолизу эритроцитов. У животных с онкологическими заболеваниями, как правило, резко увеличивается скорость оседания эритроцитов (СОЭ), это является следствием агрегации эритроцитов. Впоследствии происходит образование особых структур из близко расположенных, «слипшихся» клеток, которое носит название «монетные столбики». Они появляются по причине изменении заряда на мембране эритроцитов. Такие нарушения происходят при высвобождении медиаторов воспаления: увеличении концентрации глобулинов, катехоламинов, ацетилхолина, простагландинов, гистамина, серотонина, свободных жирных кислот.

Фотодинамическая терапия всё чаще применяется для лечения неопластических заболеваний у животных. Используемые для её проведения фотосенсибилизаторы являются химическими структурами, как правило, они хорошо растворимы в воде и обладают низкой степенью токсичности. Побочные эффекты ФДТ заключаются в прохождении периода после облучения, пока не завершатся процессы выведения ФС из организма. Это явление носит название «остаточная фототоксичность». Для снижения негативных последствий после ФДТ пациентам рекомендуется избегать воздействия прямого солнечного света и иных видов облучения ультрафиолетом.

Изменение мембран эритроцитов является одним из первичных маркеров неблагоприятного воздействия на организм. Фотосенсибилизатор «Бактериохлорин» представляет собой новейшую и эффективную структуру для проведения ФДТ, за счёт своих оптических свойств и активации при длине волны 750 нм. Последняя имеет важное терапевтическое значение, так как длина волн света напрямую влияет на глубину их проникновения в ткани [3]. Однако данных о влиянии фотосенсибилизаторов группы бактериохлоринов на структурно-функциональное состояние поверхности эритроцитов и иных специфических, токсических изменениях, происходящих с клетками крови, недостаточно.

Цель исследования: провести оценку морфологических изменений эритроцитов на фоне проведения фотодинамической терапии с использованием бактериохлорина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования были отобраны 7 животных (кошки $n=5(n1-n5)$, собаки $n=2(n6-n7)$ в возрасте от 7 до 12 лет; кошки-метисы $n1-3$, мейн-кун $n4$, сфинкс $n5$; собаки-метисы $n6, n7$. Животные проходили лечение в ветеринарной клинике

«ВетТал», г. Москва. Владельцы животных обратились в клинику с жалобой на появление спонтанных новообразований. При клиническом осмотре были выявлены опухоли кожи и слизистых ротовой полости, различного размера и структуры. Для верификации диагноза проводились цитологические и гистологические исследования биоптатов опухоли, полученных при помощи ТИБ и панч-биопсии. Стадию заболевания устанавливали, основываясь на TNM классификации опухолей кожи у домашних животных.

В качестве фотосенсибилизатора использовалась композиция Бактериохлорина (производство Россия (Ивановский государственный химико-технологический университет)), при внутривенном введении в дозе 1 мг/кг массы тела с предварительным разведением в соотношении 1:10 на 0,9 %-ном растворе натрия хлорида.

Для оценки изменения морфологии эритроцитов проводилось двукратное взятие крови: 1) перед введением ФС; 2) через 30 минут после проведения ФДТ. Отбор проб крови проводился по

стандартной методике, натошак, в пробирки для гематологического (с КЗЭДТА) исследования. Для оценки изменения морфологии эритроцитов выполнялась нативная микроскопия препаратов крови (фазово-контрастным методом - ФКМ), а также микроскопия после окрашивания приготовленных мазков, красителями Leucodif (Чехия).

Облучение проводили через 4 часа после введения диодным лазером с длиной волны 760 нм и мощностью 1,5Вт. Методика проведения ФДТ: через периферический внутривенный катетер происходило введение раствора бактериохлорина, после чего животных оставляли на 4 часа в затемненном помещении, для предотвращения спонтанной активации ФС, затем животным проводилась общая анестезия (пропофол 6 мг/кг) и облучение области новообразования. Доза лазерного излучения составляла 500 Дж/см².

Для достоверности результатов на отсутствие морфологических изменений эритроцитов при введении фотосенсибилизатора, было обследовано одно контрольное животное, которому после введения

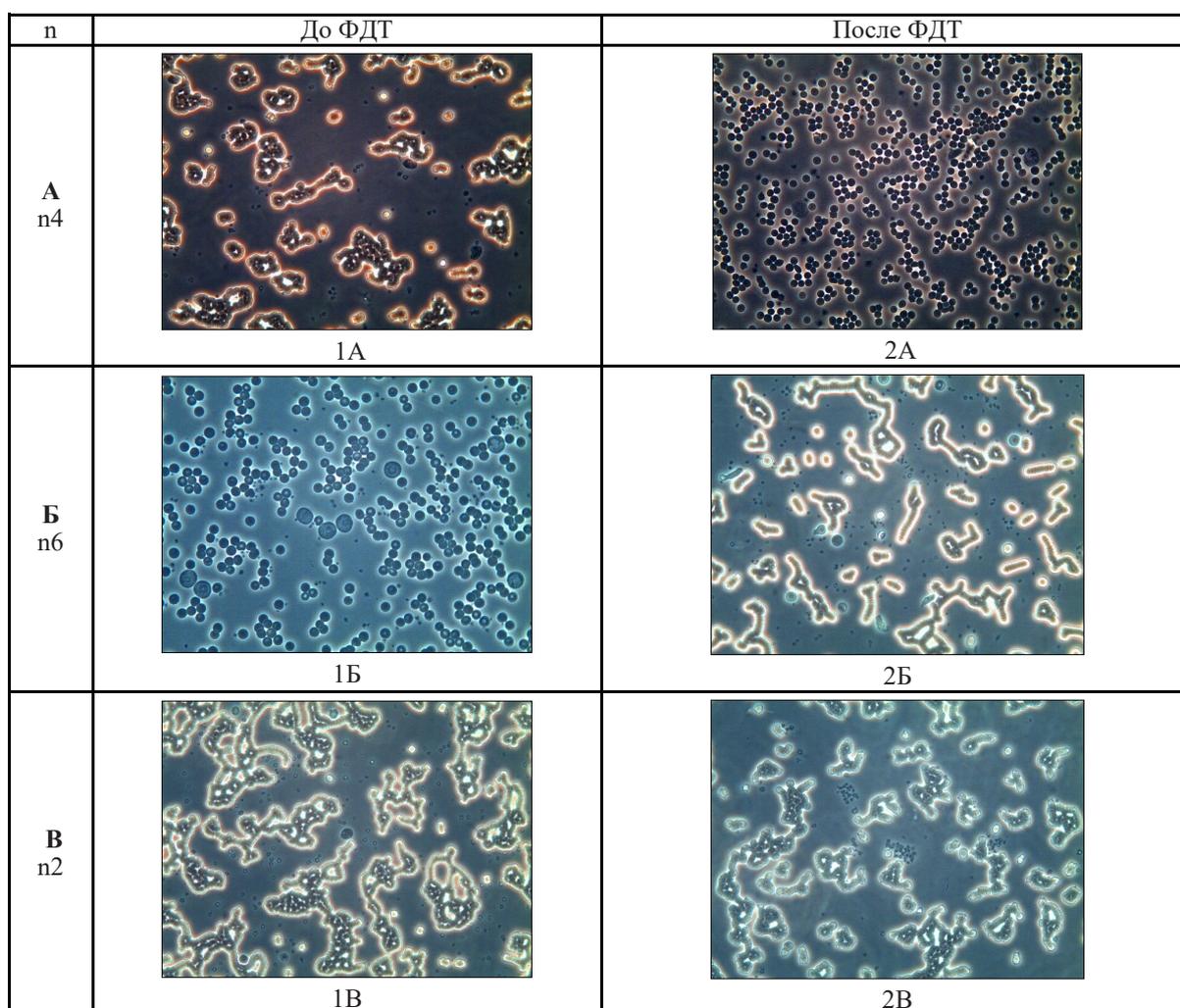


Рисунок 1. Эритроциты в нативных препаратах крови (ФКМ) животных ДО и ПОСЛЕ проведения ФДТ (ув. x400): А – капля крови кота с саркомой мягких тканей; Б – капля крови собаки с плоскоклеточным раком ротовой полости; В – капля крови кошки с опухолью молочной железы.

Figure 1. Erythrocytes in native blood preparations (NBP) of animals BEFORE and AFTER PDT (x400 magnification): А – a drop of blood from a cat with soft tissue sarcoma; В – a drop of blood from a dog with squamous cell carcinoma of the oral cavity; С – a drop of blood from a cat with a mammary gland tumor.



Рисунок 2. Показатели общего клинического анализа крови животных до/после проведения ФДТ
Figure 2. General clinical blood test parameters of animals before/after PDT

Бактериохлорина облучение лазером не проводилось.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам исследований были определены следующие виды новообразований: плоскоклеточный рак ротовой полости (1 кошка, 2 собаки), саркома мягких тканей (2 кошки), опухоль молочной железы (2 кошки). Проведение фотодинамической терапии было рекомендовано в связи с отказом от хирургических вмешательств среди 3 владельцев животных, противопоказаний по результатам анализов у 2 животных, невозможности доступа к опухоли среди 3 животных.

При проведении фотодинамической терапии аллергических реакций, побочного фототоксического эффекта и иных клинических изменений у животных отмечено не было. Микроскопия нативных препаратов (капли крови), проводилась в течение 10 минут после взятия материала. Закономерных изменений в распределении эритроцитарной массы под покровным стеклом не наблюдалось.

У четырех животных ДО проведения ФДТ (кошки n=3, собаки n=1) отмечалось линейное агрегирование эритроцитов (образование «монетных столбиков») и тромбоцитоз (рис.1А,1В). Такое состояние является частым при онкологических процессах за счет увеличения гаммаглобулинов (белков воспалительных реакций), так как при повышении данных белковых фракций появляются признаки гипервязкости крови. У кошек (n=3) были выявлены выраженные изменения в размерах эритроцитов (пойкилоцитоз ++, анизоцитоз ++), наличие эхиноцитов (10,5±5,0%), микроцитов (8,0±2,2%), единичные шистоциты и сфероциты (2,0±1,5%). У двух животных были обнаружены клетки-тени, у собаки с лимфомой эссенциты (3,0%). У 6 животных был выявлен нейтрофильный лейкоцитоз, сдвиг лейкоцитарной формулы вправо.

Параметры крови, характеризующие отсутствие или наличие анемии (эритроциты, гематокрит, гемоглобин) ДО проведения ФДТ у всех кошек находились в пределах физиологической нормы, однако полученные показатели были близки к пограничным минимальным значениям, что характерно для начала проявления паранеопластического синдрома. У собак отмечалось

снижение гематокрита на 3-10% и гемоглобина на 6% от нижней границы нормы.

В окрашенных препаратах также были выявлены морфологические изменения эритроцитов, характеризующиеся явлениями анизоцитоза и пойкилоцитоза. Дополнительно проводилась оценка изменения клеток лейкоцитарного ряда и лимфоцитов. У собаки (n6) незначительный лейкоцитарный сдвиг влево (рис.1Б), у всех животных зафиксировано резкое снижение клеточного иммунитета (Т лимфоцитов): числа лимфоцитов (у собак ≥9%, у кошек ≥53%).

Повторное взятие и исследование крови проводилось в течение 30 минут после завершения сеанса ФДТ. В нативных препаратах у двух животных (кошки n1, n4) отмечалось значительное снижение агрегирования эритроцитов, у собаки n6 было выявлено значительное ухудшение (резкое увеличение «монетных столбиков», >10 клеток в агрегации), среди остальных животных явных изменений в степени распределения обнаружено не было. Снижения тромбоцитарной активности не отмечалось. У трех животных с наибольшим количеством тромбоцитов, обнаруженных ДО проведения ФДТ, отмечалась умеренная агрегация данных клеток.

Фотоокислительные повреждения клеток ПОСЛЕ проведения фотодинамической терапии: у кошек n1, n2, n3 отмечалось увеличение зоны центрального просветления (15,0±5,0%); у всех животных незначительное увеличение эхиноцитов (5,0±1,0%), у одной кошки (n2) увеличивалось количество сфероцитов (10,0±1,0%). Отмечалось незначительное снижение эритроцитарной массы (4,5%), гемоглобина (8,5%) и гематокрита (4,9%).

Такие отклонения допустимы ввиду незначительной кровопотери при проведении фотодинамической терапии и длительного периода голода (более 16 часов) у животных, и не могут быть охарактеризованы как негативное действие от облучения. Увеличение числа пойкилоцитов также не является показателем влияния фотосенсибилизатора бактериохлорина, так как аналогичный эффект возможен за счёт применения анестезиологических препаратов.

У нескольких животных отмечалось снижение сегментоядерных нейтрофилов и повышение моноцитов, лимфоцитов (50,0±20,0%), таким образом можно охарактеризовать угнетение воспалительных процессов и нарастание иммунного ответа. Аллергических реакций в виде повышения количества эозинофилов у 6 животных опытной группы и 1го контрольного животного не отмечалось, у одной кошки (n4) число эозинофилов возросло в 5 раз, однако полученный результат не выходил за пределы референсных значений.

Показатели крови контрольного животного остались без значительных изменений. Основные отклонения отмечались по значениям скорости оседания эритроцитов (с 1,0 до 4,0 мм/сек.), увеличении числа лимфоцитов (в 2 раза).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование показало, что ФДТ с ис-

пользованием бактериохлорина в равной степени влияет на морфологические изменения как среди собак, так и среди кошек. Случаи пойкилоцитоза, выявленные после проведения терапии, незначительны и не могут являться строго специфичными для данного фотосенсибилизатора. Было отмечено умеренное снижение агрегации эритроцитов (укорочение цепей «монетных столбиков»), вероятно за счёт активации тканевого дыхания. Вместе с тем отмечался рост лимфоцитов и моноцитов, что говорит об усилении работы клеточного иммунитета. Таким образом, можно утверждать, что фотодинамическая терапия с использованием фотосенсибилизатора «Бактериохлорин» является безопасной для красных клеток крови при соблюдении оптимальных доз, вводимого ФС, и сохранении точных временных интервалов и мощности воздействия лазерным облучением.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Матвеева М.В. и др. Оценка морфологии эритроцитов после введения пропосола / М.В. Матвеева, Б.В. Уша, Г.М. Крюковская, Б.В. Виолин // Ветеринария кубани. 2013. №5. С. 1-3.
2. Мороз В.В. и др. Строение и функция эритроцита в норме и при критических состояниях / В. В. Мороз, А. М. Голубев, А. В. Афанасьев, А. Н. Кузовлев, В. А. Сергунова, О. Е. Гудкова, А. М. Черныш // Общая реаниматология. 2012. №8. С. 51-53.
3. Слесаревская М.Н. и др. Фотодинамическая терапия: основные принципы и механизмы действия / М. Н. Слесаревская, А. В. Соколов // Урологические ведомости. 2012. №3. с. 24-28.
4. Grinapel Frydman J.N. et al. Acetylsalicylic acid and morphology of red blood cells / J.N. Grinapel Frydman, A.S. Fonseca, V.C. Rocha, M.O. Benarroz // Human and Animal Health. Braz. arch. biol. Technol. 2010. V.53 (3).
5. Starodubtseva M.N. et al. The Effects of Intravitreal Administration of Antifungal Drugs on the Structure and Mechanical Properties Peripheral Blood Erythrocyte Surface in Rabbits / M.N. Starodubtseva, S. Karachrysafti, N.M. Shklyarava, I.A. Chelnokova, D. Kavvadas, K. Papadopoulou, P. Samara, V. Papaliagkas, A. Sioga, A. Komnenou, V. Karampatakis, T. Papamitsou // Int J Mol Sci. 2022. V.23(18).

REFERENCES

1. Matveeva M.V., Usha B.V., Kryukovskaya G.M., Violin B.V. Evaluation of erythrocyte morphology after propofol administration. Veterinary science of Kuban. 2013;5: 1-3.
2. Moroz V.V., Golubev A.M., Afanasyev A.V., Kuzovlev A.N., Sergunova V.A., Gudkova O.E., Chernysh A.M. Structure and function of erythrocyte in norm and in critical conditions. General reanimatology. 2012;8: 51-53.
3. Slesarevskaya M.N., Sokolov A.V. Photodynamic therapy: basic principles and mechanisms of action. Urological news. 2012;3: 24-28.
4. Grinapel Frydman J. N., Fonseca A.S., Rocha V.C., Benarroz M.O. Acetylsalicylic acid and morphology of red blood cells. Human and Animal Health. Braz. arch. biol. Technol. 2010. V. 53 (3).
5. Starodubtseva M.N., Karachrysafti S., Shklyarava N.M., Chelnokova I.A., Kavvadas D., Papadopoulou K., Samara P., Papaliagkas V., Sioga A., Komnenou A., Karampatakis V., Papamitsou T. The Effects of Intravitreal Administration of Antifungal Drugs on the Structure and Mechanical Properties of Peripheral Blood Erythrocyte Surface in Rabbits. Int J Mol Sci. 2022. V.23(18)

Поступила в редакцию / Received: 12.03.2025

Поступила после рецензирования / Revised: 30.03.2025

Принята к публикации / Accepted: 01.04.2025