

УДК 616.5-001.27:615.8

Н. В. Красносельский, Л. И. Симонова✉, В. З. Гертман, Е. С. Пушкар

ГУ «Институт медицинской радиологии им. С.П. Григорьева Национальной Академии медицинских наук Украины», г. Харьков, ул. Пушкинская, 82, 61024, Украина

ВЛИЯНИЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ НА ЗАЖИВЛЕНИЕ ЛУЧЕВОЙ ЯЗВЫ КОЖИ, ИНФИЦИРОВАННОЙ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Цель: выявить влияние фотодинамической терапии на заживление экспериментальной лучевой язвы кожи, инфицированной *Pseudomonas aeruginosa*.

Материалы и методы. Инфицированную лучевую язву моделировали путем локального рентгеновского облучения кожи бедра крысы в дозе 85,0 Гр с последующим нанесением на поверхность язвы бактериальной взвеси *Pseudomonas aeruginosa*. Фотодинамическую терапию (ФДТ) проводили с помощью фотонного аппарата «Барва-LED/630» и фотосенсибилизатора метиленового синего. Влияние ФДТ на скорость и качество заживления инфицированной лучевой язвы определяли путем сравнения показателей гистологического и морфометрического исследования кожи из области лучевой язвы животных из контрольных и леченной ФДТ групп.

Результаты и выводы. Наличие *Pseudomonas aeruginosa* в лучевой язве приводило к увеличению площади раневой полости по сравнению с неинфицированной лучевой язвой и к существенному торможению процессов ее заживления. Присоединение фактора инфицирования снижало активность репаративных процессов в лучевой язве на 20 % по сравнению с неинфицированной. Воздействие фотодинамической терапии способствовало полному заживлению в среднем на один месяц раньше, чем у животных контрольных групп.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, фотосенсибилизатор, фотодиоды, инфицированные лучевые язвы.
Проблемы радіаційної медицини та радіобіології. 2017. Вип. 22. С. 202–207.

N. V. Krasnoselskiy, L. I. Simonova✉, V. Z. Gertman, E. S. Pushkar

SI «Grygoriev Institute for Medical Radiology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Pushkinska street, 82, 61024, Ukraine

Photodynamic therapy effect on healing of radiation skin ulcer infected with *Pseudomonas aeruginosa*

Objective. To reveal the effect of photodynamic therapy on the healing of experimental radiation skin ulcers infected with *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and methods. The infected radionuclide was modeled by local X-ray irradiation of the rat's hip skin at a dose of 85.0 Gy, followed by the application of *Pseudomonas aeruginosa* bacterial suspension to the surface of the ulcer. Photodynamic therapy (CTD) was performed with the help of a photon apparatus «Barva-LED/630» and a photosensitizer of methylene blue. The effect of PDT on the rate and quality of healing of an infected radionuclide was determined by comparing the histological and morphometric study of skin from the region of ulcer in animals from the control and treated groups of PDT.

Results and conclusions. The presence of *Pseudomonas aeruginosa* in the radiation sickness caused an increase in the area of the wound cavity compared with the non-infected radionuclide and to a significant inhibition of its healing processes. The addition of the infection factor reduced the activity of the reparative processes in the radiation sickness by 20 % compared with the uninfected. The effect of photodynamic therapy contributed to complete healing on average one month earlier than in control groups.

Key words: photodynamic therapy, photosensitizer, photodiodes, infected radial ulcers.

Problems of radiation medicine and radiobiology. 2017;22:202–207.

✉ Симонова Лариса Ивановна, e-mail: patphysiologia_imr@ukr.net

ВВЕДЕНИЕ

Проблема лечения лучевых повреждений тканей, которые являются следствием терапии злокачественных новообразований, сохраняет свою актуальность. В Европе из 10 млн человек с онкологическими заболеваниями лучевую терапию получают 60–70 % больных [1]. При проведении лучевой терапии злокачественных новообразований наибольшему воздействию подвергаются кожа и подлежащие ткани. Лучевые язвы кожи являются частыми осложнениями лучевой терапии, лечение которых продолжительно и невероятно затруднено. У больных со злокачественными новообразованиями отмечено частое инфицирование лучевых язв кожи, что еще больше усугубляет процессы заживления поврежденных тканей [2].

Известно, что при лечении инфицированных повреждений первоочередным лечебным мероприятием является антибактериальная терапия. Традиционно для этого используют антибиотики, однако, в настоящее время все больше патогенных микроорганизмов становятся антибиотикорезистентными. Поэтому внимание медиков привлекают альтернативные антибактериальные методы, среди которых наиболее перспективным является фотодинамическая терапия (ФДТ). ФДТ представляет собой метод активации специального вещества (фотосенсибилизатора) световым излучением с последующим развитием фотохимических реакций в клетке, приводящих к ее гибели [3, 4]. В настоящее время ФДТ широко используется для лечения ран и длительно незаживающих трофических язв диабетической стопы [5, 6]. При этом, несмотря на довольно широкое применение ФДТ в качестве антибактериального метода при лечении инфицированных ран и язв, мы не встретили в доступной нам литературе упоминаний об использовании этого метода при лечении инфицированных лучевых повреждений кожи и мягких тканей.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выявить влияние ФДТ на заживление экспериментальной лучевой язвы кожи, инфицированной *Pseudomonas aeruginosa*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проведен на крысах линии WAG, в ходе которого было сформировано 3 группы: I контрольная группа (n = 15) – животным моделировали лучевую язву кожи в области бедра. Доза локального облучения 85,0 Гр. II контрольная группа (n = 15) – животным моделировали лучевую язву кожи с последующим (на 7-е пострадиационные сутки) нанесением на ее поверхность 0,2 мл взвеси

INTRODUCTION

The problem of treatment of tissue radiation lesions caused by the therapy for malignant neoplasms is still topical. In Europe the share of those patients, who are given radiation therapy, reaches 60–70 % among 10 million patients with oncological diseases [1]. Skin and underlying soft tissue are subjected the most influence while radiation therapy for malignant neoplasms. Radiation ulcers of skin are frequent complications of radiation therapy, their treatment is continuous and incredibly aggravated. Frequent infection of radiation skin ulcers is registered in the patients with malignant neoplasms, that exacerbates the healing processes of the injured tissues [2].

It is known that antibacterial therapy is the primary urgent medical measure at the treatment of the infected injuries. Traditionally, antibiotics are used for it, but currently, increasingly more pathogenic microorganisms are becoming antibiotic resistant. Therefore, alternative antibacterial methods, among which photodynamic therapy (PDT) is the most perspective, draw attention of the physicians. PDT is a method activating special substance (photosensitizer) by light emission followed by the development of photochemical reactions in the cell, causing its death [3, 4]. Currently, PDT is used widely for the treatment of wounds and long-term non-healing trophic ulcers in diabetic foot [5, 6]. At the same time, despite the wide usage of PDT as antibacterial method for the treatment of infected wounds and sores, in the available literature we found no mentions about the usage of this method for the treatment of infected radiation lesions of skin and soft tissues.

OBJECTIVE

To reveal PDT effect on the healing of the experimental radiation ulcer of skin infected with *Pseudomonas aeruginosa*.

MATERIAL AND METHODS

WAG rats were used for the experiment, in the course of which 3 groups of the animals were formed. The control group I (n = 15) included the animals with simulated radiation skin ulcer in the thigh region; the local exposure dosage was of 85.0 Gy. In the control group II (n = 15) the animals were simulated radiation ulcer of skin followed with subsequent inoculation (post-radiation day 7) of 0.2 mL

Pseudomonas aeruginosa (0,5 млн микробных клеток/см²). III опытная группа (n = 20) — животные с инфицированной *Pseudomonas aeruginosa* лучевой язвой и последующим воздействием ФДТ на ее поверхность.

Лучевое повреждение кожи крыс наносили в области верхней поверхности бедра при помощи рентген-терапевтического аппарата TUR-60. Условия облучения: напряжение 50 кВ, анодный ток 10 мА, фильтр 0,6 мм Al, мощность дозы 33,5 Гр/мин.

Инфицирование лучевых повреждений проводили на 7-й день после локального облучения при появлении первых признаков развития лучевой язвы. Для инфицирования использовали музейные референтные штаммы *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Воздействие ФДТ проводили с помощью фотонного аппарата «Барва-LED/630» с использованием фотосенсибилизатора (0,1 % раствора метиленового синего). Энергетическая экспозиция за сеанс составляла 45 Дж/см².

Животных выводили из эксперимента на 14, 21, 30, 37, 52-е сутки после облучения. Проводили гистологическое и морфометрическое исследование кожи с подлежащими мягкими тканями из области лучевой язвы. Микропрепараты, окрашенные гематоксилином и эозином, изучали на микроскопе «Olympus BX-41» с последующей обработкой программой «Olympus DP-soft version 3.1», с помощью которой проводили измерение площади вертикального сечения лучевой язвы в мм², с последующей конвертацией показателей в проценты. Средние значения показателей сравнивали при помощи U-критерия Манна-Уитни.

Условия содержания и обращения с животными отвечали требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях» [7, 8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В I группе животных к 14-м суткам после облучения участка кожи бедра крысы определялся большой раневой дефект — лучевая язва, которая доходила до глубоких отделов дермы, а местами и гиподермы (рис. 1).

Микроскопически язва имела следующее строение: поверхностный слой — лейкоцитарно-некротический представлен некротически измененными фрагментами эпидермиса и дермы с наличием большого количества погибших лейкоцитов. За лейкоцитарно-некротическим слоем определяется демарка-

Pseudomonas aeruginosa suspension (0.5 million of microbial cells/cm²) on its surface. Experimental group III (n = 20) included the animals with radiation ulcer infected with *Pseudomonas aeruginosa* and followed by PDT exposure at its surface.

Radiation lesion of the skin of rats was performed in the upper hip surface area with the aid of radiotherapy unit TUR-60. Irradiation conditions: voltage 50 kV, anode current 10 mA, filter 6 mm Al, dose rate 33.5 Gy/min.

The radiation lesions were infected at the day 7 after local irradiation, at the onset of the first signs of the radiation ulcer development. Museum reference strains *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used for infection.

PDT was performed with the aid of the «Barva-LED/630» photon unit with the usage of methylene blue photosensitizer 0.1 % solution. One treatment included 45 joule/cm² energy exposure.

The animals were removed from the experiment at the days 14, 21, 30, 37, 52 after irradiation. Histological and morphometric examinations of the skin and underlying soft tissues from the radiation ulcer region were performed. Hematoxylin and eosin stained micro-preparations were studied with the «Olympus BX-41» microscope using the further processing by «Olympus DP-soft version 3.1» software, with the aid of which radiation ulcer vertical section area was calculated in mm², and then these values were converted to the per cent shares. Mean values of the parameters were compared with the aid of the Mann-Whitney U test.

The conditions and treatment of the animals corresponded with the requirements of «European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes» [7, 8].

RESULTS AND DISCUSSION

In the animal group I by the day 14 after irradiation of the rat thigh skin area, a big wound defect was determined — radiation ulcer, which reached deep dermal, and in places, even hypodermal parts (Fig. 1).

Microscopically the ulcer was of the following structure — superficial layer — leukocytic and necrotic, which was presented with necrotized changed fragments of epidermis and derma with numerous dead leukocytes. After the leukocytic necrotic layer, a demarcation leukocytic wall was

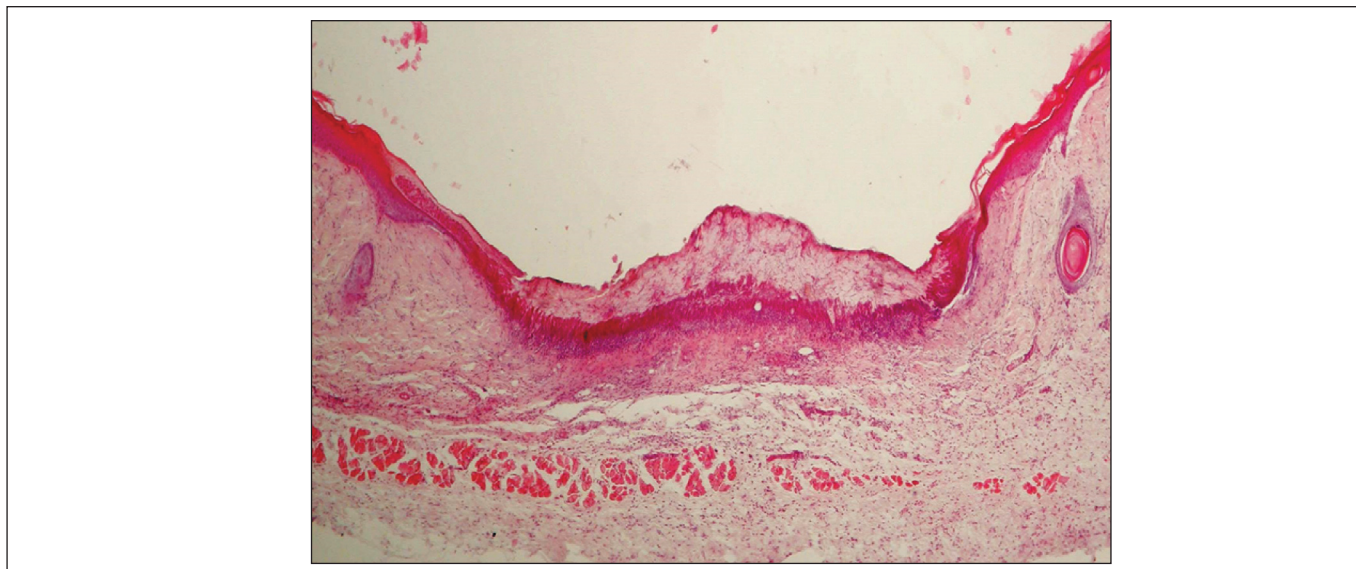


Рисунок 1. Язва, доходящая до глубоких отделов дермы. Лейкоцитарно-некротический слой с прилежащим демаркационным лейкоцитарным валом. Окраска гематоксилин-эозином, $\times 200$.

Figure 1. Ulcer reaching deep dermal layers. Leukocytic necrotic layer with adjacent demarcation leukocytic wall. Hematoxylin and eosin staining, $\times 200$.

ционный лейкоцитарный вал, отделяющий некротизированные ткани от здоровых.

Площадь вертикального сечения раневой полости в этот срок (14-е сутки) была максимальной: $(1405,67 \pm 87,42) \text{ mm}^2 - 100 \%$. По мере спонтанного восстановления общего и местного гомеостаза до 21-х пострадиационных суток отмечалась тенденция к уменьшению на 8 % раневого дефекта неинфицированной лучевой язвы (рис. 2).

В отдаленные сроки, вплоть до конца наблюдения (52-е сутки) отмечалось более активное заживление лучевой язвы с постепенным сокращением площади вертикального сечения до 73 % на 30-е сутки и 51 % к 52-м суткам по сравнению с исходной величиной.

seen, which divided necrotized and healthy tissues.

Vertical section area of the wound cavity within this time (day 14) was maximal: $(1405.67 \pm 87.42) \text{ mm}^2 - 100 \%$. As far as spontaneous recovery of general and local homeostasis was occurring, till the post-radiation day 21, it was registered a tendency to an 8 % reduction of the wound defect of the non-infected radiation ulcer (Fig. 2).

In long-term observation, up to the endpoint of it (day 52), the more active healing of the radiation ulcer was seen with gradually reduced vertical section area up to 73% at the day 30 and 51 % by the day 52 compared to the base value.

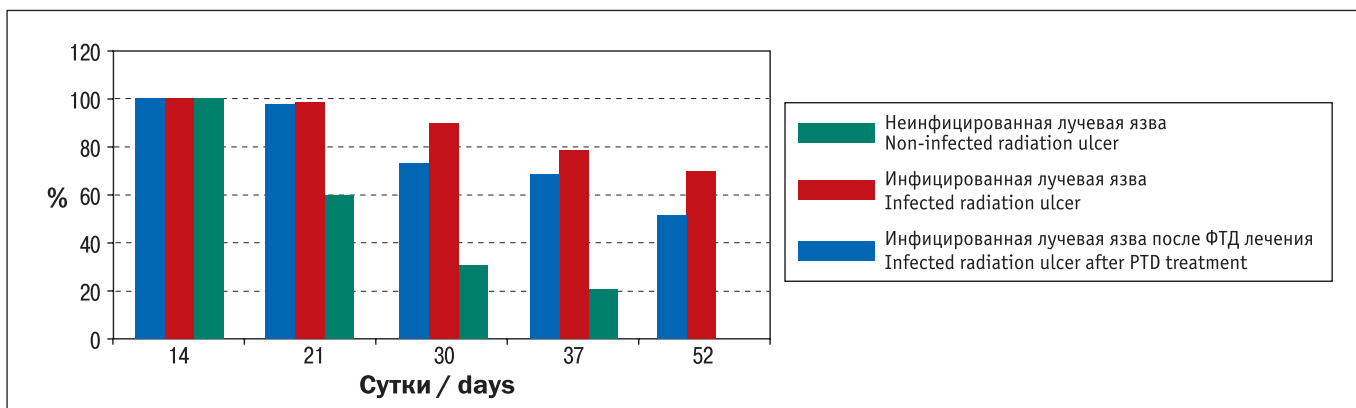


Рисунок 2. Средние значения площади вертикального сечения раневой поверхности в исследуемых группах в динамике (%).

Figure 2. Mean values of the vertical section area of the wound surface in the examined groups in dynamics (%).

Во II группе животных после инфицирования лучевой язвы *Pseudomonas aeruginosa* площадь раневого дефекта, в отличие от неинфицированной язвы, не изменялась в первые 3 пострадиационные недели — с 14-х по 21-е сутки — 100–99 %. В последующие 21–52-е сутки площадь вертикального сечения в среднем уменьшалась на 10 % относительно предыдущего срока, что достоверно отличалось от показателей неинфицированных язв почти в 1,5–2,0 раза. К концу наблюдения (52-е сутки) площадь вертикального сечения в инфицированных лучевых язвах уменьшалась на 30 % относительно исходной величины, в то время как площадь вертикального сечения неинфицированных язв на 52-е сутки снижалась на 50 %.

В III группе подопытных животных после воздействия ФДТ на инфицированную лучевую язву наблюдалось активное уменьшение ее площади вертикального сечения. В отличие от первых двух контрольных групп, когда площадь лучевой язвы в начальные сроки не изменялась, оставаясь на исходном уровне (100 %), в леченной ФДТ группе на каждый последующий срок она уменьшалась в среднем на 30 % (Рис. 2). Это проявлялось более быстрым купированием гнойного процесса, предупреждением его распространения в более глубокие отделы дермы и более ранним очищением от гнойно-некротического детрита.

К концу наблюдения (52-е сутки) площадь вертикального сечения в инфицированных лучевых язвах уменьшалась на 30 % относительно исходной величины, в неинфицированных лучевых язвах на 50 %, а

In the animal group II after radiation ulcer infection with *Pseudomonas aeruginosa* the area of the wound defect, in contrast to non-infected ulcer, was not changed in the first 3 post-radiation weeks — from the day 14 to the day 21 — 100–99 % . In the following days 21–52, the area of the vertical section was in average 10 % reduced related to the previous period that demonstrated almost 1.5–2.0-fold reliable difference from the values of non-infected wounds. By the end of the observation (day 52) the area of the vertical section in the infected radiation ulcers was 30% reduced related to the base value, whereas the area of vertical section of non-infected ulcers was 50% reduced at the day 52.

In the animal group III, after PDT treatment of the infected radiation ulcer, we observed active reduction of its vertical section area. In contrast to the first two control groups, when the area of the radiation ulcer was not changed at primary period, remaining at the base level (100 %), in the PDT treated group each next time interval it was in average 30 % decreased. It was manifested by quicker reduction of septic process, prevention of its spread in deeper part of derma, and earlier debridement of septic necrotic detritus.

By the end of the observation (day 52-nd) the vertical section area in the infected radiation ulcers was 30 % shrunk relative to the base value, non-infected radiation ulcers showed 50 % reduction, and in the

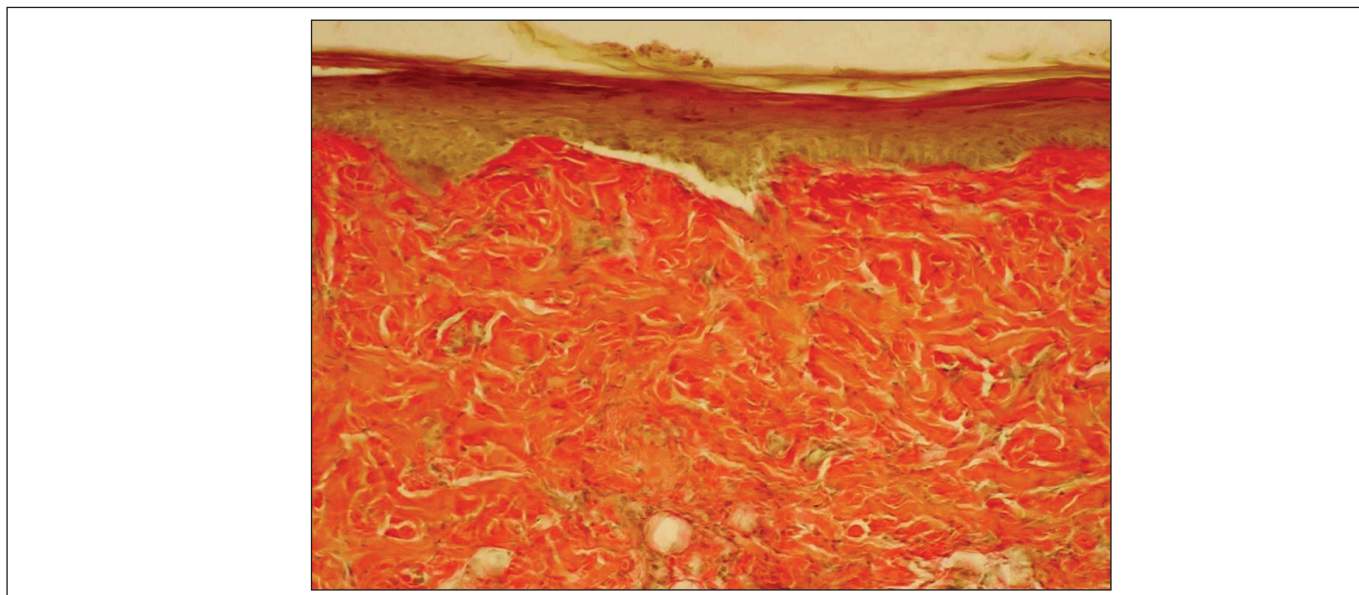


Рисунок 3. 52-е сутки. Раневая полость заполнена соединительнотканними волокнами. Окраска пикрофуксином по ван Гизону, $\times 200$.

Figure 3. Day 52nd. The wound cavity is filled with connective tissue fibers. Picrofuchsin staining by Van-Gizon technique, $\times 200$.

в леченных ФДТ группах язвенная полость вообще отсутствовала ввиду полного заживления лучевой язвы. На месте язвенного дефекта определялась соединительная ткань, поверхность которой была покрыта эпидермисом с четким разделением на слои (рис. 3).

В целом, уменьшение площади вертикального сечения лучевой язвы у животных контрольных групп по мере пострadiационного восстановления функции организма свидетельствовало о сохранении развития репаративных процессов в лучевой язве.

ВЫВОДЫ

1. Наличие *Pseudomonas aeruginosa* в лучевой язве приводит к увеличению площади раневой полости по сравнению с неинфицированной лучевой язвой и к существенному торможению процессов ее заживления.
2. Присоединение фактора инфицирования снижало активность репаративных процессов в лучевой язве на 20 % по сравнению с неинфицированной.
3. Воздействие фотодинамической терапии способствовало полному заживлению в среднем на один месяц раньше, чем в контрольных группах.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овчинников В. А., Угляница К. Н., Волков В. Н. Современные методы лучевого лечения онкологических больных. Журнал ГрГМУ. 2010. № 1. С. 93-97.
2. Дмитриева Н. В., Петухова И. Н., Смолянская А. З. Инфекционные осложнения в онкологической клинике. Практическая онкология. 2001. № 1 (5). С. 18-20.
3. Узденский А. Б. Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. М.: Наука, 2010. 321 с.
4. Jori G., Fabris C., Soncin M., Ferro S., Coppelotti O., Dei D., Fantetti L., Chiti G., Roncucci G. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. Lasers Surg. Med. 2006. Vol. 38. P. 468-481.
5. Chandrasekaran B., Chettri R., Agrawal N., Sathyamoorthy C. Short-term multimodal phototherapy approach in a diabetic ulcer patient. Singapore. Med. J. 2012. Vol. 53, № 6. P. 122-124.
6. Странадко Е. Ф. Фотодинамическая терапия гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей. Фотобіологія та фотомедицина. 2011. № 2. С. 14-19.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. - Strasbourg, 1986. - 53 p.
8. Резников О. Г., Соловйов А. І., Добреля Н. В., Стефанов О. В. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: метод. рекомендації. Вісник фармакології та фармакопії. 2006. № 7. С. 47-60.

PDT treated groups the ulcer cavity was absent at all due to the complete healing of the radiation ulcer. On the spot of the ulcer defect the connective tissue was identified with surface covered with epidermis, where distinct differentiation into layers was seen (Fig. 3).

In general, the decrease of vertical cross-section area of radiation ulcer in control animals with post-radiation recovery of the body function gave evidence that the reparative processes development in the radiation ulcer were preserved.

CONCLUSIONS

1. Presence of *Pseudomonas aeruginosa* in radiation ulcer causes increase of the wound cavity area compared to non-infected radiation ulcer, and significant inhibition of the processes of its healing.
2. Additional factor of infection caused 20 per cent decreased activity of the reparative processes in the radiation ulcer compared to the values of the non-infected sore.
3. Influence of photodynamic therapy favored complete healing in average one month earlier than it occurred in control groups.

REFERENCES

1. Ovchinnikov VA, Uglyanitsa KN, Volkov VN. [Modern methods of radiation treatment of cancer patients]. Zhurnal GrGMU. 2010;(1):93-7. Russian.
2. Dmitriyeva NV, Petukhova IN, Smolyanskaya AZ. [Infectious complications in the oncology clinic]. Prakticheskaya onkologiya. 2001;1(5):18-20. Russian.
3. Uzdenskiy AB. [Cellular-molecular mechanisms of photodynamic therapy]. Moscow: Nauka; 2010. 321 p. Russian.
4. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. Lasers Surg. Med. 2006;38:468-81.
5. Chandrasekaran B, Chettri R, Agrawal N, Sathyamoorthy C. Short-term multimodal phototherapy approach in a diabetic ulcer patient. Singapore Med. J. 2012;53(6):122-4.
6. Stranadko YeF. [Photodynamic therapy of purulent-inflammatory diseases of soft tissues]. Fotobiologiya ta fotomeditsina. 2011;(2):14-9. Ukrainian.
7. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. Strasbourg, 1986. 53 p.
8. Reznikov OH, Solovyov AI, Dobrelya NV, Stefanov OV. [Bioethical examination of preclinical and other scientific researches carried out on animals: methodical recommendations]. Visnyk farmakolohiyi ta farmakopeyi. 2006; (7); 47-60. Ukrainian.