

УДК 616.5-001.26+616.98

Л.І. Сімонова-Пушкар, Н.І. Скляр, В.З. Гертман, Л.В. Білогузова, А.Т. Гоні Сімеха***

ДУ «Інститут медичної радіології імені С.П. Григор'єва НАМН України», м. Харків

**ДЛПЗ «Центральна клінічна лікарня Укрзалізниці», м. Харків*

***Харківський національний медичний університет*

ЗАСТОСУВАННЯ АНТИБАКТЕРІАЛЬНОЇ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ ПРИ ЛІКУВАННІ ІНФІКОВАНИХ ПРОМЕНЕВИХ УШКОДЖЕНЬ ШКІРИ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Дослідження проведені на 32 щурах-самцях породи Вістар, які отримували локальне рентгенівське опромінення ділянки шкіри зовнішньої поверхні стегна в дозі 85,0 Гр. Після розвитку місцевого променевого ушкодження поверхню рани інфікували культурами золотистого стафілокока (*S. aureus*) або синьогнійної палички (*P. aeruginosa*). Двом дослідним групам щурів через 24 години після інфікування проводили антибактеріальну фотодинамічну терапію за допомогою фотонного апарата і фотосенсибілізатора метиленового синього. Вже через 24 години після лікування антибактеріальна фотодинамічна терапія призводила до радикальної елімінації з поверхні рани як грампозитивних (*S. aureus*), так і грамнегативних (*P. aeruginosa*) мікроорганізмів, які застосовувались для інфікування. В контрольних групах без лікування суттєвої елімінації бактерій не відбувалося, мікробна забрудненість знижувалася поступово по мірі загоєння рани і зберігалася аж до 30-ї доби. Зроблено висновок, що фотодинамічна терапія з використанням якості фотосенсибілізатора метиленового синього є ефективним антибактеріальним методом лікування інфікованих штамми патогенних мікроорганізмів променевиx ушкоджень шкіри.

Ключові слова: фотодинамічна терапія, метиленовий синій, рентгенівське опромінення, щури, променеві ушкодження шкіри, золотистий стафілокок (*S. aureus*), синьогнійна паличка (*P. aeruginosa*).

Однією з важливих проблем радіаційної медицини є лікування місцевих променевиx ушкоджень шкіри, що найчастіше виникають у хворих, які отримують радіаційне опромінення з приводу онкологічного захворювання. Інтенсифікація променевої терапії дозволяє значно підвищувати ефективність протипухлинного лікування, але також підвищує імовірність розвитку побічних ускладнень у вигляді променевиx ушкоджень різних органів і тканин. Найчастіше при променевій терапії страждає шкіра, бо вона є першим бар'єром на шляху іонізуючого випромінювання. Відомо, що дія іонізуючого випромінювання пригнічує як загальний імунітет організму, так і імунорезистентність шкіри [1, 2]. Це зниження імунорезистентності й бар'єрного захисту шкіри створює умови для інфікування променевиx дефектів шкіри при їх виникненні та розвитку гнійно-запальних ускладнень.

Особливою проблемою є розвиток локальної інфекції, яка виникає у променевиx

дефектах шкіри при пошкодженні епідермісу, а саме при вологому (ексудативному) епідерміті і дерматиті, а особливо в променевиx виразках. Встановлено, що мікробна флора променевиx ушкоджень шкіри містить широкий спектр збудників у різних асоціаціях, що, як правило, не є чутливими до більшості антибіотиків [2, 3]. Дослідження видового складу мікрофлори променевиx ушкоджень шкіри показало, що у променевиx виразках більшості хворих присутня монокультура стафілокока та його асоціації з іншими вірулентними мікроорганізмами, зокрема з синьогнійною паличкою [2, 3]. Відомо, що цим мікроорганізмам притаманна поліантибіотикорезистентність, що створює великі труднощі при лікуванні інфікованих ран будь-якої етіології.

У зв'язку з поширенням резистентності до антибіотиків у все більшої кількості мікроорганізмів в останні роки увагу дослідників привертає використання немедикаментозних

© Л.І. Сімонова-Пушкар, Н.І. Скляр, В.З. Гертман та ін., 2015

альтернативних методів лікування інфікованих ран, найбільш перспективним з яких є антибактеріальна фотодинамічна терапія. Антибактеріальну фотодинамічну терапію вже досить успішно застосовують при лікуванні інфікованих ран і виразок нерадіаційного генезу, однак при лікуванні променевих ушкоджень шкіри фотодинамічна терапія як антибактеріальний засіб дотепер не використовувалася [4, 5].

Метою даної роботи стала експериментальна оцінка антибактеріальної ефективності ФДТ при лікуванні бактеріально інфікованих променевих ушкоджень шкіри.

Матеріал і методи. Дослідження проведено на 32 щурах-самцях лінії Вістар з масою тіла 180 – 200 г. При моделюванні місцевих променевих ушкоджень попередньо епільовану ділянку зовнішньої поверхні стегна правої кінцівки піддавали локальному X-опроміненню у дозі 85,0 Гр за допомогою рентгенотерапевтичного апарата TUR-60. При цьому виконували наступні умови: напруга на трубіці $U = 50$ кВ, анодний струм $I = 10$ мА, фільтр 0,6 мм Al. Це відповідало ефективній енергії 18 кеВ.

Тварин утримували в однакових стандартних умовах (їжа та вода *ad libitum*). Умови утримання та поводження зі щурами відповідали вимогам «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних і інших наукових цілях» [6]. Усі маніпуляції з тваринами та евтаназію виконували під наркозом, що відповідало вимогам [6] та методичним рекомендаціям [7].

Утримання тварин, інфікування променевих ушкоджень шкіри, процедури фотодинамічної терапії на інфікованих тваринах та забір матеріалу проводили в окремому боксі на базі віварію Інституту мікробіології та імунології ім. І.І. Мечнікова НАМН України (м. Харків) з дотриманням усіх правил роботи з умовно-патогенними мікроорганізмами, правил асептики і антисептики.

Для більш глибокої інвазії мікробів у підлегли шари шкіри на стадії вологого дерматиту видаляли тонку некротично-геморагічну плівку та проводили інфікування референс-штамами бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, які були одержані з музею живих мікроорганізмів ім. І.І. Мечнікова. Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин про-

водили згідно з нормативними документами [8, 9]. На поверхню місцевого променевого ушкодження шкіри наносили 0,2 мл відповідної мікробної суспензії з концентрацією 5×10^5 мікробних клітин в 1 мл.

Забір матеріалу з об'єкта дослідження проводили за допомогою стерильного ватного тампону. Матеріал з тампону ретельно відмивали в 1 мл стерильного ізотонічного розчину NaCl та готували ряд послідовних 10-кратних розведень. По 0,1 мл з кожного розведення висівали на відповідні для кожного виду мікроорганізмів поживні середовища (для стафілокока – маніт-сольовий агар, для синьогнійної палички – поживний агар). Посіви культивували упродовж 18 год при температурі 37 °С. Ідентифікацію тест-штамів здійснювали за морфологічними, тинкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями.

Концентрацію мікроорганізмів визначали шляхом підрахунку колонієутворюючих одиниць (КУО) з урахуванням розведення досліджуваного матеріалу. Для зручності одержані результати визначення кількості мікроорганізмів виражали в десяткових логарифмах числа мікроорганізмів на см^2 – $\lg \text{КУО}/\text{см}^2$.

Фотодинамічну терапію здійснювали за допомогою фотонного апарата «Барва-LED/630». Потужність фотонного випромінювання $P = 25$ мВт, довжина хвилі (максимум поглинання випромінювання) 630 – 650 нм. Час опромінення світлом – 30 хв, енергетична експозиція за сеанс – 45 Дж/см². Як фотосенсибілізатор використовували 0,1%-вий водний розчин метиленового синього (*Methylenum coeruleum*). На ранову поверхню місцевого променевого ушкодження наносили фотосенсибілізатор (концентрація метиленової сині – 0,1 %) з експозицією 30 хв.

Мікробіологічний контроль шкіряної поверхні в зоні опромінення здійснювали на 1, 3, 7, 14 та 30-ту добу після інфікування, що відповідало 15, 17, 21, 28 та 44 добі після локального рентгенівського опромінення.

Дослідження проводили на чотирьох групах щурів: 1-ша група – щури з місцевим променевим ушкодженням, інфікованим *S. aureus*, та лікуванням фотодинамічною терапією; 2-га – щури з місцевим променевим ушкодженням, інфікованим *S. aureus* (контроль); 3-тя – щури з місцевим променевим ушкодженням, інфікованим *P. aeruginosa*, та лікуванням фотодинамічною терапією; 4-та –

щури з місцевим променевим ушкодженням, інфікованим *P. aeruginosa* (контроль).

Цифрові дані обробили з використанням методів параметричної та непараметричної статистики [10]. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. В усіх групах піддослідних тварин локальне рентгеновське опромінення ділянки стегна в дозі 85,0 Гр викликало розвиток променевих місцевих ушкоджень шкіри у вигляді сухого та вологого дерматиту з подальшим розвитком на поверхні великої кількості точкових крововиливів.

Мікробіологічні дослідження показали, що у лабораторних тварин 1-ї дослідної групи, які були інфіковані культурою *S. aureus* через добу після інфікування, тобто безпосередньо перед проведенням фотодинамічної терапії, зафіксована значна колонізація поверхні місцевих променевих ушкоджень шкіри тест-штамом стафілокока, що становила у середньому $\lg (7,62 \pm 0,06)$ КУО/см². В контрольній (2-й) групі щільність мікробної колонізації через 24 години після інфікування *S. aureus* була практично однаковою з дослідною групою і не мала статистичних відмінностей (таблиця).

В групах тварин, де інфікуючим агентом була синьогнійна паличка (*P. aeruginosa*), ступінь заселення бактеріями обстеженого біотопу як в дослідній, так і в контрольній групі становив $(5,40 \pm 0,24)$ КУО/см².

Результати мікробіологічних досліджень матеріалу з поверхні місцевих променевих ушкоджень шкіри в групах тварин, яким була проведена антибактеріальна фотодинамічна терапія, показали, що вже через 24 години після лікувальних заходів наставала повна елімінація тест-штаму стафілокока і синьогнійної палички (таблиця). Досягнуті показники зберігались до кінця терміну експерименту (30 діб після інфікування).

В контрольних групах тварин (2-га і 4-та) відзначена спрямованість і виразність змін кількості мікроорганізмів, яка залежала від термінів обстеження.

В групах тварин, яким лікувальні заходи не проводились, показники заселення тест-штамами бактерій обстеженого біотопу в найближчі строки спостереження (через 24 год після фотодинамічної терапії) не відрізнялися від вихідних значень ($p > 0,05$).

У подальші строки по мірі загоєння місцевих променевих ушкоджень і відновлення імунорезистентності організму кіль-

Вплив фотодинамічної терапії (ФДТ) на щільність мікробної колонізації у місцевому променевому ушкодженні шкіри щурів після інфікування *S. aureus* та *P. aeruginosa*

Щільність мікробної колонізації, (M ± m) lg КУО/см ² , у терміни спостереження	Група тварин			
	1-ша (n=9) МПУ+інфікування <i>S. aureus</i> + ФДТ	2-га (n=7) МПУ+інфікування <i>S. aureus</i>	3-тя (n=9) МПУ+інфікування <i>P. aeruginosa</i> + ФДТ	4-та (n=7) МПУ+інфікування <i>P. aeruginosa</i>
Через 24 год після інфікування і 15 діб після X-опромінення	7,62±0,03	7,62±0,14	5,40±0,24	5,66±0,41
Через 24 год після лікування ФДТ і 16 діб після X-опромінення	0	7,22±0,23	0	4,79±0,25
3-тя доба після інфікування і 17-та після X-опромінення	0	6,03±0,65*	0	4,57±0,32
7-ма доба після інфікування і 21-ша після X-опромінення	0	6,60±0,25*	0	4,43±0,19
14-та доба після інфікування і 28-ма після X-опромінення	0	6,44±0,41*	0	4,26±0,21*
30-та доба після інфікування і 44-та після X- опромінення	0	6,18±0,27*	0	4,11±0,17*

Примітки: 1. Вірогідно відносно вихідного показника (через 24 год після інфікування).

2. МПУ – місцеве поверхнєве ушкодження.

кість мікроорганізмів у контрольних групах пацієнтів, інфікованих як *S. aureus*, так і *P. aeruginosa*, вірогідно знижувалася на 7, 14 та 30-ту добу. Так, через 3 доби щільність колонізації мікроорганізмами поверхні місцевих променевих ушкоджень в цих групах вірогідно зменшувалась відносно вихідного рівня ($p < 0,05$). Однак щільність колонізації бактеріями *S. aureus* і *P. aeruginosa*, яку фіксували до кінця спостережень у контрольних групах без лікування, залишалася на достатньо високому рівні – $lg(6,03 \pm 0,65)$ КУО/см² у 1-й контрольній групі із стафілококом і $lg(4,57 \pm 0,32)$ КУО/см² у відповідній 4-й групі із синьогнійною паличкою. Ці факти свідчать про продовження інфекційного процесу в зоні місцевих променевих ушкоджень.

Проведені дослідження використання фотодинамічної терапії як антимікробного методу при лікуванні штучно інфікованих променевих ушкоджень шкіри високовірulentними штамами бактерій (*S. aureus*, *P. aeruginosa*) показали її високу ефективність. Варто відмітити, що використання у даній роботі в якості фотосенсибілізатора метиленового синього сприяло елімінації як грамполозитивних (*S. aureus*), так і грамнегативних (*P. aeruginosa*) бактерій. В інших роботах, в яких використовували фотосенсибілізатори з високим потенціалом фототоксичної дії з класів похідних порфіринів чи фталоціанінів, відзначалася лише переважно загибель грамполозитивних бактерій [11, 12]. Грамнегативні бактерії, згідно даних багатьох дослідників, виявилися резистентними до фотодинамічної дії цих фотосенсибілізаторів [11, 12].

У наших експериментах продемонстровано високий антибактеріальний ефект по відношенню до збудників опортуністичної інфекції у вигляді грамполозитивних і грамнегативних бактерій при дії на них фотодинамічної терапії з використанням фотосенсибілізатора з групи фенотіазинів (метиленового синього).

У зв'язку з цим використання метиленового синього для антибактеріальної фото-

динамічної терапії значно розширює можливості елімінації мікробів, імовірно і антибіотикорезистентних, з поверхні променевих ушкоджень. Перевага методу антибактеріальної фотодинамічної терапії з використанням метиленового синього в якості фотосенсибілізатора полягає перед усім в усуненні необхідності використовувати антибіотикотерапію, яка не є ефективною при інфікуванні антибіотикорезистентними штамми мікроорганізмів. При цьому антибіотикотерапія часто ускладнюється інтоксикацією, уповільненням репаративних процесів. Як показали наші дослідження, використання антибактеріальної фотодинамічної терапії з метиленовим синім приводить до радикальної елімінації як грамполозитивних (*S. aureus*), так і грамнегативних (*P. aeruginosa*) бактерій.

В цілому, антимікробна фотодинамічна терапія з метиленовим синім як фотосенсибілізатором є альтернативою традиційним методам лікування променевих ушкоджень шкіри, оскільки не викликає ускладнень і є доступним і недорогим засобом лікування.

Висновки

1. Використання фотодинамічної терапії з метиленовим синім як фотосенсибілізатором сприяло 100%-вій елімінації з поверхні місцевого променевого ушкодження шкіри як грамполозитивних (*S. aureus*), так і грамнегативних (*P. aeruginosa*) мікроорганізмів.

2. Антимікробну фотодинамічну терапію з використанням як фотосенсибілізатора метиленового синього можна вважати перспективною медичною технологією, альтернативною антибіотикотерапії, для елімінації патогенних мікроорганізмів при лікуванні інфікованих місцевих променевих ушкоджень.

Перспективи подальших досліджень полягають в експериментальному визначенні ефективності фотодинамічної терапії при лікуванні місцевих променевих ушкоджень, інфікованих циркулюючими клінічними штамми антибіотикорезистентних мікроорганізмів.

Література

1. Кузьмина Е.Г. Клинико-морфологические анализы ранних и отдаленных последствий действия радиации на численность и функциональное состояние клеток иммунной системы / Е.Г. Кузьмина, В.Г. Андреев, М.С. Бардычев // Радиация, биология и радиоэкология. – 2001. – Т. 41, № 5. – С. 640–642.

2. Новые подходы в консервативном лечении глубоких поздних лучевых повреждений мягких тканей / В.В. Пасов, О.В. Перехов, Ю.Г. Постанов и др. // Радиация и риск. – 2010. – Т. 19, № 2. – С. 58–64.
3. Методические рекомендации по иммунотерапии при местных лучевых поражениях мягких тканей / Р.И. Атауллаханов, В.В. Пасов, М.С. Бардычев, А.В. Пичугин. – М., 2010. – 16 с.
4. Short-term multimodal phototherapy approach in a diabetic ulcer patient / V. Chandrasekaran, R. Chettri, N. Agrawal, C. Sathyamoorthy // Singapore. Med. J. – 2012. – Vol. 53, № 6. – P. 122–124.
5. Заживление язв, вызванных локальным рентгеновским облучением крыс, с помощью фотодинамической терапии / М.А. Каплан, Р.Г. Никитина, Т.Г. Морозова, В.В. Дрожжина // Мед. радиология и радиац. безопасность. – 2004. – Т. 49, № 3. – С. 28–31.
6. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Council of Europe. – Strasbourg, 1986. – 53 p.
7. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: методичні рекомендації / О.Г. Резніков, А.І. Соловійов, Н.В. Добреля, О.В. Стефанов // Вісник фармакології та фармакопеї. – 2006. – № 7. – С. 47–60.
8. Стандартизація приготування мікробних суспензій: Інформ. лист про нововведення в системі охорони здоров'я №163-2006 (Нормативний документ. МОЗ України; Український центр наукової медичної інформації та патентно-ліцензійної роботи. Інформ. лист). – К.: Укрмедпатентінформ, 2006. – 10 с.
9. Баснакьян И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И.А. Баснакьян. – М.: Медицина, 1992. – С. 29–59.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
11. Странадко Е.Ф. Фотодинамическое воздействие на патогенные микроорганизмы (Современное состояние и проблемы антимикробной фототерапии) / Е.Ф. Странадко, И.Ю. Кулешов, Г.И. Караханов // Лазерная медицина. – 2010. – Т. 14, № 2. – С. 52–56.
12. Микробиологическое обоснование эффективности фотосенсибилизаторов при фотодинамической терапии / О.Е. Шишкина, Л.Ю. Бутакова, Ю.О. Иванченко, С.С. Антонов // Лазерная медицина. – 2013. – Т. 17, № 1. – С. 35–37.

Л.И. Симонова-Пушкар, Н.И. Скляр, В.З. Гертман, Л.В. Белогурова, А.Т. Гони Симеха
ПРИМЕНЕНИЕ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЛЕЧЕНИИ
ИНФИЦИРОВАННЫХ ЛУЧЕВЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ КОЖИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Исследования проведены на 32 крысах-самцах породы Вистар, которые получали локальное рентгеновское облучение участка кожи внешней поверхности бедра в дозе 85,0 Гр. После развития местного лучевого поражения поверхность раны инфицировали культурами золотистого стафилококка (*S. aureus*) или синегнойной палочки (*P. aeruginosa*). Двум опытным группам крыс через 24 часа после инфицирования проводили антибактериальную фотодинамическую терапию с помощью фотонного аппарата и фотосенсибилизатора метиленового синего. Уже через 24 часа после лечения антибактериальная фотодинамическая терапия приводила к радикальной элиминации с поверхности раны применявшихся для инфицирования как грамположительных (*S. aureus*), так и грамотрицательных (*P. aeruginosa*) микроорганизмов. В контрольных группах без лечения существенной элиминации бактерий не происходило, микробная обсемененность снижалась постепенно по мере заживления раны и сохранялась вплоть до 30 суток. Сделан вывод, что антибактериальная фотодинамическая терапия с использованием в качестве фотосенсибилизатора метиленового синего является эффективным антибактериальным методом лечения инфицированных штаммами патогенных микроорганизмов лучевых повреждений кожи.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, метиленовый синий, рентгеновское облучение, крысы, лучевые повреждения, золотистый стафилококк (*S. aureus*), синегнойная палочка (*P. aeruginosa*).

L.I. Simonova-Pushkar, N.I. Skliar, V.Z. Gertman, L.V. Bilogurova, A.T. Goni Simеха
APPLICATION OF ANTIBACTERIAL FOTODYNAMIC THERAPY AT TREATMENT OF INFECTED
RADIAL DAMAGES OF SKIN IN EXPERIMENT

The study was performed on 32 Wistar male rats. All animals received a local X-ray irradiation of the skin area of outer thigh at a dose of 85.0 Gy. After developing of radiation skin damage the wound surface was infected with cultures of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. Two experimental groups of rats at 24 hours after infection was performed antimicrobial photodynamic therapy (APDT)

using a photonic device and a photosensitizer methylene blue. It is shown that APDT already 24 hours after treatment resulted in the radical elimination with the wound surface applied to microbial infection as gram-positive (*S. aureus*), and gram-negative (*P. aeruginosa*). In the control groups without treatment substantial elimination of bacteria did not occur, the microbial contamination is gradually decreased as wound healing and persisted until 30 days. APDT using methylene blue as a photosensitizer is effective antibacterial treatment of infected skin radiation damages.

Key words: *photodynamic therapy, methylene blue, X-ray irradiation, rats, radiation damage, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa.*

Поступила 19.08.15