

## АНОТАЦІЯ

*Пушкар О. С.* Профілактика ранніх та лікування пізніх променевих ушкоджень шкіри з використанням фотомагнітної та фотодинамічної терапії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина». – Державна установа «Інститут медичної радіології та онкології ім. С.П. Григор'єва НАМН України», Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, 2024.

**Мета дослідження** – оптимізація тактики ведення онкологічних хворих та розробка підходів щодо удосконалення профілактики ранніх і підвищенні ефективності лікування пізніх променевих ушкоджень шкіри на підставі вивчення ефектів фотомагнітного та фотодинамічного впливу.

Для досягнення цієї мети було сформульовано наступні завдання дослідження: 1) вивчити терміни і частоту виникнення променевих ушкоджень шкіри у хворих на рак грудної залози (РГЗ); 2) створити експериментальну модель променевого ушкодження шкіри щурів; 3) вивчити особливості перебігу та макроскопічну характеристику променевих виразок шкіри на моделі щурів; 4) дослідити патоморфологічні особливості променевих виразок шкіри та підлеглих тканин на експериментальній моделі щурів у разі спонтанного загоєння, при застосуванні фотодинамічної терапії (ФДТ) та у комбінації зі збагаченою тромбоцитами плазмою (PRP); 5) вивчити системні ефекти ФДТ при лікуванні променевих виразок на експериментальній моделі щурів; 6) оцінити вплив фотомагнітної терапії на місцеві та системні реакції організму у хворих на РГЗ; 7) провести порівняльний аналіз й обґрунтувати доцільність застосування фотомагнітної терапії при веденні хворих на РГЗ під час променевої терапії.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню актуального наукового завдання у онкології – вивченню клінічної, метаболічної та антибактеріальної ефективності фотомагнітного та фотодинамічного впливу на місцеві променеві ушкодження шкіри з метою оптимізації лікувальної тактики онкологічних хворих.

У межах клінічної частини дослідження було обстежено 26 жінок з діагнозом РГЗ (II–IIIБ стадії) віком 35–65 років. З них 16 жінок отримували фотомагнітну терапію з метою профілактики розвитку ранніх променевих ушкоджень шкіри (еритема, дерматит, десквамація та ін.) під час післяопераційного променевого лікування. Пацієнтки, включені до дослідження, мали підтверджений гістологічно діагноз РГЗ, усім була виконана радикальна мастектомія й призначено післяопераційну променеву терапію в режимі класичного фракціонування РОД 2 Гр по 20 фракцій (1 фракція на добу, 5 разів на тиждень) до СОД 40 Гр на над-, підключичну і парастернальну ділянки та післяопераційний рубець.

Для оцінки ефективності запропонованих методів оптимізації тактики ведення ранніх МПУ шкіри у хворих на РГЗ вивчали ряд показників: інтенсивність проявів шкірних реакцій, стан маркерів метаболізму сполучної тканини, стан системи гемостазу у хворих на РГЗ під час променевого лікування.

Для з'ясування механізмів місцевої дії ФМТ на опромінену шкіру в сироватці крові хворих на РГЗ визначали показники стану метаболізму сполучної тканини, а саме маркери обміну основного білка шкіри – колагену й основних метаболітів міжклітинного матриксу – глікозаміногліканів (ГАГ). Стан обміну колагену визначали за кількістю оксипроліну (ОП).

Після проведення курсу ПТ у групі порівняння відбулося вірогідне підвищення вмісту всіх сироваткових фракцій ОП на 25–45% у порівнянні

з нормою ( $p < 0,05$ ). Водночас відношення вмісту вільного ОП у сироватці крові до вмісту зв'язаного знижувалося на 14,0 % ( $p < 0,05$ ).

Зміни у вмісті фракцій досліджуваних метаболітів ОП відбувалися на тлі збільшення сумарної концентрації ОП у сироватці крові на 27,0% відносно показників до ПТ і на 34,1% відносно показників групи донорів ( $p < 0,05$ ). Така картина може свідчити про активацію метаболізму колагену в опроміненій шкірі, причому як розпаду, так і синтезу зазначеного білку. Проте зменшення відношення вільного ОП до зв'язаного вказує все ж таки на превалювання процесів синтезу й накопичення колагену. Це свідчить про активацію метаболізму колагену в опроміненій шкірі, причому як розпад, так і синтез зазначеного білку. В основній групі хворих подібних змін не спостерігалось. Проведення ФМТ вірогідно зменшило інтенсивність метаболізму колагену: зазначено більш низький вміст як вільного ОП (на 12,4%,  $p < 0,05$ ), так і зв'язаного ОП (на 21,2%,  $p < 0,05$ ) у сироватці крові хворих у порівнянні з групою контролю. Рівень сумарного ОП був у межах вихідних значень до променевої і фотоманітної терапії – ( $22,05 \pm 1,01$ ) і ( $23,77 \pm 0,61$ ) мкмоль/л, відповідно ( $p > 0,05$ ), та був вірогідно нижчий за такий у контролі ( $p > 0,05$ ). Отже, активація метаболізму колагену в опроміненій шкірі у хворих, які отримували з ФМТ, мала місце, проте її інтенсивність була значно нижчою, ніж у групі порівняння, зокрема, інтенсивність синтезу й накопичення колагену шкіри.

Для характеристики стану міжклітинного матриксу було проведено дослідження вмісту ГАГ та їхнього фракційного складу, сумарних хондроїтинсульфатів (ХС) і вмісту позаклітинних білків глікопротеїнів (ГП). Після курсу ПТ у хворих групи порівняння відзначалося різке підвищення ГАГ, сумарних ХС і ГП (у 2,5; 2 та 3 рази, відповідно ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з нормою і початковими значеннями до ПТ. Це вказує як на посилення запальних реакцій в опроміненій шкірі, так і на початок розвитку в сполучній тканині деструктивних процесів. У пацієток основної групи

вміст усіх цих метаболітів міжклітинного матриксу практично не змінювався і зберігався в межах початкових значень. Так, показники сумарних ГАГ і ХС відповідали нормальним, а рівень ГП залишався підвищеним щодо норми приблизно вдвічі ( $p < 0,05$ ) та не змінювався щодо початкового значення. Аналіз змін фракційного складу ГАГ свідчить, що різке підвищення вмісту сумарних ГАГ відбувалося переважно за рахунок I та II фракцій. У пацієток основної групи фракційний склад ГАГ суттєво не змінювався за період проведення ПТ, відповідно цьому всі показники вмісту фракцій, що вивчалися, після ПТ були вірогідно нижче у 2–4 рази аналогічних показників у групі порівняння ( $p < 0,05$ ).

На основі аналізу стану гемостатичного потенціалу оцінено вплив фотоманітної терапії з використанням фотодіодів червоного та синього кольору на системному рівні. Виявлено позитивний ефект розробленої схеми ФМТ на стан системи гемостазу у хворих на РГЗ під час проведення ПТ. Вихідний рівень гіперкоагуляції, притаманний цим хворим, значно знижувався, при цьому фібринолітична ланка гемостазу нормалізувалася, що мінімізувало ризик розвитку ДВЗ-синдрому в обстежених хворих. Отже, фотоманітна дія на шкіру хворих на РГЗ запобігала фібротизації і розвитку передумов для виникнення променевого фіброзу, а також розбалансуванню різних ланок системи гемостазу.

Проведено порівняльний аналіз результатів використання ФМТ та традиційних методів лікування на підставі класифікації МПУ, розробленої Національним Інститутом Раку США (NCI). Виявлено, що використання ФМТ у період проведення ПТ дало змогу знизити ступінь тяжкості радіаційно-індукованих шкірних реакцій порівняно з референтною групою, де ушкодження досягали II ступеня тяжкості, а в однієї хворої початкова фаза відповідала III ступеню. У хворих, які отримували ФМТ, реакції шкіри не перевищували I ступінь, дискомфорт був мінімальним, відбувалося раннє зникнення шкірних дефектів.

Експериментальна частина дисертаційної роботи присвячена обґрунтуванню ефективності використання самостійно ФДТ та у комбінації з PRP для оптимізації лікування пізніх МПУ шкіри (променевих виразок).

Задля оцінки ефективності методу досліджувались особливості перебігу та макроскопічна характеристика променевих виразок шкіри та підлеглих тканин; їх подальше інфікування та місцевий антимікробний ефект ФДТ; особливості процесів загоєння променевих виразок.

Експеримент проводили на 126 щурах. Щури були розподілені на 5 груп, включно з групою інтактного контролю – 1 група. У групах 2-5 проведено інфікування променевої виразки мікробним агентом (музейний штам *Staphylococcus aureus*). 4 групі щурів проводилася самостійна терапія ФДТ, 5 групі – комбінована терапія (ФДТ+PRP). Моделювання променевих виразок у щурів проводилося шляхом опромінення в дозі 85,0 Гр на рентгенівській установці Faxitron MultiRad 225. В експериментах на інтактних щурах вивчено особливості гістологічної характеристики шкіри, що доповнює наявні дані літератури.

Застосування ФДТ на зону опромінення шкіри значно зменшило частоту розвитку променевих дерматитів у щурів, прискорювало їхнє загоєння, полегшило перебіг ранового процесу. Так, у тварин із ФДТ, практично не було еритеми, крововиливи та лущення шкіри фіксували у вірогідно меншій кількості тварин, значно менше було і струпів. У щурів з ФДТ зовсім не розвивався вологий дерматит, частота розвитку сухого дерматиту була значно меншою, а регенераторна фаза починалася вже на 21 добу, тоді як у контрольній групі лише на 30 добу розвивалися візуально помітні ознаки регенерації. Тобто переважання регенераторних процесів над запальними в лікованих групах починалося раніше приблизно на 1,5 тижні. Наприкінці першого місяця досліджень поверхня променевого дефекту повністю очищувалася, з'являвся повноцінний шерстний покрив. Повне загоєння рани з повноцінною епітелізацією та якісним відновленням шерстного покриву відзначалося раніше на 1,5 тижні, ніж у контролі,

причому частота ознак віддалених наслідків опромінення шкіри (рубці, ділянки гіперпігментації) знижувалася в декілька разів.

Досконально вивчені гістологічні показники будови променевої виразки на різних етапах її розвитку у вигляді лейкоцитарно-некротичного та демаркаційно-лейкоцитогрануляційного валу. Встановлено очищення поверхні променевої виразки від гнійно-некротичної маси та патогенетичної флори під впливом ФДТ із послідовним заповненням порожнини сполучною тканиною, яка покривалась епітеліальним пластом із регенерацією придатків шкіри.

*Наукова новизна отриманих результатів* полягає у комплексному підході до вивчення впливу ФМТ та ФДТ на стан шкірних реакцій у хворих на РГЗ під час проведення ПТ та в експерименті зі змодельованою променевою виразкою шкіри щурів. Оцінку проведено за результатами аналізу комплексу клінічних, біохімічних, метаболічних та патоморфологічних показників.

У хворих на РГЗ на тлі проведення променевої терапії при застосуванні фотоманітної терапії встановлено зміни у клінічних проявах, що характеризувались збільшенням тривалості латентного періоду – появи перших ознак первинної еритеми на 3-тю – 5-ту добу, що запобігало розвитку клінічних проявів променевих уражень шкіри аж до останніх сеансів променевої терапії.

Отримані нові дані про дію ФМТ та ФДТ на основні показників гомеостазу на системному рівні у вигляді нормалізації стану ПОЛ, активації антиоксидантних ферментів крові та активності обміну сполучної тканини, а також запобіганню розбалансуванню у різних ланках системи гемостазу. Застосування цих методів лікування є перспективним напрямком в онкології, радіології та хірургії для рішення проблеми зниження тяжкості перебігу ранніх МПУ шкіри під час проведення ПТ та довготривалих незагоєваних променевих виразок шкіри.

Підсумком комплексу патоморфологічних досліджень стали нові уявлення про особливості перебігу променевиx виразок шкіри та підлеглих тканин у щурів при застосуванні окремо фотодинамічної терапії (ФДТ) та у комбінації фотодинамічної терапії зі збагаченою тромбоцитами плазмою (ФДТ+PRP).

*Практичне значення отриманих результатів.* На підставі отриманих результатів встановлено, що для профілактики ранніх променевиx уражень шкіри та підшкірної клітковини при проведенні сеансів променевої терапії доцільно проводити сеанси ФМТ на ділянку опромінення для поліпшення стану кровообігу, регенерації клітин шкіри, зменшення набряку та болю. При пізніх променевиx ураженнях (променеві виразки) для очищення від некротичних тканин та пошкоджених клітин застосовують ФДТ – спосіб, заснований на спільному використанні фотосенсибілізатора (метиленового синього), нанесеного на поверхню шкіри з наступним впливом лазерного світла довжиною хвилі 630-660 нМ, або варіант комбінованої фотодинамічної терапії з використанням збагаченої тромбоцитами плази для підвищення репаративних властивостей методу.

Доцільно проводити повторні сеанси ФДТ до повного очищення порожнини променевої виразки, а в разі необхідності, можливо проведення аутотрансплантації клаптем з осьовим кровообігом.

Рекомендована схема фотомагнітної терапії з використанням фотодіодів червоного кольору у хворих на РГЗ під час проведення ад'ювантного променевого лікування.

*Ключові слова:* місцеві променеві ураження, фотодинамічна терапія, фотомагнітна терапія, фотодіоди, рак грудної залози, сполучна тканина.

## ABSTRACT

*Pushkar O. S.* Prevention of early and treatment of late local radiation damage to the skin using photomagnetic and photodynamic therapy. – Qualifying scientific work on manuscript rights.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 "Medicine". - V. N. Karazin Kharkiv National University, SO «Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 2024.

**The purpose of the study** is to optimize the management of oncology patients and develop approaches to improve the prevention of early and increase the effectiveness of treatment of late radiation damage to the skin based on the study of the effects of photomagnetic and photodynamic exposure.

To achieve this goal, the following research tasks were formulated: 1) to study the timing and frequency of radiation damage to the skin in patients with breast cancer (BC); 2) to create an experimental model of radiation damage to the skin of rats; 3) to study the features of the course and macroscopic characteristics of radiation skin ulcers on the rat model; 4) to investigate the pathomorphological features of radiation ulcers of the skin and underlying tissues on an experimental rat model in the case of spontaneous healing, when using photodynamic therapy (PDT) and in combination with platelet-rich plasma (PRP); 5) to study the systemic effects of PDT in the treatment of radiation ulcers on an experimental rat model; 6) evaluate the effect of photomagnetic therapy on local and systemic reactions of the body in patients with BC; 7) conduct a comparative analysis and substantiate the expediency of using photomagnetic therapy in the management of patients with BC during radiation therapy (RT).

The dissertation is dedicated to the research of an actual scientific task in oncology - the study of the clinical, metabolic and antibacterial effectiveness of



photomagnetic and photodynamic effects on local radiation damage to the skin in order to optimize the treatment tactics of cancer patients.

Within the scope of the clinical part of the study, 26 women with a diagnosis of ovarian cysts (II–IIIB stages) aged 35–65 years were examined. Of these, 16 women received photomagnetic therapy to prevent the development of early radiation damage to the skin (erythema, dermatitis, desquamation, etc.) during postoperative radiation treatment. The patients included in the study had a histologically confirmed diagnosis of BC, all underwent radical mastectomy and were prescribed postoperative radiation therapy in the mode of classical fractionation of ROD 2 Gy in 20 fractions (1 fraction per day, 5 times a week) up to SOD 40 Gy per, subclavian and parasternal areas and postoperative scar.

To evaluate the effectiveness of the proposed methods of optimizing the tactics of managing early local radiation damages (LRD) of the skin in patients with BC, several indicators were studied: the intensity of manifestations of skin reactions, the state of markers of connective tissue metabolism, the state of the hemostasis system in patients with BC during radiation treatment.

To find out the mechanisms of the local effect of PMT on irradiated skin, indicators of the metabolic state of connective tissue were determined in the blood serum of patients with BC, namely, markers of the exchange of the main protein of the skin - collagen and the main metabolites of the intercellular matrix - glycosaminoglycans (GAG). The state of collagen metabolism was determined by the amount of oxyproline (OP).

After the course of PT in the comparison group, there was a probable increase in the content of all serum fractions of OP by 25–45% compared to the norm ( $p < 0.05$ ). At the same time, the ratio of the content of free OP in blood serum to the content of bound decreased by 14.0% ( $p < 0.05$ ).

Changes in the content of the fractions of the studied OP metabolites occurred against the background of an increase in the total concentration of OP in the blood serum by 27.0% relative to the indicators before RT and by 34.1%

relative to the indicators of the donor group ( $p < 0.05$ ). Such a picture may indicate the activation of collagen metabolism in irradiated skin, and both the breakdown and synthesis of the specified protein. However, the decrease in the ratio of free OP to the bound one still indicates the prevalence of collagen synthesis and accumulation processes. This indicates the activation of collagen metabolism in the irradiated skin, and both the breakdown and synthesis of the specified protein. Similar changes were not observed in the main group of patients. Performing PMT probably reduced the intensity of collagen metabolism: a lower content of both free OP (by 12.4%,  $p < 0.05$ ) and bound OP (by 21.2%,  $p < 0.05$ ) in the serum was noted blood of patients compared to the control group. The level of total OP was within the baseline values before radiation and photomagnetic therapy - ( $22.05 \pm 1.01$ ) and ( $23.77 \pm 0.61$ )  $\mu\text{mol/l}$ , respectively ( $p > 0.05$ ), and was probably lower than in the control ( $p > 0.05$ ). Thus, activation of collagen metabolism in irradiated skin in patients treated with PMT took place, but its intensity was significantly lower than in the comparison group, in particular, the intensity of skin collagen synthesis and accumulation.

To characterize the state of the intercellular matrix, a study was conducted of the content of GAG and their fractional composition, total chondrocytessulfates (CS) and the content of extracellular proteins glycoproteins (GP). After the course of PT, the patients of the comparison group had a sharp increase in GAG, total CH, and HP (in 2.5, 2 and 3 times, respectively ( $p < 0.05$ )) in comparison with the norm and initial values before PT. This indicates an increase inflammatory reaction in the irradiated skin, as well as the beginning of the development of destructive processes in the patients of the main group, the content of all these metabolites of the intercellular matrix did not change and remained within the initial values remained elevated approximately twice as compared to the norm ( $p < 0.05$ ) and did not change compared to the initial value. The analysis of changes in the fractional composition of GAG showed that the sharp increase in the content of total GAG occurred mainly due to fractions I and

II. In the main group, the fractional composition of GAG was significant did not change during the RT period, accordingly, all indicators of the content of studied fractions after RT were probably 2-4 times lower than similar indicators in the comparison group ( $p < 0.05$ ).

Based on the analysis of the state of the hemostatic potential, the effect of photomagnetic therapy using red and blue photodiodes at the system level was evaluated. The positive effect of the developed PMT scheme on the state of the hemostasis system in patients with BC during RT was revealed. The initial level of hypercoagulation inherent in these patients was significantly reduced, while the fibrinolytic link of hemostasis was normalized, which minimized the risk of developing DIC-syndrome in the examined patients. Therefore, the photomagnetic effect on the skin of patients with BC prevented fibrotization and the development of prerequisites for the occurrence of radiation fibrosis, as well as the imbalance of various links of the hemostasis system.

A comparative analysis of the results of using PMT and traditional treatment methods was conducted based on the MPU classification developed by the US National Cancer Institute (NCI). It was found that the use of PMT during the period of RT made it possible to reduce the severity of radiation-induced skin reactions compared to the reference group, where the injuries reached the II degree of severity, and in one patient the initial phase corresponded to the III degree. In patients who received PMT, skin reactions did not exceed the first degree, discomfort was minimal, and early disappearance of skin defects occurred.

The experimental part of the dissertation work is devoted to substantiating the effectiveness of using PDT alone and in combination with PRP to optimize the treatment of late skin LRD (radiation ulcers).

To evaluate the effectiveness of the method, the peculiarities of the course and macroscopic characteristics of radiation ulcers of the skin and underlying

tissues were studied; their further infection and local antimicrobial effect of PDT; peculiarities of healing processes of radiation ulcers.

The experiment was conducted on 126 rats. The rats were divided into 5 groups, including the intact control group - 1 group. In groups 2-5, radiation ulcer was infected with a microbial agent (museum strain of *Staphylococcus aureus*). The 4th group of rats received independent PDT therapy; the 5th group received combined therapy (PDT+PRP). Modeling of radiation ulcers in rats was carried out by irradiation at a dose of 85.0 Gy on a Faxitron MultiRad 225 x-ray unit. In experiments on intact rats, the peculiarities of the histological characteristics of the skin were studied, which complements the available literature data.

Application of PDT to the irradiated skin area significantly reduced the incidence of radiation dermatitis in rats, accelerated their healing, and eased the course of the wound process. Thus, in animals with PDT, there was practically no erythema, hemorrhages and peeling of the skin were recorded in a probably smaller number of animals, and there were significantly fewer scabs. PDT rats did not develop wet dermatitis at all, the frequency of dry dermatitis was significantly lower, and the regenerative phase began already on day 21, while in the control group, visually noticeable signs of regeneration developed only on day 30. That is, the predominance of regenerative processes over inflammatory processes in the treated groups began earlier by about 1.5 weeks. At the end of the first month of research, the surface of the radiation defect was completely cleaned, a full-fledged fur coat appeared. Complete healing of the wound with complete epithelization and high-quality restoration of the fur coat was noted 1.5 weeks earlier than in the control, and the frequency of signs of remote effects of skin irradiation (scars, areas of hyperpigmentation) decreased several times.

The histological indicators of the structure of a radiation ulcer at various stages of its development in the form of a leukocyte-necrotic and demarcation-leukocytogranulation shaft have been thoroughly studied. It was established that the surface of the radiation ulcer was cleaned of purulent-necrotic mass and

pathogenetic flora under the influence of PDT with successive filling of the cavity with connective tissue, which was covered with an epithelial layer with regeneration of skin appendages.

The scientific novelty of the obtained results lies in the complex approach to studying the effect of PMT and PDT on the state of skin reactions in patients with BC during RT and in an experiment with a simulated radiation ulcer of the skin of rats. The assessment was carried out based on the results of the analysis of a complex of clinical, biochemical, metabolic and pathomorphological indicators.

In patients with BC, against the background of radiation therapy with the use of photomagnetic therapy, changes in clinical manifestations were established, which were characterized by an increase in the duration of the latent period - the appearance of the first signs of primary erythema on the 3rd - 5th day, which prevented the development of clinical manifestations of radiation skin lesions up to until the last radiation therapy sessions.

New data were obtained on the effect of PMT and PDT on the main indicators of homeostasis at the systemic level in the form of normalization of the state of lipids, activation of blood antioxidant enzymes and activity of connective tissue exchange, as well as prevention of imbalance in various links of the hemostasis system. The use of these treatment methods is a promising direction in oncology, radiology, and surgery to solve the problem of reducing the severity of the course of early LRD of the skin during PT and long-term non-healing radiation skin ulcers.

The result of a complex of pathomorphological studies became new insights into the peculiarities of the course of radiation ulcers of the skin and underlying tissues in rats when using photodynamic therapy (PDT) alone and in combination of photodynamic therapy with platelet-rich plasma (PDT+PRP).

Practical significance of the obtained results. Based on the obtained results, it was established that for the prevention of early radiation damage to the skin and subcutaneous tissue during radiation therapy sessions, it is advisable to conduct PMT sessions on the irradiated area to improve blood circulation, regenerate skin cells, reduce swelling and pain. In case of late radiation damage (radiation ulcers), PDT is used to clean necrotic tissues and damaged cells - a method based on the joint use of a photosensitizer (methylene blue) applied to the surface of the skin followed by exposure to laser light with a wavelength of 630-660 nM, or a variant of combined photodynamic therapy using platelet-enriched plasma to increase the reparative properties of the method.

It is advisable to carry out repeated sessions of PDT until the cavity of the radiation ulcer is completely cleaned, and if necessary, it is possible to carry out auto transplantation with a flap with axial blood circulation.

The recommended scheme of photomagnetic therapy with the use of red photodiodes in patients with BC during adjuvant radiation treatment.

**Key words:** local radiation damage, photodynamic therapy, photomagnetic therapy, photodiodes, breast cancer, connective tissue.