

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА  
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Биченко Катерина Олексіївна**

УДК 57.042.083:616.002

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**«ОЦІНКА ІМУНОЛОГІЧНИХ МЕХАНІЗМІВ ПІСЛЯ ДІЇ**  
**КОМПЛЕКСНИХ ЕКЗОГЕННИХ ФАКТОРІВ**  
**(ФОТООПРОМІНЮВАННЯ, ЕКЗОСОМ, НАНОЧАСТИНОК) НА**  
**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ ЗАПАЛЕННЯ»**

Спеціальність 091 – «Біологія»  
(Галузь знань 09 – Біологія)

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ К. О. Биченко

Науковий керівник: Клімова Олена Михайлівна, доктор біологічних наук,  
професор

Харків – 2023

## АНОТАЦІЯ

**Биченко К. О. Оцінка імунологічних механізмів після дії комплексних екзогенних факторів (фотоопромінювання, екзосом, наночастинок) на експериментальній моделі запалення.** – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії за спеціальністю 091 – Біологія (Галузь знань 09 – Біологія). – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна Міністерства освіти і науки України, Харків, 2023.

Дисертацію присвячено дослідженню механізмів впливу фізичних та біологічних факторів на імунорезистентність в умовах індукції експериментального запалення та оцінки ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних розмірів та різної концентрації в якості хімічного фактору для комплексного застосування при запальній реакції.

Біологічні процеси у живих організмах пов'язані з перенесенням і перетворенням енергії, первинним джерелом якої є сонячне світло. Механізми впливу фотоопромінювання на біооб'єкти пов'язані з дією молекул, зміною їхньої конформації та фізіологічною активністю. Найбільш важливим для всіх живих об'єктів є утворення органічних речовин у процесі фотосинтезу, коли відбувається перетворення сонячного світла на енергію хімічних зв'язків. Світло сприяє активації мікроциркуляції у клітині та впливає на метаболічні шляхи. Дія світла на живі об'єкти використовується у практиці давно, хоча досі не сформовано єдиної думки щодо механізмів світлового впливу на біооб'єкти.

Існує проблема корекції імунометаболічних показників при хронічних запальних реакціях. Відповідно до теорії запалення І. І. Мечникова (1892 р.) запалення є системним захисним процесом, який розвивається на всіх рівнях організації організму. Має фундаментальний та практичний інтерес з'ясування того, як екзогенні фактори (фізичні, хімічні, біологічні)

впливають на запальний процес. Для вирішення цієї проблеми використовують багато різних підходів, існує практика використання різних факторів – фізичних, біологічних та хімічних, які впливають на перебіг запального процесу. В якості фізичних факторів застосовують фотоопромінювання різними довжинами хвиль видимого діапазону спектру, але залишаються питання щодо механізмів та рівня ефективності такого способу при локальних та системних запальних процесах, оскільки ефекти світлового випромінювання залежать від довжини хвилі, частоти впливу, експозиції, потужності та щільності енергії. Для корекції імунометаболічних порушень також застосовують стовбурові клітини та їх метаболіти, в тому числі для корекції важких метаболічних дисфункцій – локальних та системних запальних реакцій. В той же час мало досліджень, присвячених вивченню впливу екзосом (в якості біологічного фактору), які містять екзометаболіти стовбурових клітин різного походження, фактори росту та інші фактори мікрооточення на хронічне мляве запалення. Крім світлового впливу, стовбурових клітин також застосовують різні наночастинки для підтримки редокс-системи клітин і мікроциркуляції. Наночастинки різного походження (наприклад, графітові та інші) можуть виконувати транспортну функцію, тобто володіють здатністю проникати крізь біомембрани та змінювати функції біомолекул. В цьому аспекті діоксид церію володіє цілим рядом позитивних впливів на метаболізм систем організму. Однак, через суперечливі відомості про цитотоксичність наночастинок, їх застосування супроводжується постійною дискусією про можливі механізми їхньої дії на динаміку локальних та системних запальних процесів та біологічну безпеку, а також не визначено допустимі дози та оптимальні розміри, які б не мали високого ступеня цитотоксичності.

Тому метою роботи було вивчення механізмів біологічних ефектів та дії різних довжин хвиль фотоопромінювання на стадії запального процесу, екзосом мезенхімальних стовбурових клітин на стимуляцію проліферативного потенціалу імунокомпетентних клітин в культурі *in vitro* та

визначення ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних характеристик за допомогою біоіндикатора *D. viridis*.

Задачами роботи було:

1. Вивчення біологічних ефектів та механізмів фотоопромінювання різних довжин хвиль ( $\lambda = 660$  нм,  $\lambda = 530$  нм,  $\lambda = 470$  нм) на різних стадіях запального процесу.

2. Оцінка потенційної можливості екзосом, що містять екзометаболіти мезенхімальних стовбурових клітин, стимулювати проліферативний потенціал імунокомпетентних клітин пацієнтів із хронічним запаленням.

3. Визначення ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних розмірів та концентрацій за допомогою біоіндикатора *D. viridis* з метою їхнього практичного застосування.

4. Оцінка імунокоригуючих ефектів світлової дії різних довжин хвиль ( $\lambda = 660$  нм,  $\lambda = 530$  нм,  $\lambda = 470$  нм) у пацієнтів з хронічним запальним процесом на тлі цукрового діабету II типу.

У роботі використовували три експериментальні моделі.

Модель I – моделювання тривалого запального процесу на тваринах. Дану модель використовували для оцінки ефектів фотоопромінювання тварин різними довжинами хвиль (660 нм, 530 нм, 470 нм) на всіх етапах запального процесу (інфільтрації, альтерації, ексудації та регенерації, проліферації). Було проведено багатоетапний експеримент на великому масиві лабораторних тварин (щури-самці породи Вістар), які були розділені на 5 груп. Група 1 (контроль) – інтактні тварини ( $n = 32$ ). У тварин груп 2-5 було індуковано експериментальний перитоніт з метою моделювання чотирьох етапів запальної реакції. Індукцію запального процесу у тварин груп 2-5 здійснювали шляхом внутрішньочеревинного введення ліпополісахариду (ЛПС) з розрахунку 1 мкг/100 г маси тіла на 1 мл ізотонічного розчину (0,9 % NaCl). Тварин групи 2 з індукованим запаленням використовували як групу порівняння ( $n = 32$ ). Тварин груп 3, 4, 5 (в кожній групі  $n = 32$ ) піддавали щоденному фотоопромінюванню шляхом впливу

фотонними (світлодіодними) матрицями Коробова А. – Коробова В. «Барва-Флекс/24ФМ» на черевну стінку в один і той же час доби – вранці, до годування; час експозиції становив 10 хв. Тварин групи 3 опромінювали червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм); тварин групи 4 – зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм), тварин групи 5 – синім світлом ( $\lambda = 470$  нм). У роботі було проведено оцінку змін імунних маркерів до і після фотоопромінювання різними довжинами хвиль кожного етапу запального процесу: 1-й етап – альтерація; 2-й етап – ексудація та інфільтрація; 3-й – регенерація; 4-й – завершення запального процесу. На цьому етапі вивчали активність нейтрофілів в кисень-незалежному і кисень-залежному фагоцитозі та ступінь лімфоцитотоксичності (за Терасаки) методом світлової мікроскопії. Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦК), які являють собою комплекс антиген – антитіло – комплемент, оцінювали спектрофотометрично.

Модель II – оцінка проліферативної активності – використовували для оцінки можливої активуючої дії екзосом стовбурових клітин на проліферативну активність лейкоцитів периферичної крові *in vitro* для обґрунтування адресного застосування екзосом з метаболітами прогенераторних стовбурових клітин. Проліферативну активність лейкоцитів визначали методом світлової мікроскопії у культурах *in vitro* трьох варіантів: «А» – контрольна культура; «В» – культура з додавання мітогену фітогемагглютиніну; «С» – культура з додаванням екзосом з екзометаболітами мезенхімальних стовбурових клітин.

Модель III – оцінка цитотоксичної активності наночастинок діоксиду церію різної концентрації та різних розмірів (2 нм – 0,1 М; 3-4 нм – 0,2 М; 6 нм – 0,1 М) з використанням клітинного біоіндикатора *D. viridis*. За дії негативних факторів різного ступеня цитотоксичності визначали морфофункціональні порушення клітин тест-системи: зміна форми клітин, накопичення включень, втрата джгутика, зміна характеру та напрямку руху, утворення агрегатів, виділення екзометаболітів. Підрахунок змінених клітин проводили методом світлової мікроскопії. Визначали інтегральні показники

цитотоксичності: коефіцієнт спонтанної цитотоксичності  $K_{сп}$  (для контрольної культури) та коефіцієнт індукованої цитотоксичності  $K_{ц}$  (для досліджуваних зразків).

На моделі ЛПС-індукованого перитоніту вивчали імунорезистентність на стадіях тривалого запального процесу після дії різних довжин хвиль ( $\lambda = 660$  нм, 530 нм, 470 нм). Активація вродженого імунітету була виявлена на першому етапі запалення (інфільтрації) після дії червоного світла ( $\lambda = 660$  нм): у експериментальних тварин з індукованою запальною реакцією показники були вищими, ніж у тварин групи порівняння із запаленням без фотовпливу. Зелене світло ( $\lambda = 530$  нм) призводило до нормалізації показників клітинного імунітету та зниження показників гуморального імунітету на другому етапі запалення (регенерації). Синє світло ( $\lambda = 470$  нм) сприяло зниженню досліджуваних показників імунітету на третьому етапі запалення (проліферації). У кожній групі тварин після впливу певної довжини хвилі терміни етапів запалення скоротилися відносно групи порівняння (тварини з ЛПС-індукованим перитонітом без фотовпливу).

Виявлено, виражену стимулюючу дію екзосом стовбурових клітин на проліферативну активність порівняно з мітогеном ФГА в культурі лейкоцитів пацієнтів із хронічними запальними процесами. Застосування екзометаболітів стовбурових клітин у вигляді екзосом (як біологічний фактор) для транспортування активних клітинних компонентів може бути ефективним засобом для корекції імунометаболічних порушень та стимуляції регенеративних процесів.

Як хімічний фактор застосовували наночастинки, які є активаторами міграції адаптерних пептидів і володіють цілим рядом позитивних впливів на метаболізм систем організму. Вивчали потенційну цитотоксичність наночастинок (як хімічний фактор) діоксиду церію різного розміру та концентрації. Після внесення до тест-системи *D. viridis* наночастинок діоксиду церію малого розміру (2 нм у концентрації 0,1 М) відзначали незначні уповільнення руху деяких клітин мікроводорості. Кількість клітин зі

зміненою морфологією була на рівні контролю. Клітини *D. viridis* не утворювала агрегати за дії наночастинок 0,1 М діоксиду церію розміром 2 нм. Коефіцієнт цитотоксичності Кц не відрізнявся від контролю. Після інкубації тест-системи *D. viridis* з діоксидом церію в концентрації 0,1 М розміром 6 нм усі клітини тест-системи набували деформованої округлої форми, втрачали джгутики та утворювали великі за розміром скупчення клітин (макроагрегати). Коефіцієнт цитотоксичності в цьому випадку був багаторазово підвищений відносно контролю. Тобто, після інкубації тест-системи *D. viridis* з діоксидом церію максимального розміру 6 нм в концентрації 0,1 М спостерігали виражені цитотоксичні ефекти. Тобто, дослідження щодо цитотоксичності наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками із застосуванням клітинного біоіндикатора *D. viridis* дозволило виявити оптимальну концентрацію та розміри наночастинок (2 нм, 0,01 М), які не проявляли цитотоксичної дії.

Таким чином, в роботі вперше показано, що фотовплив різними довжинами хвиль приводив до різних ефектів на етапи запалення: від активації до інгібування показників вродженого імунітету на певних етапах запалення, що призводило, у свою чергу, до скорочення термінів завершення запального процесу. Після опромінювання червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм) виявили активацію фагоцитозу (на 30 %), посилення гуморальних реакцій (збільшення ступеню лімфоцитотоксичності та концентрації циркулюючих імунних комплексів на 50 %), що супроводжувалось скороченням першої стадії запального процесу порівняно з контролем (ЛПС-індукований перитоніт без світлового впливу) на 9 діб. Зелене світло ( $\lambda = 530$  нм) сприяло збільшенню (на 20 %) поглинальної здатності нейтрофілів, зниженню рівня циркулюючих імунних комплексів (на 40 %) та лімфоцитотоксичності (у 2 рази), що характеризувало закінчення альтерації та стимуляцію регенерації на другому етапі запальної реакції. Після впливу зеленого світла тривалість запального процесу скорочувалась на 6 діб за рахунок фази ексудації у період розлитого перитоніту. Синє світло ( $\lambda = 470$  нм) на тлі ЛПС-індукованого

перитоніту оказувало найменший ефект на досліджувані імунологічні параметри на ранніх етапах запалення. А на завершальній стадії запального процесу виявили достовірне зниження показників фагоцитозу нейтрофілів – хемотаксис, адгезія і поглинальна здатність були нижчими, ніж групі порівняння (ЛПС-індукований перитоніт без світлової дії). Виявили зниження у 3 рази ступеню лімфоцитотоксичності, вміст циркулюючих імунних комплексів становив  $(70,5 \pm 9,9)$  од. Е і був на рівні інтактних тварин  $(69,2 \pm 6,8)$  од. Е. Застосування синього світла ( $\lambda = 470$  нм) сприяло скороченню завершального етапу запального процесу на тлі поліпшення мікроциркуляції за рахунок дилатації судин під впливом імуотропного ефекту даної довжини хвилі та призводило до скорочення тривалості запального процесу на 5 діб.

Встановлено стимулюючий ефект екзосом, що містять екзометаболіти мезенхімальних стовбурових клітин, який проявлявся в збільшенні проліферативної активності *in vitro* у культурі клітин пацієнтів із хронічним запаленням. Тобто, екзосоми проявляли антагоністичну дію проти інгібіторів проліферативного потенціалу лімфоцитів пацієнтів, які мали довготривалий запальний процес.

Доведено, що наночастинки діоксиду церію малого розміру (2 нм) в концентрації 0,1 М не проявляли цитотоксичної дії, про що свідчив нормальний рівень коефіцієнту цитотоксичності (Кц) відносно контролю. А після інкубації клітин *D. viridis* з діоксидом церію максимального розміру (6 нм) тієї ж концентрації (0,1 М) спостерігали виражені цитотоксичні ефекти відносно клітин біоіндикатору. Через наявність вираженої різниці рівня цитотоксичності наночастинок з різними розмірами і концентрацією, їх використання, як антиоксидантів і стимуляторів мікроциркуляції потребує попередньої оцінки з урахуванням відповідних характеристик.

Практичне значення отриманих результатів полягає у тому, що визначено особливості вибіркової дії різних довжин хвиль на модифікацію біомолекул, на чому можуть бути засновані різні ефекти на стадіях



запального процесу. Дослідження змін механізмів імунорезистентності після дії різних довжин хвиль видимого діапазону на етапи запального процесу сприяє розробці показань до їх застосування. Виявлена активація проліферації клітин у культурі після впливу екзосом стовбурових клітин може бути вивчена та використана як індуктор репарації при запаленні. Наночастинки діоксиду церію малих розмірів у низькій концентрації, які не проявляють цитотоксичності, можуть використовуватися у вигляді цитопротекторів, антиоксидантів та активаторів мікроциркуляції при запальному процесі.

Проведені дослідження дозволили: обґрунтувати імунологічні механізми біологічних ефектів після фотоопромінювання різними довжинами хвиль на етапи запалення; оцінити дію екзосом стовбурових клітин як активаторів проліферативного потенціалу в культурі клітин та з'ясувати ступінь цитотоксичності наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками для розробки показань до їх спільного застосування.

**Ключові слова:** модель запалення, вроджений імунітет, фотоопромінювання, етапи запалення, культура клітин, екзосоми, стовбурові клітини, проліферативна активність, наночастинки діоксиду церію, біоіндикатор *D. viridis*, цитотоксичність.

## ABSTRACT

**Bychenko K. O. The estimation of immunological mechanisms after the action of complex exogenous factors (photoirradiation, exosomes, nanoparticles) on the experimental inflammation model.** – Qualification scholarly paper: a manuscript.

Thesis submitted for obtaining the Doctor of Philosophy degree in Biological Sciences, Specialty 091 – Biology. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kharkiv, 2023.

The dissertation is devoted to the study of the physical and biological factors mechanisms on immunoresistance under conditions of experimental inflammation induction and assessment of the cytotoxicity degree of cerium dioxide nanoparticles of different sizes and concentrations as a chemical factor for complex application in inflammatory reactions.

Biological processes in living organisms are associated with the transfer and transformation of energy, the primary source of which is sunlight. The mechanisms of the photoirradiation effect on biological objects are related to the action of molecules, changes in their conformation, and physiological activity. The most important for all living things is the formation of organic substances in the process of photosynthesis, when sunlight is converted into the energy of chemical bonds. Light promotes the activation of microcirculation in the cell and affects metabolic pathways. The effect of light on living objects has been used in practice for a long time, although there is still no consensus on the mechanisms of light effects on biological objects.

There is a problem of immunometabolic indicators correction in the chronic inflammatory reactions. According to I. I. Mechnikov's theory of inflammation (1892), inflammation is a systemic protective process that develops at all levels of the body's organization. It is of fundamental and practical interest to find out how exogenous factors (physical, chemical, biological) affect the inflammatory process. To solve this problem, many different approaches are used; there is a practice of

using various factors – physical, biological and chemical, which affect the course of the inflammatory process. As physical factors, photoirradiation with different wavelengths of the visible range of the spectrum is used, but questions remain regarding the mechanisms and level of this method effectiveness in the treatment of local and systemic inflammatory processes, since the effects of light radiation depend on the wavelength, frequency of exposure, exposure, power and energy density. Stem cells and their metabolites are also used to correct immunometabolic disorders, including for the treatment of severe metabolic dysfunctions – local and systemic inflammatory reactions. At the same time, there are few studies devoted to the study of the influence of exosomes (as a biological factor), which contain exometabolites of stem cells of various origins, growth factors and other factors of the microenvironment on chronic indolent inflammation. In addition to photo-influence, stem cells also use various nanoparticles as a chemical factor to support the redox system of cells and microcirculation. Nanoparticles of various origins (for example, graphite and others) can perform a transport function, that is, they have the ability to penetrate through biomembranes and change the functions of biomolecules. In this aspect, cerium dioxide has a number of positive effects on the metabolism of body systems. However, due to conflicting information about the cytotoxicity of nanoparticles, their use is accompanied by a constant debate about the possible mechanisms of their action on the dynamics of local and systemic inflammatory processes and biological safety, as well as the permissible doses and optimal sizes that would not have a high degree of cytotoxicity have not been determined.

Therefore, the aim of the work was to study the biological effects mechanisms and different wavelengths action at the inflammatory process stages, exosomes of mesenchymal stem cells to stimulate the proliferative potential of immunocompetent cells in the *in vitro* culture, and to determine the cytotoxicity degree of cerium dioxide nanoparticles of various characteristics using the bioindicator *D. viridis*.

The tasks of the work were:

1. Study of biological effects and mechanisms of photoirradiation of different wavelengths ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 470 \text{ nm}$ ) at different stages of the inflammatory process.

2. Evaluation of the potential ability of exosomes containing exometabolites of mesenchymal stem cells to stimulate the proliferative potential of immunocompetent cells.

3. Determination of the cytotoxicity degree of cerium dioxide nanoparticles of different sizes and concentrations using the bioindicator *D. viridis* for the purpose of their practical application.

4. Evaluation of the immunocorrective effects of light exposure of different wavelengths ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 530 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 470 \text{ nm}$ ) in a chronic inflammatory process.

Three experimental models were used in the work.

Model I – simulation of a long-term inflammatory process in animals. This model was used to evaluate the photoirradiation effects in animals with different wavelengths (660 nm, 530 nm, 470 nm) at all stages of the inflammatory process (infiltration, alteration, exudation and regeneration, proliferation). A multistage experiment was conducted on a large array of laboratory animals (male Wistar rats), which were divided into 5 groups. Group 1 (control) – intact animals ( $n = 32$ ). Experimental peritonitis was induced in animals of groups 2-5 in order to simulate the four stages of the inflammatory reaction. Induction of the inflammatory process in animals of groups 2-5 was carried out by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) at the rate of  $1 \mu\text{g}/100 \text{ g}$  of body weight per 1 ml of isotonic solution (0.9% NaCl). Animals of group 2 with induced inflammation were used as a comparison group ( $n = 32$ ). Animals of groups 3, 4, 5 (in each group  $n = 32$ ) were subjected to daily photoirradiation by exposure to photonic (light emitting diode) matrices A. Korobov - V. Korobov "Barva-Flex/24FM" on the abdominal wall at the same time of the day – in the morning, before feeding; exposure time was 10 min. Animals of group 3 were irradiated with red light ( $\lambda = 660 \text{ nm}$ ); animals of group 4 – with green light ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ),

animals of group 5 – with blue light ( $\lambda = 470$  nm). In the work, a preliminary assessment of changes in immune markers before and after photoirradiation with different wavelengths of the inflammatory process each stage was carried out: 1st stage – alteration; 2nd stage – exudation and infiltration; 3rd – regeneration; 4th – completion of the inflammatory process. At this stage, the activity of neutrophils in oxygen-independent and oxygen-dependent phagocytosis and the degree of lymphocytotoxicity (according to Terasaki) were studied by light microscopy. The content of circulating immune complexes (CIC), which are an antigen-antibody-complement complex, was assessed by spectrophotometry.

Model II – assessment of proliferative activity – was used to assess the possible activating effect of stem cell exosomes on the proliferative activity of peripheral blood leukocytes *in vitro* to substantiate the targeted use of exosomes with metabolites of progenitor cells. The proliferative activity of leukocytes was determined by light microscopy in the *in vitro* cultures of three variants: "A" – control culture; "B" – culture with the addition of the mitogen phytohemagglutinin; "C" is a culture with the addition of exosomes with exometabolites of mesenchymal stem cells.

Model III – estimation of cytotoxic activity of cerium dioxide nanoparticles of different concentrations and sizes (2 nm – 0.1 M; 3-4 nm – 0.2 M; 6 nm – 0.1 M) using the cellular bioindicator *D. viridis*.

Under the action of negative factors of cytotoxicity varying degrees, morphological and functional disorders of the cells were determined: changes in the cells shape, accumulation of inclusions, loss of flagella, changes in the nature and direction of movement, formation of aggregates, release of exometabolites. Changed cells were counted by light microscopy. The integral indicators of cytotoxicity were determined: the coefficient of spontaneous cytotoxicity  $K_{sc}$  (for the control culture) and the coefficient of induced cytotoxicity  $K_c$  (for the studied samples).

On the model of LPS-induced peritonitis, immunoresistance was studied at the stages of the long-term inflammatory process after exposure to different

wavelengths ( $\lambda = 660$  nm, 530 nm, 470 nm). Activation of innate immunity was detected at the first stage of inflammation (infiltration) after exposure to red light ( $\lambda = 660$  nm): in experimental animals with an induced inflammatory reaction, the indicators were higher than in animals of the comparison group with inflammation without photo-exposure. Green light ( $\lambda = 530$  nm) led to the normalization of cellular immunity indicators and a decrease in humoral immunity indicators in the second stage of inflammation (regeneration). Blue light ( $\lambda = 470$  nm) contributed to the reduction of the immunity studied indicators at the third stage of inflammation (proliferation). In each group of animals, after exposure to a certain wavelength, the duration of the stages of inflammation was reduced relative to the comparison group (animals with LPS-induced peritonitis without photo-exposure).

A pronounced stimulating effect of stem cells on proliferative activity compared to the mitogen phytohemagglutinin in the culture of leukocytes from patients with chronic inflammatory processes was revealed. The use of stem cells and their exometabolites in the form of exosomes (as a biological factor) for the transport of active cellular components can be an effective means of correcting immunometabolic disorders and stimulating regenerative processes.

As a chemical factor, nanoparticles were used, which are activators of the adapter peptides migration and have a number of positive effects on the metabolism of body systems. The potential cytotoxicity of cerium dioxide nanoparticles (as a chemical factor) of various sizes and concentrations was studied. After the addition of small-sized cerium dioxide nanoparticles (2 nm at a concentration of 0.1 M) into the *D. viridis* test system, a slight slowdown in the movement of the microalgae some cells was noted. The number of cells with altered morphology was at the control level. *D. viridis* cells did not form aggregates under the action of 0.1 M cerium dioxide nanoparticles with a size of 2 nm. The cytotoxicity coefficient (Kc) did not differ from the control. After incubation of the *D. viridis* test system with cerium dioxide at a concentration of 0.1 M with a size of 6 nm, all the test system cells acquired a deformed rounded shape, lost flagella and formed large cells clusters (macroaggregates). The

coefficient of cytotoxicity in this case was increased several times compared to the control. That is, after incubation of the *D. viridis* test system with cerium dioxide of the maximum size of 6 nm in a concentration of 0.1 M, pronounced cytotoxic effects were observed. So, research of the cytotoxicity of cerium dioxide nanoparticles with different characteristics using the cellular bioindicator *D. viridis* allowed us to identify the optimal concentration and size of nanoparticles (2 nm, 0.01 M), which did not exhibit cytotoxic effects.

Thus, the work showed for the first time that photo-exposure with different wavelengths led to different effects on the inflammation stages: from activation to inhibition of innate immunity indicators at certain stages of inflammation, which, in turn, led to a reduction in the term of the inflammatory process completion. After irradiation with red light ( $\lambda = 660$  nm), activation of phagocytosis (by 30%), increased humoral reactions (an increase in the degree of lymphocytotoxicity and the concentration of circulating immune complexes by 50%), accompanied by a reduction in the first stage of the inflammatory process compared to the control (LPS-induced peritonitis without light exposure) for 9 days. Green light ( $\lambda = 530$  nm) contributed to an increase (by 20%) in the absorptive capacity of neutrophils, a decrease in the level of circulating immune complexes (by 40%) and lymphocytotoxicity (by 2 times), which characterized the end of alteration and stimulation of regeneration in the second stage of the inflammatory reaction. After exposure of green light, the duration of the inflammatory process was reduced by 6 days due to the exudation phase in the period of spilled peritonitis. Blue light ( $\lambda = 470$  nm) against the background of LPS-induced peritonitis had the least effect on the studied immunological parameters in the early stages of inflammation. And at the final stage of the inflammatory process, a significant decrease in the parameters of neutrophil phagocytosis was found – chemotaxis, adhesion and absorption capacity were lower than in the comparison group (LPS-induced peritonitis without light exposure). A 3-fold decrease in the degree of lymphocytotoxicity was found, the content of circulating immune complexes ( $70.5 \pm 9.9$ ) units E was at the level of intact animals ( $69.2 \pm 6.8$ ) units E. The use of blue light ( $\lambda = 470$  nm)

contributed to the shortening of the final stage of the inflammatory process against the background of the improvement of microcirculation due to the dilation of blood vessels under the influence of the immunotropic effect of this wavelength and led to a reduction in the duration of the inflammatory process by 5 days.

The stimulatory effect of exosomes containing exometabolites of mesenchymal stem cells were established, which was manifested in the increase of proliferative activity in the *in vitro* cell culture from patients with chronic inflammation. That is, exosomes showed an antagonistic effect against inhibitors of the lymphocytes proliferative potential of patients with the long-term inflammatory process.

It was proved that nanoparticles of cerium dioxide of small size (2 nm) in a concentration of 0.1 M did not show cytotoxic effect, which was evidenced by the normal level of the cytotoxicity coefficient (Kc) relative to the control. And after incubation of *D. viridis* cells with cerium dioxide of the maximum size (6 nm) of the same concentration (0.1 M), pronounced cytotoxic effects were observed against the bioindicator cells. Due to the pronounced difference in the level of cytotoxicity of nanoparticles with different sizes and concentrations, their use as antioxidants and microcirculation stimulators requires a preliminary assessment taking into account the relevant characteristics.

The practical significance of the obtained results lies in the fact that the features of the selective effect of different wavelengths on the modification of biomolecules have been determined, which can be the basis of various effects at the stages of the inflammatory process. The study of changes in the mechanisms of immunoresistance after the action of different wavelengths of the visible range on the stages of the inflammatory process contributes to the development of indications for their use. The detected activation of cell proliferation in culture after exposure to stem cells exosomes can be studied and used as an inducer of repair in inflammation. Cerium dioxide nanoparticles of small sizes in low concentration, which do not show cytotoxicity, can be used as cytoprotectors, antioxidants and activators of microcirculation of the inflammatory process.



The carried out research made it possible: to justify immunological mechanisms of biological effects after photoirradiation with different wavelengths at the stages of inflammation; to evaluate the effect of stem cells exosomes as activators of the proliferative potential in cell culture and to find out the cytotoxicity degree of cerium dioxide nanoparticles with different characteristics in order to develop indications for their joint use.

**Key words:** inflammation model, innate immunity, photoirradiation, stages of inflammation, cell culture, exosomes, stem cells, proliferative activity, cerium dioxide nanoparticles, *D. viridis* bioindicator, cytotoxicity.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

*Публікації у виданнях, включених до переліку фахових видань України з присвоєнням категорії «А» та проіндексованих у базі даних Scopus:*

1. Klimova E. M., Bozhkov A. I., Bychenko E. A., Lavinskaya E. V., Zholobak N. M., Korobov A. M. Characteristics of the response of the microalga (*Dunaliella viridis*) for cerium compounds in culture. *Biosystems Diversity*. 2019. Vol. 27(2). P. 142–147. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті).

*Публікації у виданнях, включених до переліку фахових видань України з присвоєнням категорії «Б»:*

2. Клімова О. М., Коробов А. М., Биченко К. О., Лавінська О. В., Кордон Т. І., Дроздова Л. А. Вплив низько інтенсивного випромінювання оптичного діапазону спектру на показники імунорезистентності у тварин з експериментальним перитонітом. *Вісник КНУ ім. Т. Шевченко. Серія «Біологія»*. 2020. № 3(82). С. 35–42. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті).

3. Клімова О. М., Биченко К. О. Дослідження на різних моделях біологічних ефектів компонентів комплексного впливу (фотоопромінювання; екзосоми мезенхімальних стовбурових клітин та наночастинки) для корекції запального процесу. *Вісник ОНУ ім. І. І. Мечникова. Серія «Біологія»*. 2023. Т. 28, № 1(52). С. 118–135. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, написання статті, підготовка статті до друку).

***Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:***

4. Klimova E., Korobov A., Bozhkov A., Lesnaya T., Lavinskaya E., Bichenko E., Agarkova A. Nonspecific resistance factors and humoral immunity indicators animals blood with experimental peritonitis after visible light irradiation  $\lambda=595$ . *Photodiagnosis and photodynamic therapy. Application of lasers in medicine and biology*, Helsinki, Finland, 24-29 August 2012. № 9(1). S27. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів).

5. Клімова О. М., Коробов А. М., Бойко В. В., Іванова Ю. В., Лавінська О. В., Биченко К. О., Понамарьов Г. В. Імунокоригуючий ефект фото динамічної терапії у пацієнтів з гнійно-септичними ускладненнями. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLIV міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 26-28 травня 2016. С. 146–148. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, підготовка доповіді).

6. Клімова О. М., Коробов А. М., Лавінська О. В., Іванова Ю. В., Биченко К. О. Вплив світлової дії та тромбоцитарного фактору росту на зміни функціонального стану імунокомпетентних клітин та показників гуморального імунітету. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVI міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 25-27 травня 2017. С. 95–96. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, підготовка матеріалів до друку, підготовка доповіді).

7. Клімова О. М., Коробов А. М., Лавінська О. В., Дроздова Л. А., Іванова Ю. В., Биченко К. О. Активація регенеративних процесів та нормалізація імунорезистентності у хворих з трофічними виразками після сумісного впливу світла та тромбоцитарного фактору росту. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVII міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 12-14 жовтня 2017. С. 41–42. (Особистий внесок здобувача: аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку, підготовка доповіді).

8. Іванова Ю., Мушенко Є., Клімова О., Коробов А., Кірієнко Д., Биченко К., Криворучко І. Лікування ран з використанням фото динамічної терапії та сучасних ранових покриттів. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVII міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 12-14 жовтня 2017. С. 48–49. (Особистий внесок здобувача: проведення досліджень, обробка результатів).

9. Клімова О. М., Іванова Ю. В., Коробов А. М., Лавінська О. В., Биченко К. О. Комплексне лікування гнійних ран кінцівок у хворих з цукровим діабетом з використанням світлового впливу, гемо поетичних стовбурових клітин та тромбоцитарного фактору росту. *Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю., м. Київ, 9-10 листопада 2017. С. 154–156. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку).

10. Клімова О. М., Биченко К. О. Вплив низько інтенсивного світлового впливу на процеси запальної реакції та регенерації у експериментальних тварин. *Modern Science, Practice* : Abstracts XVIII International Scientific and Practical Conference, Boston, USA, 2-6 May 2020. P. 307–309. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).

11. Клімова О., Биченко К., Лавінська О., Жолобак Н., Ільїна А., Коробов А. Реакція біоіндикатора *Dunaliella viridis* на вплив наночастинок і солей діоксида церію. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVIII міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 24-25 травня 2018. С. 140–143. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, підготовка доповіді).

12. Клімова О. М., Лавінська О. В., Биченко К. О., Коробов А. М., Іванова Ю. В. Фотодинамічна терапія активує кисеньзалежний фагоцитоз у хворих з трофічними виразками. *Application of lasers in medicine and biology*

and 2<sup>nd</sup> *Gamaleia's readings* : Materials XLIX international scientific and practical conference, Hajduszoboszlo, Hungary, 3-7 October 2018. P. 103–106. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів).

13. Klimova E. M., Korobov A. M., Bychenko E. A., Drozdova L. A., Lavinskaya E. V., Kordon T. I., Ivanova Yu. V. Mechanisms of immunocorrective action of complex treatment using photodynamic, cell and tissue therapy in patients with purulent wounds of the lower extremities. *IEEE 8<sup>th</sup> International Conference on Advanced Optoelectronic and lasers, CAOL 2019*. Conference Proceedings. Sozopol, Bulgaria, 06-08 September 2019. P. 107–112. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті).

14. Клімова О., Биченко К. Вивчення механізмів впливу низько інтенсивного світлового впливу (зелений ( $\lambda = 530$  нм, синій ( $\lambda = 440$  нм) на перебіг запальної реакції та імунорезистентність у експериментальних тварин з індукованим перитонітом. *Perspective directions for the development of science and practice* : Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference, Athens, Greece, 08-09 June 2020. С. 180–183. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).

15. Klimova O., Lavinska O., Bychenko E. Phagocytes barrier functions and complement system proteins in patients with lower limbs trophic ulcers before and after combined exposure. *Scientific achievements of modern society* : Materials XII International scientific and practical conference, Liverpool, United Kingdom, 22-24 July 2020. P. 17–22. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті).

16. Клімова О., Лавінська О., Биченко К. Визначення ступеню цитотоксичності наночастинок діоксиду церію за допомогою клітинної тест-системи. *World Science Problems, Prospects and innovation* : Materials V International scientific and practical conference, Toronto, 27-29 January 2021. С.

700–704. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті*).

17. Клімова О. М., Лавінська О. В., Биченко К. О., Жолобак Н. М. Оцінка цитотоксичних ефектів наночастинок діоксида церію на клітинній тест-системі. *Нанотехнології і наноматеріали у фармації та медицині* : матеріали V Всеукр. наук.-практ. інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 23 квітня 2021. С. 38. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, підготовка матеріалів до друку*).

18. Клімова О. М., Биченко К. О., Лавінська О. В., Мережко О. С., Лобинцева Г. С. Застосування фізичних та біотехнологічних методів для лікування хронічних трофічних ран у пацієнтів з вираженою антибіотикорезистентністю. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології* : матеріали міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 25 березня 2021. С. 186–187. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті*).

***Публікації, які додатково відображають наукові результати  
дисертації:***

19. Клімова О. М., Коробов А. М., Іванова Ю. В., Лавінська О. В., Биченко К. О. Зміна імунореактивності у пацієнтів з гнійно-септичними ранами нижніх кінцівок на тлі цукрового діабету другого типу після світлової дії. *Фотобіологія та фотомедицина*. 2017. № 1,2. С. 64–72. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті*).

20. Тимченко М. Є., Клімова О. М., Коробов А. М., Іванова Ю. В., Биченко К. О. Експериментальне обґрунтування використання електромагнітного випромінювання світлового діапазону та тканинних факторів росту у лікуванні неспроможності кишечних анастомозів. *Photobiol*

*Photomed.* 2019. № 26. С 73–80. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, написання статті).

21. Бойко В. В., Іванова Ю. В., Клімова О. М., Коробов А. М., Мушенко Є. В., Кірієнко Д. А., Лавінська О. В., Биченко К. О. Лікування ран у хворих з критичною ішемією нижніх кінцівок на тлі цукрового діабету. *Харківська хірургічна школа.* 2018. № 1(88). С. 41–46. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів).

22. Клімова О. М., Іванова Ю. В., Биченко К. О., Мережко О. С., Прасол В. О., Лобинцева Г. С. Механізми імунокоригуючої дії фотодинамічної терапії та екзосом мезенхімальних стовбурових клітин у хворих з хронічними ранами нижніх кінцівок різного генезу. *Харківська хірургічна школа.* 2021. № 4. С. 20–27. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, написання статті, підготовка матеріалів до друку).

23. Клімова О. М., Биченко К. О., Коробов А. М., Кордон Т. І., Лобинцева Г. С. Вплив фото опромінювання різними довжинами хвиль на етапи запалення та стимуляція проліферації екзосомами стовбурових клітин у експерименті. *Клінічна інформатика та телемедицина.* 2021. № 17. С. 100–117. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, розробка моделі та проведення дослідження, обробка результатів, написання статті, підготовка статті до друку).

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	27
ВСТУП.....	28
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	35
1.1 Метаболічні та імунологічні зміни при розвитку запального процесу	35
1.2 Біологічні ефекти світлового впливу.....	38
1.3 Біологічні властивості екзосом стовбурових клітин.....	48
1.4 Біологічна активність наночастинок діоксиду церію.....	55
Висновки до розділу 1.....	60
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	62
2.1 Дизайн експериментального дослідження.....	62
2.2 Характеристика зразків церію для визначення ступеню цитотоксичності.....	65
2.3 Характеристика суспензії екзосом стовбурових клітин .....	66
2.4 Практичне застосування методів корекції запального процесу .....	67
2.5 Фагоцитарна активність нейтрофілів в кисненезалежному фагоцитозі.....	66
2.6 Фагоцитарна активність нейтрофілів в кисненезалежному фагоцитозі	69
2.7 Виділення лімфоцитів з гепаринізованої крові.....	70
2.8 Визначення ступеня лімфоцитотоксичності.....	70
2.9 Визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів.....	70
2.10 Визначення проліферативної активності лейкоцитів в культурі <i>in</i> <i>vitro</i> .....	72
2.11 Метод визначення цитотоксичності за допомогою біоіндикатору <i>Dunaliella viridis</i> .....	72
2.12 Статистична обробка результатів дослідження.....	74
Висновки до розділу 2.....	74
РОЗДІЛ 3 РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	75



3.1 Ефекти після світлового впливу різних довжин хвиль на процеси запальної реакції та регенерації у експериментальних тварин.....	75
3.1.1 Зміни фізіологічних параметрів у експериментальних тварин на тлі ЛПС-індукованого перитоніту (експериментальна модель I).....	75
3.1.2 Бар'єрна функція фагоцитів у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель I) протягом запальної реакції після світлового впливу червоного діапазону спектру ( $\lambda = 660$ нм).....	78
3.1.3 Гуморальні показники у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель I) протягом запальної реакції після світлового впливу червоного діапазону спектру ( $\lambda = 660$ нм).....	86
3.1.4 Бар'єрна функція фагоцитів у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель I) протягом запальної реакції після світлового впливу зеленого діапазону спектру ( $\lambda = 530$ нм).....	90
3.1.5 Гуморальні показники у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель I) протягом запальної реакції після світлового впливу зеленого діапазону спектру ( $\lambda = 530$ нм).....	95
3.1.6 Проліферативний потенціал лейкоцитів (від пацієнтів з довготривалим запальним процесом) в культурі <i>in vitro</i> (експериментальна модель II).....	98
3.1.7 Бар'єрна функція фагоцитів у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель I) протягом запальної реакції після світлового впливу синього діапазону спектру ( $\lambda = 470$ нм).....	99
3.1.8 Гуморальні показники у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель I) протягом запальної реакції після світлового впливу синього діапазону спектру ( $\lambda = 470$ нм).....	106
3.1.9 Дослідження цитотоксичності наночастинок церію з використанням клітинного біоіндикатору <i>D. viridis</i> (експериментальна модель III).....	108
3.2 Показники імунореактивності після комбінованої світлової дії при	117

довготривалому запальному процесі .....	
3.2.1 Активність нейтрофілів в кисненезалежному та киснезалежному фагоцитозу після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі.....	118
3.2.2 Показники гуморального імунітету після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі.....	123
Висновки до розділу 3.....	128
РОЗДІЛ 4 ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	130
Висновки до розділу 4.....	145
ВИСНОВКИ.....	147
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	149
ДОДАТОК А СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	173

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

DAMP – damage-associated molecular pattern

PAMP – pathogen-associated molecular pattern

АФК – активні форми кисню

ІЗФ – індекс завершеності фагоцитозу

ІІ – інтерлейкін

ІС – індекс стимуляції

ЛПС – ліпополісахарид

ЛЦТ – лімфоцитотоксичність

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

НСТ – нітросиній тетразолій

НЧ – наночастинки

ПЕГ – поліетиленгліколь

СК – стовбурові клітини

СП – спонтанний тест

СТ – стимульований тест

ФІ – фагоцитарний індекс

ФЧ – фагоцитарне число

ЦК – циркулюючі імунні комплекси

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** В останні роки набула зростання проблема пошуку методів впливу на довготривале хронічне запалення. Корекція хронічного довготривалого запалення різного генезу є складною проблемою навіть при застосуванні сучасних медикаментозних препаратів [1]. Хронічний запальний процес може розвиватися через тривалу ішемію тканин в результаті атеросклерозу і на тлі деяких захворювань (наприклад, цукрового діабету II типу) [2, 3].

Корекція довготривалих запальних реакцій представляє одну із складних проблем біології та медицини, для вирішення якої на практиці використовують різні підходи. Подолання ускладнень хронічного запалення може бути вирішена за допомогою розроблення нових або вдосконалення існуючих комплексних підходів, таких як: створення вакцин і біологічних композитних препаратів, що забезпечують активний імунітет проти інфекцій, які викликаються конкретним інфекційним агентом; адресна імунокорекція з використанням клітинної терапії і факторів росту; а також застосування фізичних методів у комплексі з біологічними та хімічними факторами [4, 5].

У якості фізичних методів впливу на запальний процес застосовують фотоопромінювання різного діапазону спектру, і багатьма авторами доведено позитивний ефект впливу фотоопромінювання на метаболічні порушення при запальних процесах [6-8]. Проте немає єдиної думки про механізми і рівень ефективності фотоопромінювання при корекції локальних та системних запальних процесів різними довжинами хвиль видимого діапазону, оскільки ефекти світлового випромінювання залежать від довжини хвилі, частоти впливу, експозиції, потужності та щільності енергії [9]. Тому питання вивчення і уточнення механізмів впливу різних довжин хвиль видимого діапазону спектру на запальні процеси залишаються актуальними, а їх практичне впровадження в подальшому не викликає сумнівів.

У якості біологічних методів впливу на запальний процес широкого розповсюдження набуло використання стовбурових гемопоетичних клітин і факторів росту, які виступають в ролі модуляторів корекції гомеостазу через їх високу активність і залучення до багатьох біологічних процесів на клітинному рівні [10, 11].

Широкого розповсюдження в останні роки набуває застосування наночастинок різної природи, насамперед через транспортну функцію. Відомо, що багатоетапний запальний процес в осередку ураження складається з тісно пов'язаних між собою послідовних етапів: інфільтрації, альтерації та ексудації, регенерації та завершення запального процесу. Кожен етап характеризується появою різних комплексів імунних маркерів, і відповідно різним типом імунної відповіді [12]. Необхідним є визначення характеристик для оптимального використання наночастинок, які володіють антиоксидантними властивостями, для активації мікроциркуляції та клітинної міграції, що буде коригувати (активувати або інгібувати певні клітинні процеси) окремі стадії запальної реакції [13, 14].

З'ясування механізмів впливу різних факторів у комплексі на імунореактивність та імунорезистентність, які є складовими регуляторної системи організму, в умовах запального процесу безсумнівно представляє науковий інтерес.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана в рамках науково-дослідних робіт Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна «Розробка біосумісних імплантатів кісткової тканини і шкіри та використання електромагнітного випромінювання оптичного діапазону спектра для оптимізації процесів регенерації» (№ держреєстрації 0116U000816), «Розробка мобільних фототерапевтичних апаратів для профілактики та лікування синдрому діабетичної стопи» (№ держреєстрації 0118U0002029) та ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В.Т. Зайцева НАМН України «Вивчити молекулярні механізми перебігу ранового процесу з

огляду на процеси п'єзобіосинтезу та розробити нові методи лікування ран з використанням комбінованих покривних матеріалів» (№ держреєстрації 0118U000015).

**Мета і завдання дослідження.**

**Мета роботи** – вивчення біологічних ефектів та механізмів дії різних довжин хвиль фотоопромінювання на стадії запального процесу, екзосом мезенхімальних стовбурових клітин на стимуляцію проліферативного потенціалу імунокомпетентних клітин в культурі *in vitro* та визначення ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних характеристик за допомогою біоіндикатора *D. viridis*.

Досягнення мети передбачає виконання таких **завдань**:

1. Вивчення біологічних ефектів та механізмів фотоопромінювання різних довжин хвиль ( $\lambda = 660$  нм,  $\lambda = 530$  нм,  $\lambda = 470$  нм) на різних стадіях запального процесу.

2. Оцінка потенційної можливості екзосом, що містять екзометаболіти мезенхімальних стовбурових клітин, стимулювати проліферативний потенціал імунокомпетентних клітин пацієнтів із хронічним запаленням.

3. Визначення ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних розмірів та концентрацій за допомогою біоіндикатора *D. viridis* з метою їхнього практичного застосування.

4. Оцінка імунокоригуючих ефектів світлової дії різних довжин хвиль ( $\lambda = 660$  нм,  $\lambda = 530$  нм,  $\lambda = 470$  нм) у пацієнтів з хронічним запальним процесом на тлі цукрового діабету II типу.

**Об'єктом дослідження** були вроджені фактори імунорезистентності кисне незалежного та кисне незалежного фагоцитозу, лімфоцитотоксичності та інтенсивності утворення циркулюючих імунних комплексів після фотовпливу на моделі тварин з експериментальним перитонітом; оцінка проліферативного потенціалу в культурі лейкоцитів периферичної крові з використанням екзосом з метаболітами мезенхімальних стовбурових клітин;

ступінь цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних концентрацій і розмірів на моделі клітинної тест-системи *D. viridis*.

**Предметом дослідження** є вплив низькоінтенсивного світлового опромінювання різними довжинами хвиль, екзосом з метаболітами мезенхімальних стовбурових клітин на зміни імунофізіологічних показників, а також оцінка біодоступності та цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних розмірів та різної концентрації.

**Методи досліджень:** фізіологічний (визначення динаміки маси тіла та температури, оцінка рухової активності та апетиту); світлова мікроскопія (визначення активності нейтрофілів периферичної крові в кисень-незалежному та кисень-залежному фагоцитозі, ступеню лімфоцитотоксичності, проліферативної активності лімфоцитів в культурі *in vitro*, цитотоксичності з використанням біоіндикатора *D. viridis*); спектрофотометрія (визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові); статистичні методи оцінки результатів.

#### **Наукова новизна отриманих результатів.**

У роботі виявлено позитивну динаміку змін показників фагоцитозу та гуморальних факторів імунітету після впливів фізичних, біологічних та хімічних факторів. Як фізичні методи використовували фотовплив різного діапазону видимого спектру ( $\lambda = 660$  нм, 530 нм, 470 нм).

Вперше встановлено, що вплив червоного світла ( $\lambda = 660$  нм) посилює функції хемотаксису та адгезії нейтрофілів у кисненезалежному фагоцитозі, збільшується їх бактеріальна активність, пов'язана з утворенням активних форм кисню (АФК), активуються гуморальні реакції, що призводить до скорочення першої стадії запалення на 9 діб. Вплив зеленого світла ( $\lambda = 530$  нм) посилює поглинальну здатність фагоцитів, що призводить до ефективної елімінації циркулюючих імунних комплексів і сприяє регенеративним процесам та скороченню другої стадії запального процесу на 6 діб. На стадії проліферації найбільший позитивний ефект має синє світло ( $\lambda = 470$  нм), яке достовірно інгібує маркери запальної реакції: зайву фагоцитарну активність

та нормалізує рівень гуморальних факторів (ступінь лімфоцитотоксичності та концентрація циркулюючих імунних комплексів), сприяє скороченню закінчення запалення на 5 діб.

Виявлено позитивний ефект низькоінтенсивного світлового впливу різних довжин хвиль, екзосом з метаболітами прогенераторних стовбурових клітин та аплікацій наночастинок діоксиду церію на різних стадіях запального процесу, про що свідчили зміни імунофізіологічних показників.

Запропоновано алгоритм комбінованого методу застосування фізичних, біологічних та хімічних чинників для практичного використання під час корекції стадій запальної реакції, які сприяють поліпшенню мікроциркуляції, підвищенню біоенергетичного потенціалу та активності клітинних мембран при хронічному запальному процесі.

#### **Практичне значення отриманих результатів.**

Проведені дослідження дозволили: обґрунтувати деякі механізми після фотоопромінювання різними довжинами хвиль на етапи запалення; оцінити дію екзосом стовбурових клітин як активаторів проліферативного потенціалу в культурі клітин та з'ясувати ступінь цитотоксичності наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками для розробки показань до їх спільного застосування.

Результати дисертаційної роботи дозволили визначити особливості вибіркової дії різних довжин хвиль на модифікацію біомолекул на різних стадіях запального процесу. Дослідження змін механізмів імунорезистентності після дії різних довжин хвиль видимого діапазону на етапи запального процесу сприяє розробці показань до їх застосування. Виявлена активація проліферації клітин у культурі після впливу екзосом стовбурових клітин може бути використана як індуктор репарації при запаленні. Наночастинки діоксиду церію малих розмірів у низькій концентрації, які не проявляють цитотоксичності, можуть використовуватися у вигляді цитопротекторів, антиоксидантів та активаторів мікроциркуляції на стадії альтерації запального процесу.



### **Особистий внесок здобувача.**

Дисертантом самостійно проведено пошук та аналіз наукової літератури, виконано основну частину експериментальної роботи та здійснено статистичну обробку отриманих результатів. Планування експериментальних досліджень, аналіз та обговорення отриманих даних, підготовка рукописів статей проводилося спільно з науковим керівником професором, д.б.н. Клімовою О.М.

### **Апробація результатів дисертації.**

Основні положення і результати роботи доповідалися на науково-практичних конференціях: Photodiagnosis and photodynamic therapy. Application of lasers in medicine and biology (24-29 August 2012, Helsinki, Finland.); XLIV Міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології» (26-28 травня 2016, Харків); XLVI Міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології» (25–27 травня 2017, Харків); XLVII Міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології» (12-14 жовтня 2017, Київ); науково-практична конференція з міжнародною участю «Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині» (9-10 листопада 2017, Київ); XVIII International Scientific and Practical Conference «Modern Science, Practice» (2 –6 May 2020, Boston, USA); XLVIII Міжнародна науково-практична конференція «Застосування лазерів у медицині та біології» (24-25 травня 2018, Харків); XLIX international scientific and practical conference «Application of lasers in medicine and biology and 2nd Gamaleia's readings» (3-7 october 2018, Hajduszoboszlo, Hungary); IEEE 8th International Conference on Advanced Optoelectronic and lasers, CAOL-2019 (06–08 September 2019, Sozopol, Bulgaria); XX International Scientific and practical conference «Perspective directions for the development of science and practice» (08-09 June 2020, Athens, Greece); XII International scientific and practical conference «Scientific achievements of modern society» (22–24 June 2020, Liverpool, United Kingdom); V International scientific and practical

conference «World Science Problems, Prospects and innovation» (27-29 January 2021, Toronto); V Всеукраїнська науково-практична інтернет-конференція з міжнародною участю «Нанотехнології і наноматеріали у фармації та медицині» (23 квітня 2021, Харків); I Міжнародна науково-практична інтернет-конференція «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (25 березня 2021, Харків).

### **Публікації.**

За матеріалами дисертаційної роботи було опубліковано 23 наукових праці, з них 5 статей у фахових виданнях, 1 – у журналі, індексованому в наукометричній базі Scopus, 15 тез доповідей та 2 публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації.

### **Структура та обсяг роботи.**

Дисертація складається з анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, обговорення результатів дослідження, висновків та списку цитованої літератури. Дисертацію викладено на 178 сторінках машинного тексту, вона містить 45 рисунків та 6 таблиць, 215 пунктів цитованої літератури.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Корекція уповільненого запального процесу до теперішнього часу представляє одну зі складних проблем в медицині, і вимагає застосування великої кількості лікарських засобів протягом тривалого часу. Ведеться пошук нових підходів до впливу на гострі та хронічні запальні реакції.

#### **1.1 Метаболічні та імунологічні зміни при розвитку запального процесу**

Відповідно до теорії запалення І. І. Мечникова (1892 р.) головну захисну роль при запальному процесі грає бар'єрна функція фагоцитів. Запалення розглядається як системний захисний процес, а не локальна руйнівна реакція, яка розвивається на всіх рівнях організації організму: клітинному (фагоцитоз), системному (іmunна система), на рівні організму (еволюція запалення в онто- і філогенезі). І сьогодні запальна реакція як системна, так і локальна розглядається іmunною системою саме в цьому аспекті. Порушення фагоцитарних функцій призводить до ослаблення системи захисних механізмів; фіброзні зміни в зоні запальної реакції асоціюються з дефектом киснезалежної біоцидності фагоцитів. Нейтрофіли, які мають потужний цитотоксичний потенціал, виняткову реактивність і високу мобілізаційну готовність, виступають у першій лінії ефektorних механізмів іmunологічного гомеостазу [30].

Запалення як місцеве, так і системне – захисна реакція організму і важливим є визначення специфічних мішеней і механізмів. Виникнення та перебіг запальної реакції варіабельне і залежить як від зовнішніх факторів, так і від індивідуальної реактивності та резистентності. Залучення у процес запалення багатьох типів клітин, субклітинних елементів та органних систем

зумовлює формування складних механізмів регуляції запальної та імунної реактивності [15].

У морфологічному відношенні запалення – комплексна місцева захисно-приспосувальна судинно-мезенхімальна реакція організму на пошкодження тканини різними патогенними факторами [16]. Біологічна роль запалення полягає в концентрації фагоцитів в зоні пошкодження, в знищенні мікробного антигену, а також у відновленні структури і функції пошкодженої тканини. Запальна реакція підрозділяється на пов'язані між собою послідовні фази альтерації, ексудації і проліферації [17]. Інтенсивність розвитку різних фаз запалення певною мірою залежить від реактивності організму та його локалізації. У разі нормальної реактивності організму запальна реакція характеризується адекватністю інтенсивності розвитку запалення [18, 19].

На першій стадії – альтерації, яка характеризується пошкодженням структури клітин, тканин, органів, і яка супроводжується порушенням їх функції, відбуваються масивні некротичні і атрофічні зміни. Альтерація, в свою чергу, підрозділяється на первинну і вторинну. Первинна альтерація обумовлена безпосередньою дією шкідливого чинника на тканину зі зміною в ній обміну речовин, структури і функції. Вторинна альтерація виникає в результаті впливу продуктів розпаду клітин і тканин після первинної альтерації, супроводжується порушенням кровообігу і зміною імунних реакцій [1]. Під час вторинної альтерації відбувається порушення обміну речовин, з переважанням катаболічних процесів, розпадом білково-вуглеводних, білково-жирових і білково-мінеральних комплексів, накопиченням біологічно активних сполук і продуктів розпаду з підвищенням осмотичного тиску і розвитком ацидозу. Виділяються медіатори: клітинні (базофільні і нейтрофільні, тромбоцитарні) і плазмові, які грають роль пускового механізму запалення; велику роль також відіграють продукти розпаду нуклеїнових кислот, лізосомні ферменти та інші біологічно активні сполуки клітин [20]. Механізми, що призводять до морфологічних

змін, полягають в порушенні процесів енергетичного забезпечення пластичних процесів, дисбалансі іонів рідини, в ушкодженні клітинних мембран і ферментних систем, руйнуванні і ремоделюванні тканинного матриксу, порушенні механізмів регуляції [21].

Друга стадія – ексудація, яка настає відразу після альтерації, характеризується комплексом судинних змін, що послідовно розвиваються при запаленні у вигляді ряду стадій: реакція мікроциркуляторного русла зі змінами реологічних властивостей крові, підвищенням проникності судин мікроциркуляторного русла, утворення ексудату і запального клітинного інфільтрату. Стадія ексудації триває до моменту загоєння ран і повного перебігу місцевого інфекційного процесу [22, 23].

На завершальній стадії запалення – проліферації, яка супроводжується відновленням пошкодженої тканини, в результаті альтераційних і ексудативних процесів під впливом біологічно активних речовин стимулюються анаболічні процеси, синтез в клітинах РНК і ДНК, специфічних ферментних і структурних білків. Формуються колагенові волокна, грануляційна тканина з великою кількістю новостворених капілярів і клітин [21]. При запаленні в процесі проліферації відбувається повна або неповна регенерація сполучної тканини, грануляція, диференціюються нові судини, відновлюються нервові зв'язки, а також клітини, що забезпечують імунний гомеостаз, і відбувається епітелізація рани. Але, якщо не загоюється протягом восьми тижнів, її вважають хронічною (наприклад, виразки шкіри, в тому числі трофічні) [24].

Подовженню термінів запального процесу сприяють різні фактори – судинна недостатність (артеріальна недостатність атеросклеротичного і діабетичного походження, а також венозна), довготривалий запальний процес, некроз внаслідок тиску, фізичні та хімічні агенти, онкологічні захворювання тощо [25, 26]. Рани є вхідними воротами для інфекції і можуть бути її джерелом, що призводить до незворотних процесів, які обтяжують перебіг захворювання та істотно ускладнюють завершення запалення.

Мікотична інфекція, в свою чергу, сенсibiliзує організм і посилює перебіг основного процесу, чим призводить до прогресування запалення [27]. На клітинному і субклітинному рівнях це характеризуються наявністю хронічного запалення і ознаками одночасно всіх фаз запального процесу [28, 29].

Таким чином, вплив на перебіг запального процесу має базуватися на чіткому уявленні всіх ланок патогенезу з урахуванням вираженості системної запальної реакції організму. Це дозволить досягти поліпшення результатів впливу на гостре запалення, знизити ймовірність хронізації процесу та кількість септичних ускладнень. Однак, залишаються питання, що стосуються ролі імунних механізмів у патогенезі етапів запальної реакції вимагають більш детального вивчення, вирішення яких дозволить здійснювати пошук нових альтернативних ефективних методів впливу на запальний процес, заснованих на використанні комплексу фізичних, хімічних та біологічних факторів.

## **1.2 Біологічні ефекти світлового впливу**

Всі процеси, які відбуваються у живих організмах на різних рівнях організації, пов'язані з перенесенням і перетворенням енергії. В більшості цих процесів первинним джерелом енергії є сонячне світло [31]. Дослідження впливу опромінювання світлом на живі об'єкти має довгу історію і пов'язані з фундаментальними твердженнями, дослідженими видатними вченими: відкриття кисню (Дж. Прістлі, 1774); перетворення енергії сонячного світла на енергію хімічних зв'язків (Р. Мейєр, 1842); залежність інтенсивності накопичення CO<sub>2</sub> при освітленні рослин червоним світлом, яке найбільше поглинається хлорофілом (К.А. Тімірязєв, 1875); явище фотосинтезу (В. Пффефер, 1878). До інформаційних фотобіологічних процесів можна віднести явище фотоперіодизму, що відбувається під впливом видимого світла, та регулює зміну різних фаз. Послідовність процесів у біосистемі

регулює довжина світлового дня, довжина сезону, що в свою чергу залежить від обертання Сонця, а отже й від кількості та якості довжини хвилі сонячної енергії. Одні характеристики індукують процеси в організмі, інші – завершують [32].

Дія оптичного випромінювання на рослини та тварини різноманітна, і пов'язана з наявністю специфічних світлочутливих молекул, зміною їхньої конформації та фізіологічної активності, що призводить до зміни метаболізму на клітинному рівні, і також з метаболічними сигнальними шляхами, які викликають реакцію на рівні тканини та організму загалом [33]. Живі організми використовують енергію фотонів як для утворення речовини, отримання інформації про довкілля, так і для формування сигналів керування їх поведінкою. Так, у процесі фотосинтезу світлова енергія використовується рослинами та фотосинтезуючими бактеріями для утворення органічних речовин з вуглекислого газу та води за допомогою світлочутливих речовин – хлорофілу, бактеріохлорофілу та каротиноїдів [34].

Біологічні об'єкти піддаються впливу спектру світла від ультрафіолетового випромінювання (UV-B) до інфрачервоного випромінювання (295–2500 нм). Ультрафіолетова (УФ) частина електромагнітного спектру складається з трьох класів: УФ-С (200–280 нм), УФ-В (280–315 нм) і УФ-А (315–400 нм), причому лише УФ-В та УФ-А досягають земної поверхні. Випромінювання з довжиною хвилі нижче 290 нм знижується до невизначених рівнів. За сучасними уявленнями, світло має властивості як електромагнітної хвилі, так і потоку фотонів. Хвильовою властивістю світла є частота коливань та пов'язана з нею довжина хвилі. Розмір енергії квантів збільшується від інфрачервоного до фіолетового випромінювання. Випромінювання довжиною хвилі від 10 нм до 100 мкм називається оптичним, а від 400 нм до 760 нм – видимим випромінюванням. Поглинання енергії світлового потоку атомами організму призводить до її перетворення на інші види енергії [35].

Здатність живих організмів реагувати на довжину хвилі (фотоперіодична реакція) властива рослинам різних таксономічних груп та життєвих форм. Фотоперіодичні реакції в тій чи іншій формі виявлені практично у всіх видів тварин, в тому числі і у людини. Кожен фотобіологічний процес починається з поглинання квантів світла молекулою-хромофором, що призводить до локальних (на рівні окремих органів та тканин) або системних (на рівні всього організму) фізіологічних ефектів [36]. Відомо, що вітамін D3 (холекальциферол) синтезується у шкірі людини під дією ультрафіолетових променів [37]. Під дією ультрафіолетового випромінювання у шкірі активується синтез меланіну та серотоніну, і пригнічується синтез протеогліканів, гіалуронової кислоти та керамідів – речовин, що захищають шкіру від трансепідермальної втрати води та сприяють утриманню вологи [38]. Інфрачервоне випромінювання стимулює утворення біологічно активних речовин – гістаміну, ацетилхоліну, брадикініну, які, зокрема, регулюють швидкість кровообігу [39].

Людина піддається дії сонячного світла і світла від штучних джерел з різноманітними спектральними характеристиками та великим діапазоном інтенсивності. Під впливом світла в організмі відбуваються важливі фотобіологічні процеси. Важлива регуляторна роль належить видимому світлу. Відомо, що у похмурі дні у багатьох людей виникає синдром «осінньої втоми», який супроводжується психічною депресією. Експериментально доведено, що подібний стан можна зняти, якщо людину поміщати на кілька годин протягом кількох днів поспіль до яскраво освітленої кімнати [40].

Особливістю біологічної дії електромагнітного випромінювання оптичного діапазону, що включає ультрафіолетове (200 – 400 нм) і видиме (400 – 750 нм) світло, є яскраво виражена залежність біологічного ефекту від довжини хвилі випромінювання. Змінюючи довжину хвилі, можна вибірково запускати ті чи інші фотобіологічні процеси [41]. Фотобіологічний процес ініціюється лише за умови поглинання кванта світла відповідною



молекулою-акцептором. Первинно вільні радикали активують ланцюгові реакції і є фізіологічними реакціями, які формуються у відповідь на поглинання кванта світла [42]. Наприклад, бактерицидні ефекти виникають внаслідок поглинання світла молекулами ДНК у клітинах бактерій та наступних хімічних реакцій, що набрали енергію квантів світла (електронно-збуджених) молекул ДНК. Отже, бактерицидні ефекти можна викликати лише тим світлом, яке поглинають молекули ДНК [41].

Поглинання монохроматичного світла речовиною описується законом Бугера-Ламберта-Бера. Змінюючи довжину хвилі, можна вибірково збуджувати та фотохімічно модифікувати різні біомолекули. На цьому заснована вибіркковість дії світла – найважливіша характеристика фотобіології. Поглинання квантів світла не молекулами, а атомами, не залежить від того, до складу яких молекул ці атоми входять. Тому поглинання іонізуючого випромінювання відбувається переважно тими елементами, яких у організмі більше. Весь спектр видимого світла (400 – 800 нм) біологічно активний [43].

Чутливість фоторецепторів в людини різна до дії світла різних довжин хвиль. Понад 150 років дослідники вважали, що в оці є фоторецептори лише двох видів: палички та колбочки. У 2002 р. Девід Берсон виявив у сітківці ссавців новий тип фоторецепторів, який відповідає за біологічну дію світла [44]. Чутливість нового фоторецептора була неоднакова до світла різних довжин хвиль. Організм людини сформувався під впливом 24-годинного біоритму («циркадного ритму») з активною денною фазою та фазою відпочинку вночі. Світло синхронізує повторюваність цього біоритму. Рівень освітленості порядку на око протягом 3 годин може призвести до фазового зсуву від 2 до 4 годин, залежно від часу доби. Світлові сигнали регулюють внутрішній годинник незалежно від відомих фоторецепторів (паличок і колб), завдяки яким бачить людина [45].

Існує ціла низка досліджень у галузі медицини, фотобіології, біохімії та хронобіології, які підтверджують той факт, що видиме світло є ефективним

регулятором біологічних ритмів, а в деяких випадках і терапевтичним фактором [46]. Також у літературі багато відомостей про ефекти взаємодії видимого світла з біооб'єктами різних таксономічних груп та у відсутності різниці у їх відповіді [41, 47, 48]. Однак єдиної думки про механізми світлового впливу на біологічні об'єкти не сформовано.

Позитивна дія видимого світла на біологічні процеси, такі як фотосинтез, фототропізм і фотоперіодизм та ін. [49] і відсутність ефективних та безпечних методів лікування запальних процесів при різних нозологіях стимулюють дослідження механізмів дії фотоопромінювання та розробку методів фотокорекції. Результати досліджень за останні десять років показали, що світло впливає на гомеостаз, а саме на фізіологічні процеси в організмі, у тому числі на метаболізм людини, наприклад, на окислення жирів до вуглекислого газу та води [50] та на патофізіологічні процеси: виникнення раку шкіри через вплив ультрафіолету [51], катаракти (помутніння кришталику через порушення фотохімічних реакцій [52], сонячних опіків [53], зимове загострення псоріазу через недостачу ультрафіолетових променів [54]. Терапевтичний ефект світла на організм людини відомий давно. Про геліотерапію знали стародавні єгиптяни, асирійці, греки та інші народи, про неї неодноразово згадується в працях Гіппократа. Проте, світлотерапія як наука почала формуватися лише в ХІХ сторіччі після відкриття англійськими вченими Дж. Дауном і Р. Блунтом (1877 р.) лікувальних властивостей ультрафіолетового випромінювання. Згодом у великій кількості експериментальних робіт було показано, що синє світло змінює біохімічний склад крові, покращує роботу серця та легень, стимулює імунну систему, має протимікробну дію [55-57], виступає в ролі безпечного варіанту терапії COVID-19 [58].

На клітинному рівні синє світло стимулює синтез АТФ, регулює метаболізм, покращує функції зовнішнього дихання, доставки та утилізації кисню у клітинах, покращує проведення нервових імпульсів [59]. В результаті цього на рівні системи мікроциркуляції та кровообігу

спостерігається зниження в'язкості крові, зміцнення стінок судин, покращення мікроциркуляції та збільшення швидкості кровообігу в магістральних судинах [60]. Описано бактерицидний ефект синього світла щодо різних патогенних мікроорганізмів [61-64].

Вибіркове поглинання синього світла ліпідами низької щільності призводить до їх руйнування та зниження рівня в крові [65]. При цьому запускається генетичний механізм регулювання ліпідного обміну, який призводить до руйнування атеросклеротичних бляшок [66].

Оптичне випромінювання червоного та інфрачервоного діапазонів покращує мікроциркуляцію крові в дрібних судинах і тканинах, підвищує швидкість окислювально-відновних реакцій, посилює регенерацію пошкоджених тканин, нормалізує водний баланс клітин, має виражену судиннорозширювальну, протизапальну, знеболювальну та знеболювальну функцію [67]. Інфрачервоне випромінювання з довжиною хвилі 0,76 мкм проникає в тканини на глибину 2-3 см, діє на терморцептори шкіри і через 2-3 хвилини викликає на опроміненій ділянці тіла гіперемію, що супроводжується посиленням кровообігу та тепловіддачі, тканинного обміну, окисних процесів та зменшення вміст води в тканинах [68].

У зв'язку зі зниженням ефективності протизапальних засобів, утворенням стійких до більшості відомих антибіотиків штамів мікроорганізмів, зростання кількості інфекційних ускладнень, малою ефективністю більшості загальноприйнятих методів корекції актуальним є пошук нових способів корекції всіх етапів гнійно-запальних процесів [69]. На сьогодні одним із перспективних фізичних методів антимікробної фото впливу є використання лазерного та світлодіодного випромінювання, яке має виражену бактерицидну активність, протизапальну дію, викликає позитивну імунну відповідь, попереджає дистрофічні та склеротичні процеси [70].

Рядом дослідників показаний позитивний ефект фотоопромінювання на запальний процес. Фотоопромінювання сприяє загоєнню хронічних ран, пов'язаних з порушенням функції імунокомпетентних клітин, зниженням

клітинної міграції, проліферації, синтезу NO фагоцитуючими клітинами, факторів росту, синтезу колагену та інших білків позаклітинного матриксу [71]. Механізми та особливості біологічних ефектів фотовпливу обумовлені впливом не лише на формені елементи крові, а й на різноманітні рецепторні закінчення інших клітинних систем [72]. В роботі [73] показано, що фотохімічний механізм дії світла заснований на поглинанні фотона молекулою ендogenous порфірину, після чого активується реакція перекисного окислення ліпідів у клітинних мембранах і мітохондріях, підвищується їх проникність. Ankrі R (2010) показав, що клітини організму вибірково використовують діапазон електромагнітних хвиль за допомогою специфічних рецепторів для активації електрозалежних енергетичних біохімічних процесів [74].

У роботі Catao M.H. (2016) показано позитивний вплив фотоопромінювання на запальний процес. Автори у своїй роботі продемонстрували, що фотовплив збільшував кількість протеїназ, які руйнують позаклітинний матрикс, і фагоцитуючі клітини залишаються у фазі інфільтрації запального процесу при загоєнні ран [75]. Іншими дослідниками показано, що після низькоінтенсивного світлового впливу на вогнище запалення відбувається збільшення АТФ, посилюється клітинна міграція, проліферація, збільшується концентрація мітохондрій та активність цитохром-С та оксидаз, тобто зростає окисний стрес, що призводить до підвищеної загибелі клітин [76, 77]. Як показано Freitas L. F. et al (2016), одним із механізмів взаємодії фотонів світла з біологічними мембранами є зміни чутливості іонних каналів клітинних мембран через наявність іонних градієнтів [78].

Інтерес до модифікуючих клітинних ефектів оптичного випромінювання пояснюється широким поширенням терапевтичних підходів у медицині, пов'язаних з його застосуванням для лікування трофічних розладів, ішемії нижніх кінцівок, ран, що не гояться і т.д. [79]. Особливо часто з цією метою використовується фотодинамічну терапію [80].

Фотодинамічний вплив засновано на взаємодії фотосенсибілізатора та світлового випромінювання, що має певну довжину хвилі та низькоінтенсивне лазерне випромінювання, яке запускає фотохімічні реакції в клітині, що керують мікроциркуляцією, активізує капілярний кровотік, проліферативну активність ендотеліальних клітин та формування нових капілярів. В результаті в клітині розвивається фотодинамічна реакція [76].

Для проведення фотодинамічної корекції необхідне введення фотосенсибілізатора, який активується під дією світлового випромінювання з різною довжиною хвилі. Відомі десятки фотосенсибілізаторів, але лише одиниці пройшли клінічні випробування [81]. Фотосенсибілізатори повинні бути не токсичні, володіти гідрофільністю для легкості системного введення, володіти високою фотохімічною активністю, яка характеризується максимальним виходом токсичних метаболітів кисню, характеризуватись високою афінністю та селективністю накопичення в патологічних клітинах-мішенях з мінімальною затримкою в оточуючих здорових тканинах, а також володіти швидкою фармакодинамікою та елімінацією з організму людини, та відсутністю фототоксичності продуктів розпаду [79].

При поглинанні фотонів світла атоми фотосенсибілізатора активуються. Наступна втрата атомів фотосенсибілізатора енергії, що утворилася, може відбувається різними способами. Один із способів – перехід атомів в інертний стан, що супроводжується флуоресценцією [82]. Фотосенсибілізатор здатний флуоресціювати під впливом світла певної довжини хвилі, перетворюючи фотосенсибілізатор на маркер злоякісної тканини та визначати поширеність пухлинного процесу (флуоресцентна діагностика) [82]. Інший спосіб – це збудження молекули фотосенсибілізатора, яка вступає в реакцію з хімічними речовинами і утворює вільні радикали – реакція Фентона I. Найбільш важливою для реалізації клінічного фотодинамічного ефекту є реакція Фентона II, при якій збуджена молекула фотосенсибілізатора взаємодіє з киснем, внаслідок чого виділяється активна синглетна форма кисню [83].

Дані літератури дозволяють припустити, що проникнення фотосенсибілізатора в клітини можливе як пасивним, дифузним шляхом, так і фагоцитозом, а також за допомогою рецептора епідермального фактору росту, який володіє внутрішньою тирозинкіназною активністю. Також значна роль у транспорті фотосенсибілізаторів до клітин-мішеней відводиться ліпопротеїдам плазми крові, особливо низькомолекулярної фракції. [84].

За твердженням Коробова А. М. та інших авторів, кожному з видів оптичного випромінювання притаманні характерні фізико-хімічні, біологічні та лікувальні ефекти, що визначає особливості їхнього впливу на організм [85-87]. Чим більша довжина хвилі збудження фотосенсибілізатора, що обумовлює розвиток фотодинамічної реакції, тим більша глибина проникнення світла в біологічні тканини. Шляхом підбору фотосенсибілізатора та відповідної йому довжини хвилі можна регулювати проникаючу здатність світла до біологічних тканин. На неглибокі ураження шкіри глибиною до 1 мм краще впливати синім світлом з довжиною хвилі (450-480 нм) [88].

Головним фактором індукції фото динамічного впливу опосередкованої імунної відповіді є ушкодження клітинних мембран [89]. Фотоокислювальні реакції у клітині індукують виділення медіаторів, які активують запальну реакцію [90]. Молекула фотосенсибілізатора при поглинанні кванта переходить із основного електронного у збуджений стан [91]. Фотоокислення включає взаємодію збудженого фотосенсибілізатора з субстратом, який вступає в реакцію з киснем, з утворенням синглетного кисню. Синглетний кисень утворює пероксиди (супероксид-іон, гідроксильний радикал), які легко руйнуються у ферментативних процесах. При цьому утворюються деструкції субстрату та вільні радикали [92].

У механізмі ушкодження клітин важливе значення має не лише ступінь альтерації різних органел, а й роль, що вони відіграють у життєдіяльності клітини. Наприклад, при фотосенсибілізації нейронів, виражені зміни в клітині спостерігалися в мітохондріях, апараті Гольджі [93]. Перед тим, як

потрапити до клітини, фотосенсибілізатор локалізується на плазматичній мембрані [94]. Гідрофільні фотосенсибілізатори сильніше подразнюють клітинну поверхню, зокрема, білки та глікопротеїни, що пов'язані з мембраною, а ліпофільні фотосенсибілізатори – ліпідний бішар та гідрофобні ділянки білків. Біомембрани дуже чутливі до фотодинамічної дії [95]. Фотодинамічні пошкодження плазматичної мембрани відбувається швидко, у перші хвилини дії. Синглетний кисень ініціює у них ланцюгові процеси перекисного окислення ліпідів. В результаті перекисного окислення ліпідів у клітині утворюються радикальні продукти, які є сигнальними медіаторами в окислювальному стресі. Існує пряма кореляція між фотоіндукцією перекисних процесів та пошкодженням мембран [95, 96].

Після ендоцитозу фотосенсибілізатор потрапляє в ендосоми і подальше освітлення викликає руйнування мембран та вихід даної речовини в цитозоль [97]. Мітохондрії дуже чутливі до фотодинамічного впливу, також є головними мішенями цитотоксичної дії. Фотодинамічний вплив посилює генерацію АФК в мітохондріях, при цьому відбувається як перекисне окислення ліпідів, так і інактивація важливих мітохондріальних ферментів: сукцинатдегідрогенази, цитохромоксидази [93].

Таким чином, можна зробити висновок, що фотоопромінювання може мати численні позитивні ефекти на перебіг запалення. Застосування спеціальних світлових джерел на пошкоджені тканини сприяє прискоренню загоєння ран, зменшенню запалення та стимулює регенерацію. Одним з ключових механізмів, які стоять за цим позитивним впливом, є активація мітохондрій - енергетичних органел тканин. Фотони світла поглинаються мітохондріями, що активує процеси фотобіостимуляції та збільшує вироблення АТФ – основного енергетичного джерела клітин. Це, в свою чергу, сприяє прискоренню клітинного метаболізму та регенерації тканин. Фотовплив, зокрема використання світлових джерел певної довжини хвиль, може стимулювати імунну відповідь та поліпшувати функцію імунної системи – посилювати фагоцитарну активність, впливати на баланс

цитокінів, а також проявляти антимікробною дією. І вивчення світлового впливу різної довжини хвилі на біологічні системи є надзвичайно цікавою областю досліджень, що пов'язано з можливістю керування функціонально-фізіологічними змінами в організмі протягом патологічного процесу.

### **1.3 Біологічні властивості екзосом стовбурових клітин**

Як відомо, переважна більшість фізіологічних та метаболічних процесів забезпечується міжклітинними взаємодіями. Важливими посередниками клітинної комунікації є позаклітинні везикули – екзосоми [98] які присутні майже у всіх рідинах організму, таких як кров, нормальна сеча, грудне молоко, промивна рідина бронхів, слина, спинномозкова рідина, амніотична рідина та синовіальна рідина [99, 100], і здатні вивільнятися усіма типами клітин як під час нормальних фізіологічних, так і патологічних станів [101]. Їх продукція індукується різними процесами – окислювальним стресом, гіпоксією, старінням, запаленням та інфекцією, а кількість синтезованих екзосом залежить від фізіологічного стану виробництва клітини, яка їх синтезує, та її мікрооточення [102, 158]. Унікальні властивості екзосом, а саме транспортування активних компонентів до сусідніх або віддалених клітин, привертають увагу науковців для розробки технологій їх застосування у біології та медицині [103, 104].

Формування малих частинок, діаметр яких становить від 30 до 150 нм, відбувається через специфічний шлях біогенезу, включаючи брунькування плазматичної мембрани, яка утворює ранню ендосому, що згодом дозріває в пізню ендосому з накопиченням внутрішньопросвітних везикул в їх просвіті [105]. Пізні ендосоми зливаються з плазматичною мембраною та генерують екзосоми. Після вивільнення в позаклітинний простір, екзосоми розпізнаються клітинами-реципієнтами через фактори адгезії, такі як інтегрин, з наступним поглинанням ендосомами. Однак деякі екзосоми безпосередньо зливаються з плазматичною мембраною або взаємодіють з



ліпідно-лігандним рецептором і передають свій вміст [106]. Залежно від відстані клітини-мішені, екзосоми для віддалених клітин можуть поглинатися через паракринний або ендокринний шлях [99].

Значимість екзосом залежить від їх вмісту, оскільки вони можуть містити важливі білки, ліпіди і метаболіти, набір нуклеїнових кислот, що складається з мікроРНК, фрагментів тРНК, мРНК, мікро-РНК-транскриптів і РНК-білкових комплексів, хромосому та мітохондріальну ДНК, які необхідні для передачі клітинних сигналів і регуляції біологічних функцій [98, 100]. Хоча склад екзосом залежить від походження донорської клітини, існує кілька консервативних білків, які вважаються специфічними маркерами екзосом. Родина білків тетраспаніну (включаючи CD9, CD63 і CD81) є найважливішими консервативними білками, які забезпечують зв'язок всередині клітини із зовнішнім середовищем. Окрім тетраспаніну, інші молекули клітинної адгезії включають інтегрини та молекули презентації антигену (МНС) [107]. Білки теплового шоку HSP70 і HSP90 також відомі як головні екзосомальні маркери, що приймають участь у ремоделюванні мембрани через регуляцію та трансформацію згортання білків [106].

Doyle L. M. & Wang M. Z. (2019) показали, що екзосоми мають імуномодулюючий потенціал і забезпечують зв'язок між антигенпрезентуючою клітиною та клітиною-реципієнтом. Екзосоми також містять цитокіни та інші сигнальні молекули, що забезпечують антимікробні властивості при вірусних та бактеріальних інфекціях. Екзосомальний вміст залежить не лише від донорської клітини, а й епігенетичного впливу, фізіологічних і патологічних умов мікрооточення [108]. Екзосоми постійно виробляються та вивільняються численними типами гемопоетичних і негемопоетичних клітин, включаючи ретикулоцити, В- і Т-лімфоцити, тромбоцити, тучні клітини, кишкові епітеліальні клітини, дендритні клітини, неопластичні клітинні лінії та імунні клітини нервової системи, тобто мікроглію та нейрони [107].

Екзосоми оточені ліпідною двошаровою мембраною, яка забезпечує їх захист від впливу імунної системи та відділяє від рідин організму; містять високий рівень холестерину, сфінгомієліну, керамід [108]. Завдяки біошару ліпідної мембрани, що походить від клітини-продуцента, екзосоми після ізоляції є стабільними і можуть зберігатися при температурі  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  протягом тривалого часу без втрати своєї функціональності активності [100].

Екзосоми, отримані з мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), привертають увагу завдяки своїм імуномодулюючим, регенеративним і протизапальним функціям [99]. Екзосоми, що походять від МСК, приймають участь проліферації, транскрипції, міграції та диференціюванні клітин, сприяють стимуляції ангиогенезу, пригніченню фіброзу, зростанню стійкості та диференціації нейронів, індукції ремоделювання позаклітинного матриксу, інгібування місцевої запальної реакції та коригування активності імунних клітин [102]. Дослідження показали, що екзосоми із МСК імітують корисні ефекти МСК на тваринних моделях різних захворювань людини, зокрема серцево-судинних захворювань, захворювань нирок, печінки, легенів, нейродегенеративних захворювань та ін. [99, 102]. Вперше екзосом з МСК були виділені і досліджені в 2010 році, коли на моделі миші з ішемією/реперфузією міокарда показали здатність зменшувати розмір інфаркту. Аналіз мікроматриць екзосом показав, що близько 98% мікроРНК у стовбурових клітинах були в екзосомах [109].

Антибактеріальний ефект екзосом з МСК досліджувався при різних бактеріальних захворюваннях, в тому числі й при дихальній недостатності, основною причиною якої є гостре ураження легенів, в основному спричинене бактеріальною пневмонією. Zhu et al. (2014) виявили, що екзосом з МСК, були такими ж ефективними, як і їхні батьківські клітини, у покращенні виживання, відновленні проникності легеневих білків і зменшенні запалення в моделі миші ALI, індукованої ендотоксином *E. coli* [110]. Свідченням прямої антибактеріальної активності везикул після введення екзосом МСК було зменшення вмісту екстраваскулярної води в легенях, зниження рівня

загального білку та хемотаксису нейтрофілів у рідину бронхоальвеолярного лаважу, що вказувало на послаблення набряку легенів, проникності легеневого білка та запалення [110].

Monsel et al. (2015) виявили, що введення екзосом МСК, на мишачій моделі пневмонії, індукованої *E. coli*, призвело до більш високого бактеріального кліренсу, що частково було зумовлено посиленням фагоцитозу моноцитів. Результати також показали, що попередня стимуляція МСК агоністом Toll-подібного рецептора-3 (TLR-3) може призвести до вивільнення більш ефективних екзосом і подальшого посилення фагоцитозу моноцитів бактерій. Було виявлено, що зв'язування та поглинання екзосом моноцитами людини та пошкодженими альвеолярними епітеліальними клітинами відбувалося через рецептор CD44 на клітини-мішені, що було необхідно для їх терапевтичних ефектів. Крім того, екзосоми підвищували внутрішньоклітинні рівні АТФ у пошкоджених альвеолярних епітеліальних клітинах і знижували секрецію запальних цитокінів, включаючи фактор некрозу пухлини-альфа (TNF- $\alpha$ ) у моноцитах людини, що свідчить про метаболічні та імуномодулюючі ефекти екзосом, отриманих з МСК [111].

До сприятливих ефектів екзосом МСК належать і результати досліджень Park et al. (2019), в яких спостерігали терапевтичні ефекти екзосом на моделі *ex vivo* перфузованих легень людини з важкою пневмонією, спричиненою *E. coli*. Застосування екзосом МСК призвело до значного підвищення кліренсу альвеолярної рідини, зниження проникності легневих білків, і як наслідок – до зниження бактеріального навантаження [10, 112].

Імуномодулюючі та імуностимулюючі властивості метаболітів стовбурових клітин частково залежать від функціональних мікроРНК у екзосомах. Нао et al. (2019) досліджували вплив екзосом людських мезенхімальних стовбурових клітин на *E. coli*, яка викликала гостру пневмонію легень у мишей C57BL/6. Автори виявили, що введення екзосом було пов'язане з високим рівнем лейкотрієну (LT) B<sub>4</sub> і покращенням

кліренсу бактерій у пошкодженій альвеолі за рахунок посилення фагоцитозу і вивільнення антимікробних агентів [113].

Song et al. (2017) перед виділенням екзосом попередньо стимулювали МСК IL-1 $\beta$ , після чого вплив цих екзосом досліджували на мишачій моделі сепсису, спричиненого перев'язкою сліпої кишки та пункцією. Відомо, що інтерлейкін-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), як головний прозапальний цитокін, підвищується на ранній стадії сепсису та впливає на тяжкість перебігу органної дисфункції. Результати показали, що IL-1 $\beta$  посилював терапевтичний ефект екзосом-МСК проти сепсису шляхом індукції поляризації макрофагів до протизапального фенотипу M2 [114]. Результати досліджень також показали, що екзосоми, отримані з МСК, містили високі рівні miR-146a, яка є добре відомою протизапальною мікроРНК. Перенесення miR-146a екзосомами до макрофагів-реципієнтів регулювало перехід M1 у M2, зменшувало запалення та підвищувало виживання септичних мишей. Тобто, попередня стимуляція IL-1 $\beta$  ефективно підвищувала імуномодулюючі властивості МСК частково через опосередковану екзосоною передачу miR-146a [114, 115].

Дослідження введення екзосом для доставки ліків, зокрема антибіотиків, все ще знаходяться на початковому етапі. У Yang et al. (2018) екзосоми були виділені з макрофагів мишей RAW 264.7 та інкубовані з антибіотиком Лінезолід. Було оцінено вплив лінезолід-екзосом на макрофаги, інфіковані резистентним до метициліну *Staphylococcus aureus* (MRSA), на мишачій моделі MRSA. Як відомо, *S. aureus* виживає всередині фагоцитів, і є штамом, який стійкий до антибіотиків, що може призвести до сепсису, інфекційного ендокардиту, остеомієліту та некротичної пневмонії. Доставка інкапсульованих в екзосоми антибіотиків була більш ефективною проти внутрішньоклітинних інфекцій MRSA порівняно з вільними антибіотиками лінезоліду [116]. Отже, екзосоми, отримані з МСК та імунних клітин, мають здатність транспортувати антимікробні агенти проти внутрішньоклітинних патогенних інфекцій.

Деякий вміст екзосом, отриманих з МСК, може відігравати значну противірусну роль, пригнічуючи реплікацію вірусу та індуючи імунні реакції [117]. Qian et al. (2016) досліджували вплив секретованих екзосом з МСК пуповини на інфекцію вірусу гепатиту С *in vitro*. Результати показали, що профіль мікроРНК в екзосомах, включаючи let-7f, miR-145, miR-199a та miR-221, приймає участь у прямому пригніченні реплікації РНК вірусу гепатиту С [118]. В роботі Zhou et al. (2016) *in vitro* інфікування вірусом гепатиту С показало, що екзосоми макрофагів містять членів родини miR-29, які чинять противірусну дію на клітини Huh7 [119]. Kouwaki et al. (2016) показали, що інфіковані вірусом гепатиту В гепатоцити вивільняють екзосоми, які містять вірусну нуклеїнову кислоту, що активує вроджену імунну відповідь. А рівні мікроРНК miR-21 і miR-29a підвищуються в екзосомах інфікованих гепатоцитів, і стимулюють макрофаги [120]. Sims et al. (2014) описали роль екзосом нейронних стовбурових клітин у проникненні вірусу в клітину. Автори виявили, що екзосоми містили Т-клітинний муцин, який діяв як рецептор фосфатидилсерину та опосередковував дію аденовірусу 5 типу [121].

Було продемонстровано сприятливий вплив екзосом зі стовбурових клітин на лікування респіраторних вірусів [122]. Показано, що екзосоми стовбурових клітин послаблюють цитокіновий шторм, відновлюють оксигенацію та покращують кількість імунних клітин [123]. Імуномодуюча функція екзосом МСК зробила їх потенційним терапевтичним варіантом для боротьби з цитокіновим штормом через зниження рівня прозапальних цитокінів [124], пригнічення активності CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup> Т-клітин, зменшення проліферації та активацію НК-клітин, що покращувало вивільнення IL-4, IL-10 і TGF-β [125]. В роботах різних авторів показано, що екзосоми стовбурових клітин можуть конкурентно блокувати зв'язування SARS-CoV-2 з клітинами, що експресують ангіотензинперетворюючий фермент 2 [126, 127]. Крім того, екзосоми стовбурових клітин сприяли регенерації та відновленню органів [11, 128].

Дослідження Cruz et al. (2015) продемонстрували, що системне введення екзосом, отриманих з МСК кісткового мозку людини, покращує стан при алергічному запалення дихальних шляхів, індукованого екстрактом гіф *Aspergillus*, на моделі імунокомпетентної мишачої рефрактерної нейтрофільної астми [129].

Оскільки все ще існують проблеми з безпекою застосування МСК, такі як нижча виживаність після трансплантації, а також можливість тромбоемболії легеневої артерії, виникнення пухлини та неконтрольованої диференціації, у цьому аспекті екзосоми стовбурових клітин є високостабільними завдяки бішаровій ліпідній мембрані, малому розміру, низькій імуногенності, легкому зберіганню при  $-80^{\circ}\text{C}$  протягом тривалого часу без токсичних агентів і простішій процедурі доставки та лікування. Як і батьківські клітини, екзосоми мають імуномодулюючі та імуносупресивні властивості, і є альтернативою використанню СК, без проблем з безпекою щодо регенеративної медицини [99].

Повідомлялося, що екзосоми з МСК, зменшують побічні ефекти клітинної терапії [130]. Маніпуляції з екзосомами шляхом завантаження терапевтичних сполук, а також перенесення інтерферуючих РНК, мікроРНК і олігонуклеотидів підвищують їх ефективність [131]. Melzer et al. (2019) оцінили завантаження сполуки паклітакселу в екзосоми МСК і показали, що останні помітно зменшували об'єм пухлини молочної залози та пригнічували метастази порівняно з монотерапією екзосомами [132]. Потенціал біосумісності екзосом також робить їх ідеальним кандидатом для терапевтичного застосування, а саме для доставки ліків, наприклад антибіотиків [133]. Незважаючи на вищезазначені переваги, дослідження щодо розробок застосування екзосом стовбурових клітин все ще потребують уточнення. Є також деякі перешкоди, які необхідно подолати – зокрема, відсутність стандартних методів ізоляції та очищення екзосом, відсутність повної інформації про точний вміст цих везикул і наявність неоднорідності у

вивільнених везикулах в результаті фізіологічних змін у позаклітинному просторі клітин [133, 134].

Отже, аналіз літературних даних показав, що екзосоми стовбурових клітин мають антимікробний потенціал та імуномодулюючу здатність, і можуть вплинути на сферу нової медицини від клітинної до безклітинної терапії. Екзосоми відіграють життєво важливу роль у внутрішньоклітинній комунікації та імунній модуляції при різних фізіологічних і патологічних станах. Завдяки широкому спектру біологічних властивостей (підтримка гомеостазу та перенесення молекул між клітинами) екзосоми привернули велику увагу в біологічних та медичних дослідженнях.

#### **1.4 Біологічна активність наночастинок діоксиду церію**

В останнє десятиліття спостерігається значне впровадження здобутків нанотехнологій у різні галузі науки. Існує велика кількість наукової літератури про результати біологічних досліджень властивостей наночастинок, отриманих з різних джерел [135]. Одними з найбільш перспективних є наночастинки діоксиду церію  $\text{CeO}_2$ , які описані в літературі як такі, що справляють з цитотоксичними та проявляють цитопротекторні ефекти, які пов'язують з їх антиоксидантними властивостями. Існує припущення, що наночастинки  $\text{CeO}_2$  імітують фермент супероксиддисмутази (СОД), який каталізує дисмутацію аніон-радикалу супероксиду в живих клітинах, і подібною до каталази здатністю розкладати перекис водню на воду і кисень [136].

Однак, є декілька досліджень *in vitro*, які свідчать про токсичність  $\text{CeO}_2$ . Park et al. (2008) оцінювали цитотоксичний ефект наночастинок  $\text{CeO}_2$  на лінії клітини легенів BEAS-2B, і виявили, що обробка наночастинками  $\text{CeO}_2$  (15-45 нм) знижувала життєздатність клітин BEAS-2B. Рівень АФК корелював із застосованими дозами наночастинок. Також після застосування

наночастинок  $\text{CeO}_2$  автори спостерігали зростання рівня ферменту каспази-3, яка відіграє ключову роль у апоптозі [137].

Подібним чином Eom and Choi (2009) виявили, що наночастинки  $\text{CeO}_2$  можуть проявляти свою токсичність через окислювальний стрес, оскільки вони спричиняють значне підвищення клітинних концентрацій АФК, що призводить до сильної індукції NO-1 через p38-ядерний фактор і сигнальний шлях фактора Nrf2 [138]. На противагу цьому, Hirst et al. (2009) не виявили жодного впливу на морфологію мишачих макрофагів після впливу наночастинок  $\text{CeO}_2$ , а також не виявили токсичного впливу на клітини при будь-якій концентрації в досліджуваному діапазоні. Натомість автори припустили, що наночастинки  $\text{CeO}_2$  мають антиоксидантні властивості [139].

Nelson et al. (2016) показали, що наночастинки неорганічного оксиду церію, також відомі як наноцерій, є винятковими антиоксидантами, які використовуються для регенерації радикалів *in vitro* [140].

Arya et al. (2014) виявили, що обробка наноцерієм у концентрації 25 нМ первинної нейрональної культури, знижувала вміст АФК і забезпечувало відносне підвищення клітинного потоку кальцію. Застосування наночастинок діоксиду церію також пригнічувало апоптоз, що за думкою дослідників відбувалось за рахунок підтримки потенціалу мітохондріальної мембрани та відновлення основних окислювально-відновних еквівалентів, включаючи співвідношення NADH/NAD і клітинний АТФ. Це дослідження додатково підкреслило захисну роль наноцерію проти окисного стресу [141].

В дослідженні Guan et al. показано антиоксидантну здатність діоксиду церію (CeONP) та характеристики деградації агрегатів А $\beta$  поліоксометалатів (POMs). Дослідження *in vitro* показали, що комплекс CeONP з POMs ефективно розщеплює агрегати А $\beta$ , знижує внутрішньоклітинні АФК, сприяє проліферації клітин, пригнічує А $\beta$ -індуковану активацію мікрогліальних клітин BV2. Дослідження *in vivo* на нормальних мишах також показали, що комплекс CeONP з POMs має добру біосумісність [142].



Дослідження наночастинок оксиду церію демонструють ефект гасіння АФК *in vivo* та *in vitro*. Ефективність  $\text{CeO}_2$  у захисті легенів під час окислювального стресу в умовах гіпобаричної гіпоксії не була відома до 2013 року. Сферичні наночастинок діоксиду церію діаметром 7–10 нм, що синтезовані за допомогою мікроемульсійного методу, володіли захисною ефективністю на легені під час гіпобаричної гіпоксії. При повторних внутрішньоочеревинних ін'єкціях низької мікромольної концентрації протягом 4 днів наночастинок  $\text{CeO}_2$  локалізувалися в легенях гризунів без будь-якої запальної реакції. Депоновані в легенях наночастинок зменшували утворення АФК, знижували перекисне окислення ліпідів і окислення глутатіону. Наночастинок  $\text{CeO}_2$  запобігали окислювальним модифікаціям білка (нітрування та утворення карбонілу) під час гіпобаричної гіпоксії. Автори зробили висновки про те, що шляхом гасіння АФК, що утворюється під час гіпобаричної гіпоксії, наноцерії, відкладені в легенях, забезпечують захист, не викликаючи запальної реакції [137, 143].

Подібні захисні та антиапоптотичні ефекти спостерігалися в клітинних лініях лейкоцитів як показано в роботі Celardo et al. (2011). Автори легували наночастинок  $\text{CeO}_2$  іонами самарію, що зменшувало рівня  $\text{Ce}^{3+}$ , не впливаючи на кисневі вакансії. Це призводило до зниження антиапоптотичних властивостей, яке свідчить про те, що присутність іонів  $\text{Ce}^{3+}$  важлива для захисних ефектів, які спостерігали автори [144]. Крім того, 24-годинний вплив наночастинок  $\text{CeO}_2$  захищав клітини-попередники серця від індукованої  $\text{H}_2\text{O}_2$  цитотоксичності протягом 7 днів [145].

Karakoti et al.(2009) виявили, що наночастинок проявляють активність поглинання АФК у спосіб, який можна переробляти шляхом оборотного зв'язування атомів кисню та переміщення між церієм, щоб зменшити аномальне утворення АФК результаті мітохондріальної дисфункції [146]. Було синтезовано трифенілфосфоній-кон'юговані (TRP) наночастинок оксиду церію. TRP – це ліпофільний катіон, який здатний націлюватися на мітохондрії, використовуючи переваги негативного мембранного потенціалу

мітохондрій. Експерименти *in vivo* та *in vitro* показали, що наночастинки ТРР-церію є біосумісними та можуть зменшувати окислювальний стрес шляхом поглинання мітохондріальних АФК. Автори вивчали вплив наночастинок ТРР-церію на трансгенній мишачій моделі AD 5XFAD, і виявили, що наночастинки ТРР-церію ефективно пом'якшували реактивний гліоз і пригнічували загибель нейронів [147].

В іншому дослідженні властивості переходу  $Ce^{3+}$  і  $Ce^{4+}$  використовували для відновлення поділу мітохондрій. Таким чином, використовувалися наноцерії, які були глибоко локалізовані у зовнішній мембрані мітохондрій і протистояли поділу мітохондрій, пероксинітритом. Цей ефект поділу мітохондрій і загибелі клітин був викликаний активацією пов'язаного з динаміном білка 1 (DRP1), гігантської GTP-ази, яка сприяє поділу мітохондрій за допомогою досі невідомих молекулярних механізмів. Тим не менш, можливу роль у цих процесах може відігравати фосфорилування серину 616 DRP1. Наночастинки оксиду церію успішно знищували супероксидні аніони, перекис водню та пероксинітрит [148].

Хронічний гіпоксичний вплив, який спостерігається на великій висоті, часто впливає на кору та гіпокамп у головному мозку, що призводить до погіршення пам'яті та когнітивної дисфункції через утворення активних форм азоту та кисню. Наночастинки діоксиду церію, покриті поліетиленгліколем (PEG-CeNPs), ефективно локалізовані в мозку гризунів, зменшили окислювальний стрес і пов'язане з ним пошкодження під час впливу гіпоксії [146]. Показано, що основний молекулярний механізм посиленого нейрогенезу за допомогою PEG-CeNPs полягав у протейніназі, що активується 5'-аденінмонофосфатом. Отже, наноцерій може бути перспективним терапевтичним засобом при нейродегенеративних захворювань [149].

Walkey et al. (2015) провели дослідження на моделі щурів з аутосомно-домінантним пігментним ретинітом, і виявили каталітичну функцію  $CeO_2$  у пригніченні зменшення кількості фоторецепторних клітин. Дво- та

три тижневі щури отримували інтравітреальну дозу фізіологічного розчину або неорганічного оксиду церію. Через 3-7 тижнів кількість апоптотичних клітин зменшилася до 56% у найвищому ступені на сьомий день після ін'єкції  $\text{CeO}_2$  порівняно з фізіологічним розчином. Крім того, через 14 днів ін'єкції було виявлено зниження рівня перекисного окислення ліпідів [150].

В даний час  $\text{CeO}_2$  також вважаються можливою терапевтичною альтернативою лікуванню нейродегенеративних захворювань [151]. Було виявлено, що клітини сітківки швидко (протягом 60 хвилин) поглинали  $\text{CeO}_2$ , при цьому близько половини введених наночастинок зберігались в сітківці через 12 місяців [140].

Kong et al. (2011) показали, що наноцерій зберігає морфологію сітківки та запобігає втраті її функції на моделі пошкодження світлом щурів. На моделі гомозиготної мутантної миші зі спадковою ранньою прогресуючою кохлеарною дегенерацією та дегенерацією сітківки показана здатність наноцерію сповільнювати прогресування дегенерації сітківки. Результати показали, що наноцерій має властивості захисту сітківки через здатність знижувати АФК, посилювати експресію генів, пов'язаних із захистом нейронів; зниження регуляції сигнальних шляхів апоптозу та/або посилення сигнальних шляхів виживання для сповільнення дегенерації фоторецепторів. Ці дані свідчать про те, що наночастиники діоксиду церію мають значний потенціал як глобальний агент для терапевтичного лікування спадкової дегенерації сітківки та більшості типів захворювань очей [152].

Наночастинки діоксиду церію представляють недавній підхід до терапії раку, володіючи «розумною» здатністю вибірково індукувати клітинну смерть в опромінених ракових клітинах, що є придатним для променевої терапії. Унікальністю цих наночастинок є те, що вони спрямовані на ракові клітини спеціальним чином, захищаючи при цьому навколишні тканини від пошкоджень, викликаних радіацією окисного стресу, таким чином діючи і як радіозахисні, так і радіосенсибілізуючі агенти одночасно [153]. Цілеспрямована протипухлинна дія цих наночастинок пояснюється

тим, що вони вибірково збільшують окислювальний стрес і апоптоз в опромінених ракових клітинах, шляхом пригнічення їхньої внутрішньої каталазоподібної активності, яка відбувається в кислому середовищі при рН 4,3. Однак інший можливий механізм диференціальної токсичності діоксиду церію відноситься до його активності, подібної до супероксиддисмутази, яка діє як радіосенсибілізуючий агент, посилюючи відповідь на пошкодження ДНК. І вважається, що наночастинки діоксиду церію можуть діяти як радіосенсибілізуючі агенти через додатковий біологічний механізм, який контролює реакцію на пошкодження ДНК. Незважаючи на те, що ефект може спостерігатися при багатьох видах раку, цей процес був описаний і інтенсивно досліджувався на клітинах меланоми [154].

Відомо, що стійкість до антимікробних препаратів зростає з загрозливою швидкістю. Раннє виявлення антимікробної резистентності є основною вимогою для кращих стратегій лікування. Різними авторами показано, що наночастинки  $\text{CeO}_2$  можуть відігравати ключову роль у виявленні резистентності до ліків завдяки їхній здатності існувати в стані змішаної валентності та діяти як окиснювачі або відновники; і можливе використання наночастинок  $\text{CeO}_2$  для виявлення інгібіторної активності проти неінгібуючої концентрації антибіотиків на *E. coli*, *S. aureus* [155], *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus hirae*, *Candida parapsilosis* та *Candida tropicalis* [156].

Таким чином, можна зробити висновок про широке використання наночастинок церію з метою пригнічення деяких клітинних процесів при різних патологічних станах.

## **Висновки до розділу 1**

Отже, завершуючи цей розділ, можна сказати, що довготривалі запальні процеси залишаються однією з найскладніших проблем біології та медицини. Останнім часом досягнуто значних успіхів у корекції цього

патологічного процесу, але й надалі продовжуються активні пошуки принципово нових методик впливу на запальні реакції.

Оскільки стан імунної системи визначає стійкість захисних сил організму, і ефективність впливу на запалення, доцільним є проведення аналізу залучення різних ланок імунітету до процесів, що відбуваються при дії різних екзогенних факторів.

Проведений аналіз літератури демонструє, що на сьогоднішній день недостатньою комплексних досліджень, які б були присвячені вивченню впливу світлового опромінювання різних довжин хвиль на різних стадіях запального процесу та з урахуванням використання додаткових біологічних (метаболіти стовбурових клітин) і/або хімічних факторів (наночастинки), які б призводили до прискорення закінчення запального процесу.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Дизайн експериментального дослідження

Експериментальні дослідження були виконані на 3-х місячних щурах-самцях лінії *Wistar*. В роботі було використано 264 тварини масою 100-120 г. Тварин утримували у стандартних умовах харчового та світлового режиму віварію НДІ біології Харківського національного університету імені В. Н. Каразіна. Дослідження проводили відповідно до «Спільних етичних принципів проведення експериментів на тваринах» (Україна, 2011 р.), які узгоджуються з положеннями Європейської конвенції «Про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.) [157].

У роботі використано три експериментальні моделі:

I) модель тривалого запального процесу на тваринах з ЛПС-індукованим перитонітом використовували для оцінки ефектів фотоопромінювання тварин різними довжинами хвиль ( $\lambda = 660$  нм, 530 нм, 470 нм) на різних етапах запального процесу.

II) культуру лейкоцитів периферичної крові *in vitro* використовували для оцінки проліферативного потенціалу клітинного матеріалу пацієнтів із хронічними запальними процесами для обґрунтування адресного застосування екзосом з метаболітами прогенераторних стовбурових клітин.

III) культуру одноклітинної водорості *Dunaliella viridis* (біоіндикаторна тест-система) використовували для дослідження можливої цитотоксичної активності наночастинок діоксиду церію різної концентрації та різних розмірів. При дії негативних факторів різного ступеня цитотоксичності оцінювали морфо-функціональні зміни клітин тест-системи: форма клітин, зміни характеру та напрямки руху, накопичення включень, втрата джгутика, утворення агрегатів, виділення екзометаболітів.

Моделювання неінфекційного перитоніту у експериментальних тварин проводили за допомогою одноразового внутрішньочеревинного введення щурам ліпополісахариду (ЛПС), отриманого з *Escherichia coli* штаму 0111:В4 («Sigma», США) з розрахунку 100 мкг/кг маси тіла в 1 мл ізотонічного розчину NaCl. Було сформовано 5 груп тварин.

Група 1 (контрольна група) – інтактні тварини ( $n = 24$ ), яким вводили фізіологічний розчин паралельно до введення ЛПС тваринам інших груп. Щури з ЛПС-індукованим перитонітом були поділені на чотири групи.

Група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом ( $n = 60$ ), які не піддавалися світловому впливу – група порівняння щодо світлового впливу різних довжин хвиль.

Група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом ( $n = 60$ ), які зазнавали світлової дії червоного діапазону спектру ( $\lambda = 660$  нм). Опромінювання червоним світлом проводили щодня в один і той же час вранці до годування тварин протягом 23 діб від початку експерименту. Перше опромінювання проводили через 6 годин після введення ЛПС (рис. 2.1).

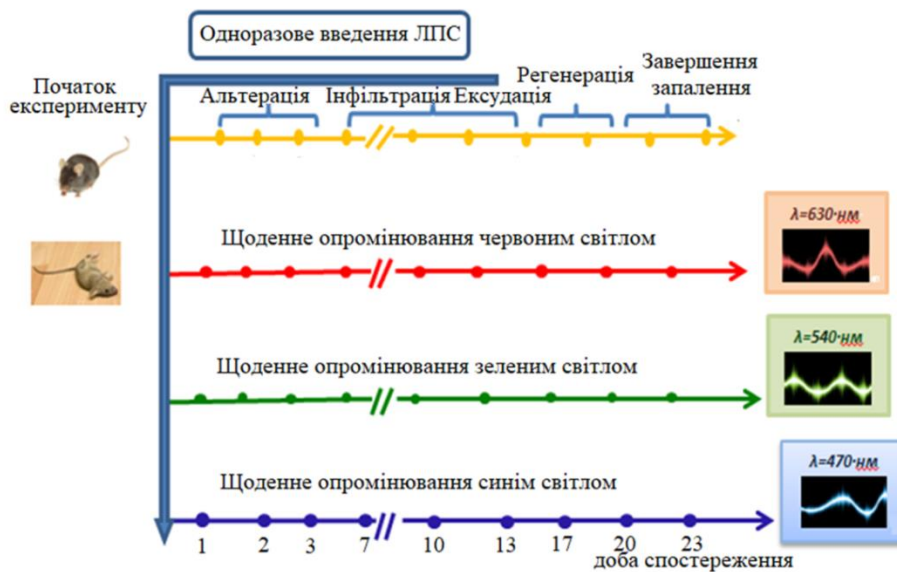


Рис. 2.1 Схема експерименту з індукції запалення та опромінювання тварин різними довжинами хвиль ( $\lambda = 660$  нм, 530 нм, 470 нм) на етапах запального процесу (експериментальна модель I)

Група 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом ( $n = 60$ ), які піддавалися світловому впливу зеленого діапазону спектру ( $\lambda = 530$  нм). Опромінювання зеленим світлом проводили щодня в один і той же час вранці до годування тварин протягом 23 діб від початку експерименту. Перше опромінювання проводили через 6 годин після введення ЛПС (рис. 2.1).

Група 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом ( $n = 60$ ), які піддавалися світловій дії синього діапазону спектру ( $\lambda = 470$  нм). Опромінювання синім світлом проводили щодня в один і той же час вранці до годування тварин протягом 23 діб від початку експерименту. Перше опромінювання проводили через 6 годин після введення ЛПС (рис. 2.1).

Світлове опромінювання зони запалення (5 хвилин на відстані 2 см від стінки очеревини) проводили відразу після виклику запалення, і далі щоденно протягом 23 днів. Для опромінювання зони патології використовували фотонні (світлодіодні) матриці Коробова А. – Коробова В. «Барва-Флекс/24ФМ», що випромінюють у червоній ( $\lambda = 660$  нм), зеленій ( $\lambda = 530$  нм) та синій ( $\lambda = 470$  нм) областях спектру [85]. Інтегральна потужність випромінювання 24 світлодіодів становила 120 мВт, щільність потужності на опромінюваній поверхні – 2,5 мВт/см<sup>2</sup>. Витримували 5-хвилинний інтервал для досягнення ідентичності дії у всіх тварин. Відповідно до послідовності та інтервалу тварини виводились з експерименту: через 6 годин після виклику запалення, та надалі через 1, 2, 3, 7, 10, 13, 17, 20 і 23 доби.

У всіх досліджуваних тварин оцінювали фізіологічні параметри (вага та температура), реакції поведінки та параметри імунітету (визначення фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів, показники гуморальної ланки імунітету) (рис. 2.2).





Рис. 2.2 Дизайн дослідження імунологічних показників у експериментальних тварин з ЛПС-індукованим перитонітом та після опромінювання різними довжинами хвиль (660 нм, 530 нм, 470 нм)

## 2.2 Характеристика зразків церію для визначення ступеню цитотоксичності

Експерименти проводили у трьох повторностях відповідно до схеми (табл. 2.1).

Таблиця 2.1

**Схема експерименту з визначення цитотоксичності наночастинок церію з використанням клітинного біоіндикатора *Dunaliella viridis***

№ п/п	Комбінації	Схема експерименту
1	Контроль <i>D. viridis</i> + фіз. розчин	50 мкл + 50 мкл
2	<i>D. viridis</i> + сироватка	50 мкл + 50 мкл
3	<i>D. viridis</i> + соль церію	50 мкл + 50 мкл
4	<i>D. viridis</i> + наночерій	50 мкл + 50 мкл
5	<i>D. viridis</i> + наночерій + сироватка	50 мкл + 50 мкл + 50 мкл

Матеріалом для дослідження слугували солі та наночастинки церію різного розміру та концентрації (табл. 2.2). Зразки люб'язно надано с.н.с, к.б.н. Жолобак Н. М. (Інститут мікробіології та вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, м. Київ).

Таблиця 2.2

### Характеристика зразків церію

Зразок	Характеристика	Концентрація	Розмір наночастинок
<b>Контроль</b>	Цитрат натрію - стабілізатор	0,1 М	-
<b>Солі церію</b>			
НДЦ(IV)	Церій (IV) гептагідрат	0,01 М	-
НДЦ(III)	Церій (III) нітрат	0,01 М	
<b>Наночастинки церію</b>			
НДЦ <sub>S</sub> 190	Водний золь nano-церію отриманий методом мікрохвильової гідротермічної обробки CeO <sub>2</sub>	0,1 М	~ 6 нм
НДЦ190	Водний золь nano-церію отриманий методом мікрохвильової гідротермічної обробки CeO <sub>2</sub>	0,01 М	~ 6 нм
ЦАН	Нано-церій, отриманий гідротермальною обробкою водним розчином амонію гексано кислоти (IV)	0,2 М	~ 3-4 нм
НДЦ16	Водний золь nano-церію, стабілізований цитратом натрію, (співвідношення наночастинок та стабілізатора 1: 1)	0,1 М	~ 2 нм

### 2.3 Характеристика суспензії екзосом стовбурових клітин

В якості джерела екзосом використовували культуру мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) плаценти. Використовували

суспензію екзосом стовбурових клітин, отриману в «Інституті клітинної терапії» (м. Київ) та люб'язно надану с.н.с., к.б.н. Лобинцевою Г. С. До переліку деяких біологічно активних факторів, які містились у зразках екзосом входили у тому числі фактори росту (тромбоцитарний фактор росту, фактор росту ендотелію судин VEGF), цитокіни (ІЛ-2, ІЛ-3, ІЛ-4), нуклеїнові кислоти (ДНК, мікроРНК).

## 2.4 Практичне застосування методів корекції запального процесу

У клініці ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії НАМН України» розроблено технологію лікування хронічних ран нижніх кінцівок на тлі цукрового діабету із застосуванням фотодинамічної терапії з подальшим нанесенням на рану синтетичного покриття полікапролактон (PCL, Nanoph) аплікацією фібринового згустку та плазми, збагаченої фактором росту. Пацієнти були оперовані у плановому порядку. У післяопераційному періоді поряд із проведенням стандартної терапії проводилося застосування розробленої комбінованої технології корекції. Було досліджено гепаринізовану кров та сироватку крові 94 пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок. До групи порівняння ( $n = 57$ , вік 51-76 років) було віднесені пацієнти з ранами, які перебували на стандартному протоколі лікування. До основної групи ( $n = 37$ ) увійшли пацієнти з цукровим діабетом II типу у віці від 58 до 80 років, яким проводили 3-кратний поетапний світловий вплив різних довжин хвиль (червоне світло  $\lambda = 660$  нм; зелене світло  $\lambda = 530$  нм; синє світло  $\lambda = 470$  нм). При застосуванні зеленого світла ( $\lambda = 530$  нм) з метою посилення ефекту регенеративних процесів додатково використовували аплікації на поверхню ураженої шкіри екзосом МСК плаценти. Використовували світлодіодні матриці Коробова А. - Коробова В. «Барва-Флекс / 24ФМ», які випромінюють у червоній ( $\lambda = 660$  нм) і зеленій ( $\lambda = 530$  нм) областях спектра [85]. Інтегральна потужність випромінювання 24 світлодіодів становила 120 мВт, щільність потужності

опромінюваної поверхні –  $2,5 \text{ мВт/см}^2$ . Витримували 5-хвилинний інтервал на відстані 2 см для досягнення ідентичності дії у пацієнтів.

Для визначення ефектів комплексного впливу (фізичний та біологічний) використовували гепаринізовану кров та сироватку крові. Визначали активність нейтрофілів в кисненезалежному та кисnezалежному фагоцитозі, ступінь лімфоцитотоксичності, ступінь цитотоксичності (в тесті з *D. viridis*) та концентрацію циркулюючих імунних комплексів.

## **2.5 Фагоцитарна активність нейтрофілів в кисненезалежному фагоцитозі**

Фагоцитарну активність нейтрофілів визначали за хемотаксисом, адгезією і ендоцитозом антигену (метод світлової мікроскопії). Хемотаксис оцінювали за показником фагоцитарного індексу (ФІ, %), який характеризував кількість нейтрофілів, що беруть участь в процесі фагоцитозу, виражених у відсотках від загальної кількості нейтрофілів крові. Адгезію оцінювали за показником фагоцитарного числа (ФЧ, ум. од.), яке відображало середню кількість клітин *Saccharomyces cerevisiae*, поглинених одним нейтрофілом. Ендоцитоз оцінювали за показником індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ, ум. од.), який відображав перетравлюючи здатність нейтрофілів, і розраховували за співвідношенням фагоцитарного числа через 30 хвилин до фагоцитарного числа через 120 хвилин. Для дослідження інкубували рівні об'єми (1 мл) лейкоцитарної завісі та суспензії дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* 30 хв, за температури  $37^{\circ}\text{C}$ , періодично струшуючи. Після інкубації готували мазки, які фіксували етиловим спиртом (96%) та фарбували за Романовським-Гімзою. Мазки промивали дистильованою водою. Проводили підрахунок 200 клітин за збільшення  $\times 1000$  [159].

## 2.6 Фагоцитарна активність нейтрофілів в киснезалежному фагоцитозі

Киснезалежний фагоцитоз оцінювали за загальною окислювально-відновною активністю ферментів нейтрофілів на стадії формування фагосоми (світлова мікроскопія). Залежно від активності окисних ферментів нейтрофілів під впливом супероксиданіону  $O_2^-$  і гідроперекису  $H_2O_2$ , що утворюються в НАДФ-Н-оксидазній реакції, досліджували реакцію відновлення нітросинового тетразолію (НСТ) у спонтанному (СП, %) та стимульованому (СТ, %) зимозаном тесті. У дві пробірки вносили 50 мкл гепаринізованої крові та 50 мкл 0,2 % розчину НСТ. У першу пробірку додавали 50 мкл фосфатно-сольового буферу (спонтанний НСТ-тест), у другу пробірку – 50 мкл завісі опсонізованого зимозану (стимульований НСТ-тест). Інкубували 30 хвилин за температури  $37^\circ C$ , після чого центрифугували за 1500 об/хв протягом 10 хвилин. Зливали надосадову рідину, осад ресуспендували. З осаду готували мазки, після висушування фіксували етиловим спиртом (96 %) та фарбували 0,1 % нейтральним червоним протягом 30 хвилин. Мазки промивали дистильованою водою. Підраховували 100 клітин (збільшення  $\times 1000$ ) та визначали кількість клітин з різним ступенем включень диформазау.

У двоваріантному НСТ-тесті оцінювали кількість клітин, які спонтанно поглинули і відновили барвник до гранул диформазау, і клітин, активованих зимозаном. Функціональний окислювально-відновний резерв фагоцитуючих нейтрофілів оцінювали за співвідношенням кількості клітин стимульованих зимозаном і диформазанпозитивних клітин, які спонтанно окислялись.

Підраховували кількість фагоцитів, які містили різну кількість окислених гранул диформазау і поділяли їх на 4 групи: a – кількість клітин з нульовою активністю, b – зі слабо-позитивною активністю, c – з позитивною активністю, d – з різко-позитивною активністю. Сума ( $a + b + c + d = 100$ ) всіх клітин, що зазнали аналізу, становила 100. Кількість

диформазаанпозитивних клітин у спонтанному (СП, %) та стимульованому (СТ, %) НСТ-тесті становила  $(b + c + d = 100 - a)$  % відповідно для кожного мазку. Інтенсивність енергетичних процесів ферментних систем фагоцитів оцінювали за середнім цитохімічним коефіцієнтом (СЦК) у спонтанній та стимульованій реакції за формулою:

$$\text{СЦК} = (1 \cdot b + 2 \cdot c + 3 \cdot d) / 100. \quad (2.1)$$

Індекс стимуляції (ІС), який свідчив про інтегральну бактерицидну активність клітин, обчислювали за формулою:

$$\text{ІС} = \text{СТ \%} / \text{СП, \%}. \quad (2.2)$$

За допомогою НСТ-тесту за співвідношенням спонтанної та індукованої зимозаном здатності НАДФ-Н-ферментів окислювати внутрішньоклітинний субстрат оцінювали окисний резерв киснезалежного фагоцитозу. Розміри диформазаанових включень є показником сумарної активності НАДФ-Н-оксидази, яка ініціює процес стимуляції фагоциту [160].

## 2.7 Виділення лімфоцитів з гепаринізованої крові

Гепаринізовану кров (5000 од/мл) розводили у співвідношенні 1:1 буферним розчином (рН = 7,4: NaCl, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Отриманий матеріал нашаровували в пластикові пробірки для усунення прилипання клітин до скла на 2 мл розчину фікол-верографін (щільність 1,077). Проводили осадження клітин, які проходили через градієнт щільності шляхом центрифугування протягом 25 хвилин при 1500 об/хв. Зливали над осадову рідину та з верхньої межі відбирали утворене «лімфоцитарне кільце» у чисту пробірку. До виділеної суспензії лімфоцитів додавали 6 мл буферного розчину (рН = 7,4), перемішували та центрифугували 10 хвилин при 1500 об/хв. для відмивання клітин від розчину фікол-верографін. Потім

знову до осаду додавали 6 мл буферного розчину (рН = 7,4) та центрифугували 10 хвилин при 1500 об/хв. Підраховували кількість клітин в 1 мл та розводили їх до кінцевої концентрації  $2 \cdot 10^6$  клітин в 1 мл, життєздатність яких була не менше ніж 95-98 % [161].

## **2.8 Визначення ступеня лімфоцитотоксичності**

Ступінь лімфоцитотоксичності визначали за методом Терасакі [162] за цитотоксичним ефектом компонентів аутосироватки на аутолімфоцити у присутності екзогенного комплекменту. Лімфоцитотоксичність визначали за ступенем деструкції клітинних мембран лімфоцитів після їх інкубації з аутосироваткою у присутності білків комплекменту. Реакцію здійснювали з використанням виділених в градієнті щільності  $1,077 \text{ г/см}^3$  фікол – верографін лімфоцитів периферичної крові об'ємом 100 мкл (клітин до  $10^6$ ) і сироватки крові об'ємом 100 мкл із додаванням до інкубованої суспензії 50 мкл комплекменту морської свинки для отримання взаємодіючих компонентів антиген + антитіло + комплекмент (АГ + АТ + К). Інкубували 15 хвилин, після чого додавали по 20 мкл барвників еозину та метиленового синього. Через 2 години під світловим мікроскопом (збільшення  $\times 400$ ) проводили підрахунок 100 клітин, серед яких відмічали клітини із зруйнованою інтенсивно забарвленою мембраною (мертві клітини) і живі нефарбовані клітини. За співвідношенням забарвлених і незабарвлених клітин оцінювали ступінь лімфоцитотоксичності.

## **2.9 Визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів**

Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), які представляють собою асоціацію між антигеном, антитілами і комплекментом, оцінювали спектрофотометрично (СФ-46) після інкубації зразків сироватки в боратному буфері і поліетиленгліколі при кімнатній температурі [163]. В дві пробірки вносили по 100 мкл сироватки крові і додавали по 200 мкл боратного буферу.

В першу пробірку (контрольну) додавали 2,7 мл, а в другу пробірку вносили 2,7 мл розчину 4,2% ПЕГ 6000. Інкубували 1 годину за кімнатної температури. Після інкубації визначали оптичну густину зразків спектрофотометрично за довжини хвилі  $\lambda = 450$  нм проти боратного буферу.

### **2.10 Визначення проліферативної активності лейкоцитів в культурі *in vitro***

Проліферативну активність лейкоцитів визначали в культурі *in vitro* з використанням екзосом. У стерильні флакони вносили по 4 мл середовища 199 і 0,5 мл інактивованої ембріональної телячої сироватки. Потім додавали по 40 мкл гепаринізованої крові. У культуру «А» додавали 100 мкл стерильного 0,9% розчину NaCl, в культуру «В» вносили 100 мкл мітогену фітогемагглютиніну (ФГА), в культуру «С» вносили 100 мкл культурального середовища, що містили екзосоми з екзометаболітами мезенхімальних стовбурових клітин. Після 72-годинної інкубації лімфоцитів при температурі 37<sup>0</sup>С вміст флаконів центрифугували при 1500 об/хв, після чого видаляли надосадову рідину. Фіксували сумішшю 96% етилового спирту та крижаної оцтової кислоти у співвідношенні 3:1. Після 10-хвилинної експозиції пробірки повторно центрифугували, триразово відмивали від клітинного дебрису, з осаду готували препарати, дозуючи осад на скло. Препарати висушували 24 години, фарбували за Романовським-Гімзою протягом 30 хв. Підраховували кількість малих та великих лімфоцитів з використанням світлової мікроскопії (збільшення x1000). Вміст великих лімфоцитів виражали у відсотках від загальної кількості лімфоцитів [164].

### **2.11 Метод визначення цитотоксичності за допомогою біоіндикатору *Dunaliella viridis***

Оцінку можливої цитотоксичності визначали у 20-добовій культурі *D. viridis* у концентрації 15 млн. клітин на 1 мл. Мікрководорості культивували



на середовищі Артарі у модифікації Масюк (NaCl – 116 г/л, MgSO<sub>4</sub> – 50 г/л, KNO<sub>3</sub> – 2,5 г/л, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,2 г/л) за температури 25-27 °С та при цілодобовому освітленні 6 клк. Для оцінки можливої цитотоксичності біологічної рідини в лунки планшета вносили в рівних об'ємах (по 50 мкл) завись одноклітинної водорості *D. viridis* і зразки. Підрахунок змінених клітин проводили на предметному склі під світловим мікроскопом за збільшення х400 [165]. Інтегральні показники цитотоксичності визначали як коефіцієнт спонтанної цитотоксичності (К<sub>сп</sub>) для контрольної культури та коефіцієнт індукованої цитотоксичності (К<sub>ц</sub>) для досліджуваних зразків.

Коефіцієнт спонтанної цитотоксичності розраховували за формулою (2.3):

$$K_{\text{сп}} = \frac{a + b + c + d + e + f}{n}, \quad (2.3)$$

де різні види цитотоксичного ефекту позначені буквами: а – зміни форми клітини, 1 бал; b – накопичення включень, 2 бали; с – втрата джгутика, 3 бали; d – зміни характеру та напрямку руху (втрата рухливості), 4 бали; e – утворення агрегатів, 5 балів; f – виділення екзометаболітів, 6 балів; n – кількість видів морфо-функціональних змін, що спостерігаються. У разі відсутності будь-яких порушень у чисельнику залишаються лише виявлені порушення з відповідними їм балами. За відсутності певного виду порушень його значення позначали як «0».

Коефіцієнт індукованої цитотоксичності (для досліджуваного зразку) визначали за формулою (2.4):

$$K_{\text{ц}} = \left( \frac{a + b + c + d + e + f}{n} - K_{\text{сп}} \right) \cdot \frac{1}{K_{\text{сп}}}. \quad (2.4)$$

## 2.12 Статистична обробка результатів дослідження

Для статистичної обробки результатів досліджень використовували параметричні та непараметричні методи варіаційної статистики з урахуванням перевірки показників на нормальний розподіл. Для характеристики отриманих вибірок використовували середнє значення показників ( $M$ ), стандартне квадратичне відхилення ( $SD$ ), стандартну помилку середнього ( $m$ ), обсяг вибірки. Статистичну достовірність відмінностей між двома групами даних, які не піддавались нормальному розподілу оцінювали за допомогою непараметричного критерію U-критерій Манна-Уїтні (для малих і середніх вибірок,  $n \leq 30$ ); для даних, які відповідали закону нормального розподілу використовували параметричний критерій Стюдента. Аналіз та графічне оформлення результатів проводили за допомогою Microsoft Office Excel 2010 та Statistica 10 (Statsoft, USA). Відмінності між даними контрольних і експериментальних варіантів вважали достовірними при рівні значущості  $p < 0,05$ .

### Висновки до розділу 2

У роботі був розроблений дизайн дослідження в якому передбачалося використання трьох експериментальних моделей: моделювання неінфекційного перитоніту після введення ЛПС у 3-місячних щурів та їх багаторазове опромінювання світлом з різними довжинами хвиль ( $\lambda = 660$  нм, 530 нм, 470 нм) на різних етапах запального процесу; культура лейкоцитів периферичної крові *in vitro* для оцінки проліферативного потенціалу клітинного матеріалу пацієнтів із хронічними запальними процесами; культура одноклітинної водорості *Dunaliella viridis* (біоіндикаторна тест-система) для дослідження цитотоксичної активності наночастинок діоксиду церію різної концентрації та різних розмірів. Наведено методи, які використовували в роботі: фізіологічний, світлова мікроскопія, спектрофотометрія.

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1 Ефекти після світлового впливу різних довжин хвиль на процеси запальної реакції та регенерації у експериментальних тварин

##### 3.1.1 Зміни фізіологічних параметрів у експериментальних тварин на тлі ЛПС-індукованого перитоніту (експериментальна модель I)

У всіх тварин оцінювали динамку ваги та температури до початку та протягом усього експерименту. Температура тіла в інтактних тварин залишалася на рівні фізіологічних значень протягом всього періоду досліджень. У експериментальних тварин з ЛПС-індукованим перитонітом у ранні терміни після введення ЛПС спостерігали зміни фізіологічних характеристик: температура тіла щурів поступово підвищувалася, і досягла максимальних значень ( $38,6 \pm 0,3$ ) °C на третю добу експерименту. З сьомої до десятої доби відзначали незначне зниження в середньому до 37 °C, проте субфебрильна температура зберігалася у тварин до останнього дня експерименту (рис. 3.1).

У тварин з ЛПС-індукованим перитонітом дія червоного світла (група 3) викликала більш інтенсивне підвищення температури порівняно з групою 2 (тільки введення ЛПС) у терміни від початку експерименту до 10-ї доби включно, а в період з 13-ї та до 20-ї доби температура у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом та опромінюванням червоним світлом, була нижчою загалом на 0,5 °C.

Вплив зеленого світла на щурів з ЛПС-індукованим перитонітом (група 4) викликав менш інтенсивну пірогенну реакцію в порівнянні з групами 2 та 3. Однак на тлі впливу синього світла (група 5) інтенсивність підвищення температури при запальній реакції, індукованій введенням ЛПС, була незначною (рис. 3.1).

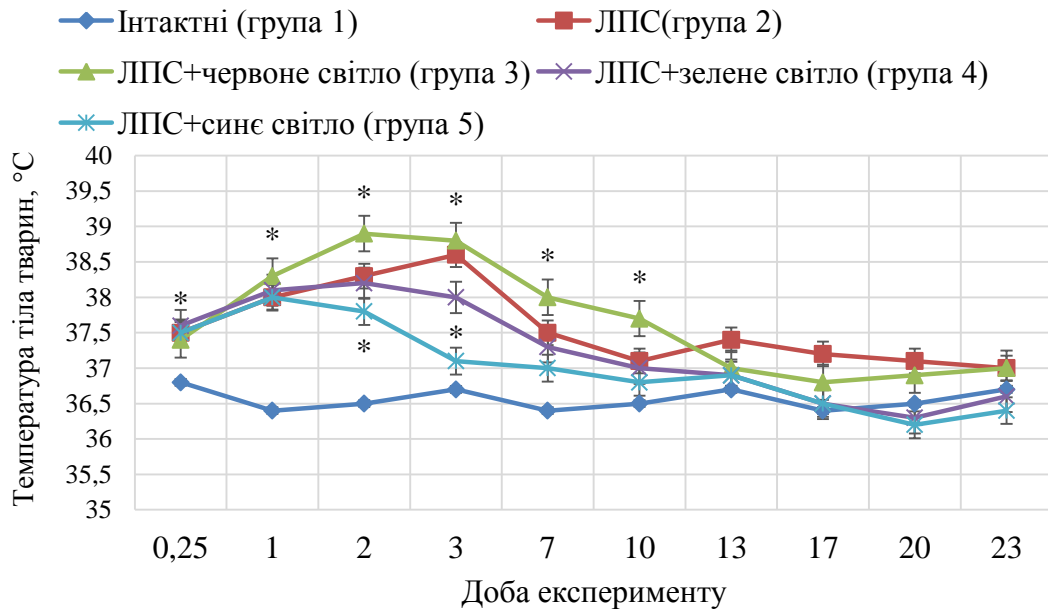


Рис. 3.1 Динаміка температури тіла у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали червоним світлом ( $\lambda = 630$  нм); група 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм); група 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали синім світлом ( $\lambda = 470$  нм); кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \*  $p < 0,05$  у порівнянні з інтактними тваринами (група 1)

Слід зазначити, що у тварин на тлі підвищення температури відзначали зниження поведінкових реакцій, апетиту що позначалося на зміні маси тіла (рис. 3.2).

Максимальне зниження маси протягом усього періоду експерименту виявили у групі тварин з ЛПС-індукованим перитонітом. Ці тварини втрачали до 34 % маси тіла на 10-17-у добу експерименту. Менш виражені зміни динаміки середньої маси тварин спостерігали в групах 4 і 5 під час застосування зеленого і синього світла відповідно (рис. 3.2).

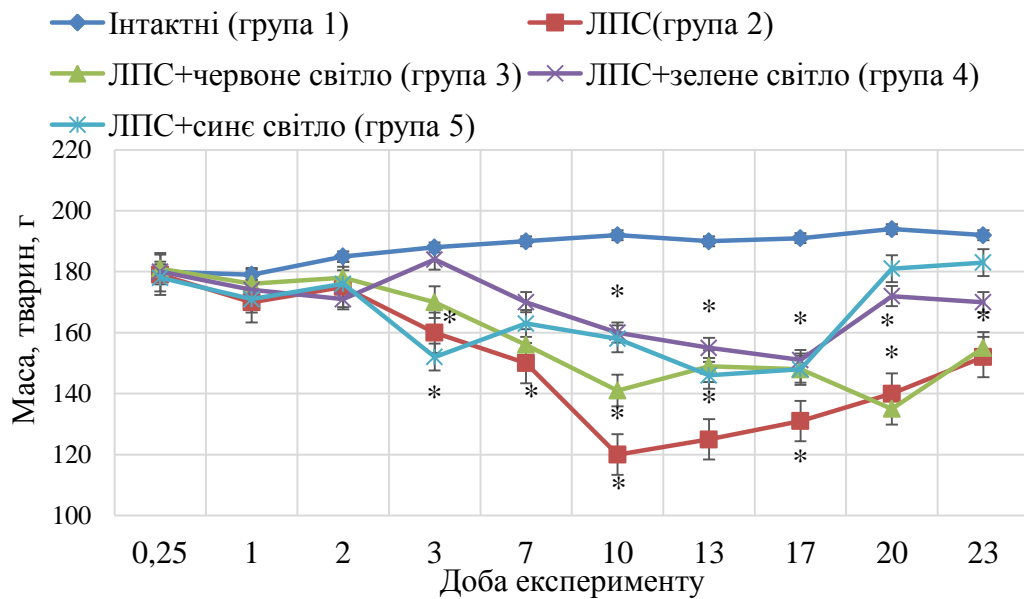


Рис. 3.2 Динаміка маси тіла у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали червоним світлом ( $\lambda = 630$  нм); група 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм); група 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали синім світлом ( $\lambda = 470$  нм); кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \*  $p < 0,05$  у порівнянні з інтактними тваринами (група 1)

Таким чином, у групах тварин з індукованим перитонітом спостерігались зміни як терморегуляції, так і маси. Внутрішньочеревне введення тваринам ЛПС викликало розвиток запальної реакції, що супроводжувалася підвищенням температури тіла тварин на початкових стадіях розвитку перитоніту, пригніченням поведінкових реакцій, зниженням апетиту, і в результаті викликало зниження маси тіла. Слід зазначити, що до термінальної експериментальної точки, яка відповідає 23-й добі, ці параметри не відновлювалися до значень фізіологічної норми.

Застосування світла різних довжин хвиль – червоного ( $\lambda = 660$  нм), зеленого ( $\lambda = 530$  нм), синього ( $\lambda = 470$  нм) по-різному впливало на динаміку

температури, що виражалось вищими (порівняно з групою 2 – введення ЛПС без дії світла) значеннями цих показників на ранній стадії запального процесу – стадії альтерації та інфільтрації під дією червоного світла (група 3); більш інтенсивне зниження температури під впливом синього світла на стадії проліферації (група 5). Дія зеленого і синього світла дозволила нівелювати значне зниження ваги тварин, яке ми спостерігали в групі тварин з ЛПС-індукованим перитонітом без світлового впливу (група 2) та після дії червоного світла (група 3).

### **3.1.2 Бар'єрна функція фагоцитів у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель I) протягом запальної реакції після світлового впливу червоного діапазону спектру ( $\lambda = 660$ нм)**

Видиме низькоінтенсивне червоне світло має здатність змінювати функціональний стан тканин і органів організму [166], і відповідно може впливати на перебіг запального процесу. Однак, не відомо, який саме ефект мають фотони світла на імунні фактори реактивності та резистентності організму на різних стадіях запального процесу. Першими імунними клітинами захисту, які відіграють важливу роль у запуску запалення й активно функціонують протягом запального процесу є клітини-фагоцити. Фагоцитоз здійснюється макрофагами, нейтрофільними гранулоцитами і дендритними клітинами. Мішенями фагоцитів є інфекційні агенти і змінені соматичні клітини організму, залишки некротичних і апоптичних клітин [167].

Дослідження фагоцитарної ланки імунітету у експериментальних тварин після індукції перитоніту введенням ЛПС (група порівняння – група 2) та в динаміці після світлової дії червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм) (група 3) виявило різноспрямовані зміни показників кисненезалежного фагоцитозу. У тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (група 2) після одноразового введення ЛПС на першій стадії запального процесу – на

стадії альтерації, яка у нормальному фізіологічному стані триває починаючи з першої години і до третьої доби, спостерігали зниження фагоцитарного індексу (ФІ) до  $(76,7 \pm 3,3) \%$  при  $(83,0 \pm 2,1 \%)$  у інтактних тварин (група 1). У період з 7-ої по 10-ту добу (на стадії ексудації та регенерації запального процесу) у тварин з індукованим перитонітом групи 3 цей показник знизився до мінімальних значень  $(62,3 \pm 2,1) \%$  і лише на 13-ту добу активність нейтрофілів почала підвищуватися. На стадії проліферації до 23-ої доби від початку експерименту, функції хемотаксису та адгезії нейтрофільних гранулоцитів підвищилися, при цьому ФІ збільшився до  $(71,5 \pm 10,3) \%$ , проте рівня контрольних значень у групі інтактних тварин не досягав (рис. 3.3).

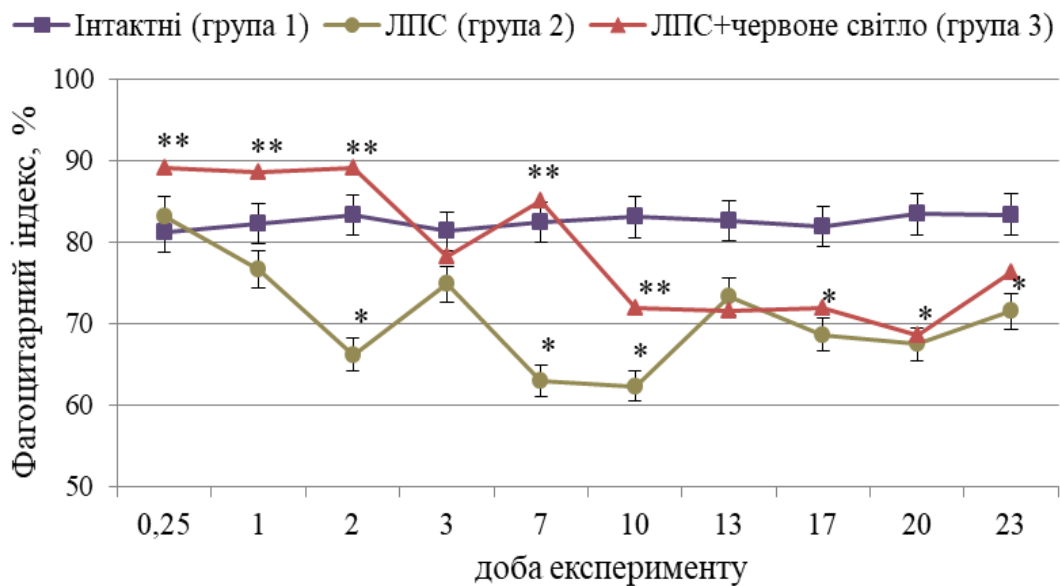


Рис. 3.3 Зміна фагоцитарного індексу (ФІ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 3 ( $p < 0,05$ )

Вплив червоного світла ( $\lambda = 660$  нм) у тварин групи 3 після одноразового введення ЛПС на першій стадії запального процесу посилював інфільтрацію та альтерацію, що супроводжувалося збільшенням рівня ФІ у порівнянні з тваринами з індукованим перитонітом (група 2). Починаючи з 10-ої по 20-ту добу, на другій стадії регенерації та ексудації в осередку запалення функції хемотаксису та адгезії нейтрофільних гранулоцитів пригнічувались в середньому на 10 % щодо першої запальної стадії, але були вищими, ніж у групі порівняння (група 2). До 23-ої доби, на завершальній стадії запального процесу – проліферації, активність нейтрофілів у тварин з індукованим перитонітом була вищою ( $76,3 \pm 5,3$  %), ніж у групі порівняння (групі 2) – ( $71,5 \pm 3,9$  %) (рис. 3.3).

У тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (група 2) вже через 6 годин від початку введення флогогенного фактора і на другу добу різко зросла поглинальна здатність нейтрофільних гранулоцитів, про що судили за значеннями фагоцитарного числа (ФЧ), яке відображає середню кількість клітин *Saccharomyces cerevisiae*, поглинених одним нейтрофілом (рис. 3.4). Від 3-ої і до 10-ої доби включно поглинальна здатність фагоцитів була пригнічена, про що свідчило дворазове зниження ФЧ (рис. 3.4). Такою ж низькою в цій групі тварин (група 2) з ЛПС-індукованим перитонітом була поглинальна функція фагоцитів і на 17-у добу експерименту, і лише на завершальній стадії запалення значення ФЧ нормалізувалося до ( $3,46 \pm 0,21$ ) ум. од.

В групі тварин з ЛПС-індукованим перитонітом після опромінювання червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм) (група 3) ФЧ було нижче, ніж у групі порівняння. Мінімальне значення цього показника ( $(2,7 \pm 0,3)$  ум. од.) виявили на 2-у добу експерименту. Починаючи з 3-ої доби спостерігали помірне підвищення ФЧ, і на 13-ту добу поглинальна здатність фагоцитів під впливом червоного світла збільшилася до значення ( $4,39 \pm 0,24$ ) ум. од. при ( $3,67 \pm 0,12$ ) ум. од. групи порівняння (рис. 3.4).



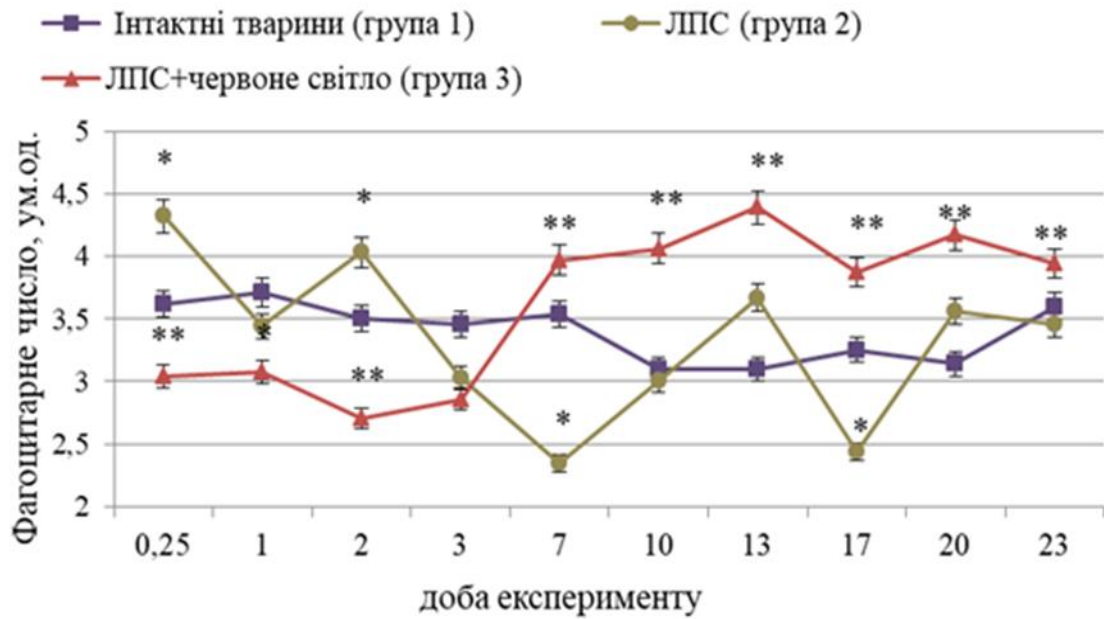


Рис. 3.4 Динаміка змін фагоцитарного числа (ФЧ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 3 ( $p < 0,05$ )

Перетравлююча здатність нейтрофілів, про яку судили за індексом завершеності фагоцитозу (ІЗФ) у групі тварин з ЛПС-індукованим перитонітом без світлового впливу (група 2), починаючи з 2-ої до 7-ої доби знижувалася відносно рівня у інтактних тварин (група 1), а мінімальне значення цього показника спостерігали на 7-му добу ( $0,83 \pm 0,02$ ) ум. од. (рис. 3.5). На 10-ту добу перетравлююча здатність нейтрофільних гранулоцитів зросла до ( $1,05 \pm 0,2$ ) ум. од., і, починаючи, з 10-ої до 23-ої доби показник ІЗФ знижувався до ( $0,93 \pm 0,02$  ум. од. у порівнянні з інтактними тваринами (група 1).

Після дії червоного світла ( $\lambda = 660$  нм) у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (група 3) на 3-у добу експерименту здатність фагоцитів до

ендоцитозу була максимальною і становила ( $1,49 \pm 0,02$ ) ум. од., що свідчить про активацію фагоцитозу на стадії альтерації. Вплив червоного світла викликав різке зростання ІЗФ з 17-ої по 20-ту добу, значення якого було на 27 % був вищим, ніж у групі 2 (рис. 3.5).

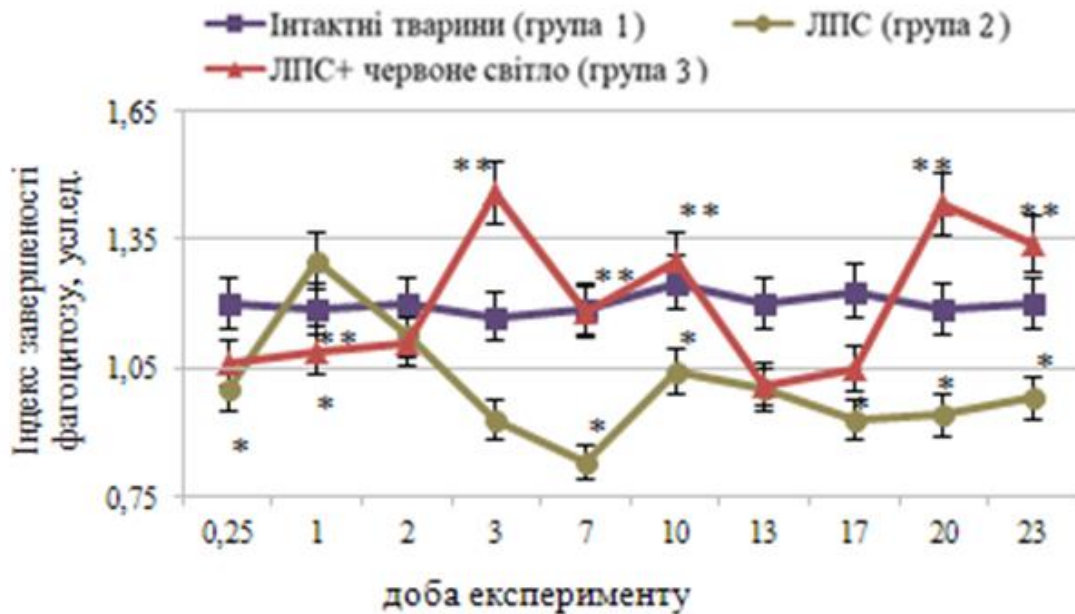


Рис. 3.5 Динаміка змін індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 3 ( $p < 0,05$ )

Таким чином, при ЛПС-індукованому перитоніті у експериментальних тварин виявили дефіцит функції хемотаксису, адгезії та ендоситозу, про що судили за зниженими показниками ФІ, ФЧ та ІЗФ. Опромінювання червоним діапазоном спектра ( $\lambda = 660$  нм) надавало позитивну стимуляцію хемотаксису та адгезивних властивостей фагоцитів,

що важливо для ефективного завершення першої стадії запального процесу – інфільтрації та альтерації.

Відома важлива роль активних форм кисню (АФК) на різних стадіях запалення. Супероксидний аніон-радикал, який виділяється активними фагоцитами, гідроксильні радикали, пергідроксил, надають як бактерицидну дію щодо флогогенного фактора запалення, так і погіршують процеси альтерації тканин в осередку [93]. Тому, було важливим з'ясувати, як вплив червоного діапазону спектру ( $\lambda = 660$  нм) змінює киснезалежні процеси, які відбуваються у нейтрофілах на різних стадіях запалення. У тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (група 2) виявили достовірне посилення спонтанних окисних реакцій протягом всього експерименту (рис. 3.6).

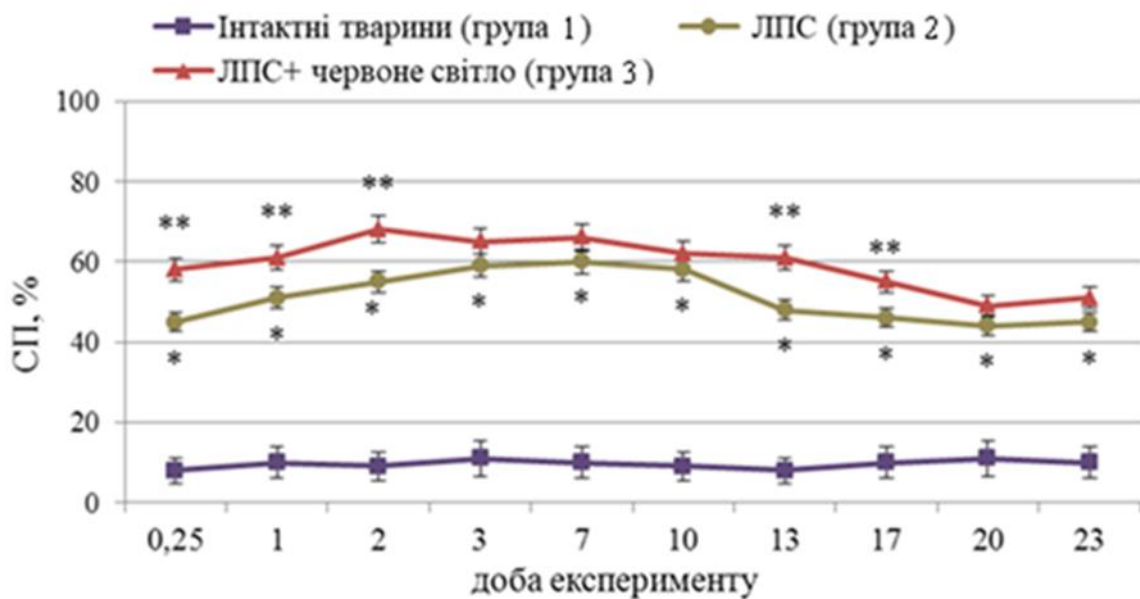


Рис. 3.6 Динаміка змін спонтанного НСТ-тесту (СП) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 3 ( $p < 0,05$ )

Спонтанна активність супероксиданіону  $O^{2-}$  і гідроперекису  $H_2O_2$ , що утворюються фагоцитами в НАДФ-Н-оксидазній реакції, посилювалася у тварин під впливом червоного світла ( $\lambda = 660$  нм). Вірогідне збільшення значень спонтанного НСТ-тесту (СП) виявили на першій стадії запального процесу (рис. 3.6).

Стимульована зимозаном реакція відновлення нітросинього тетразолію (СТ) у тварин групи з ЛПС-індукованим перитонітом також достовірно відрізнялася від групи 1 інтактних тварин на всіх етапах запальної реакції (рис. 3.7).

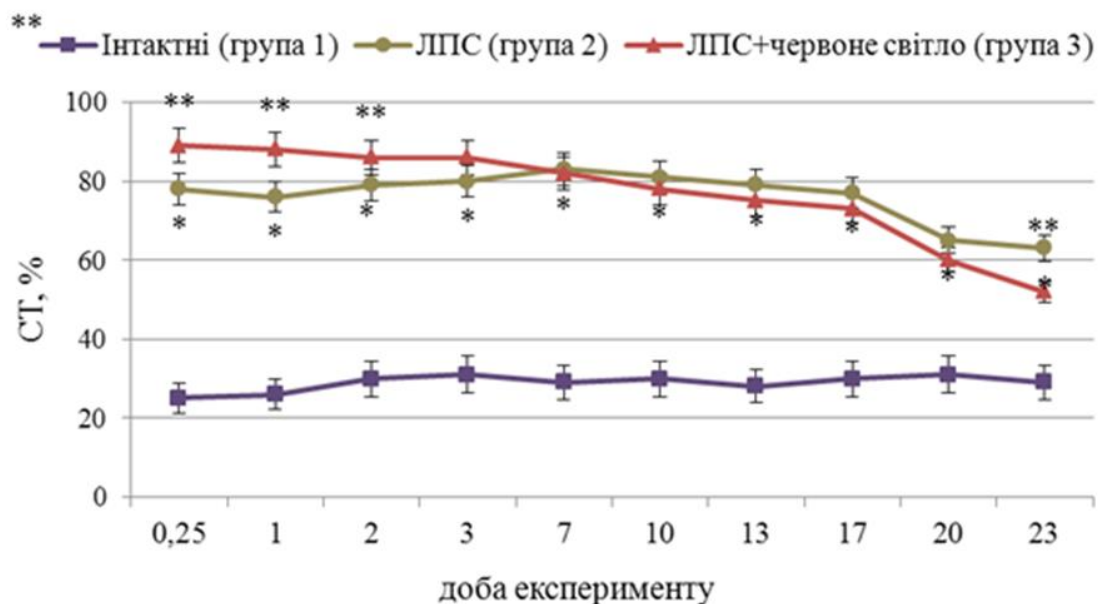


Рис. 3.7 Динаміка змін стимульованого НСТ-тесту (СТ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 3 ( $p < 0,05$ )

Дія червоного світла викликала посилення окисних реакцій у стимульованому НСТ-тесті (СТ) вже через 6 годин від моменту введення

ЛПС і до 2-ої доби експерименту, що відповідає першій стадії запалення – стадії інфільтрації та альтерації.

Індекс стимуляції (ІС), який свідчить про інтегральну бактерицидну активність фагоцитуючих клітин, був достовірно знижений у тварин групи 2 (ЛПС-індукований перитоніт) на всіх етапах експерименту, а також у тварин групи 3 (ЛПС-індукований перитоніт та дія червоного світла) на ранніх стадіях запальної реакції та на стадії завершення ексудації та регенерації у запальному вогнищі (рис. 3.8).

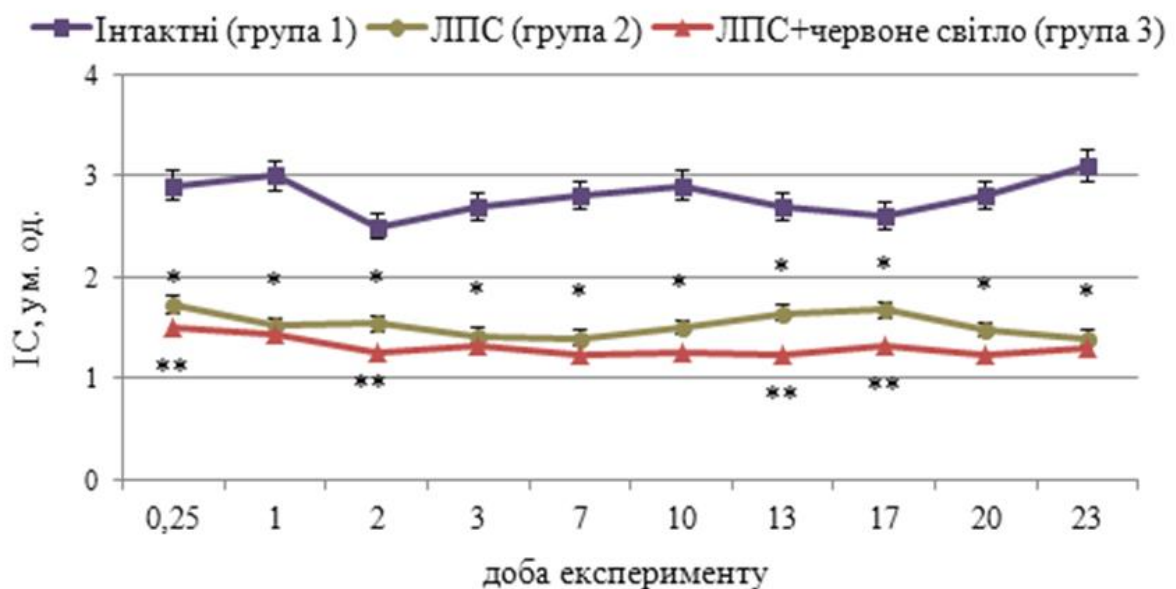


Рис. 3.8 Динаміка змін індексу стимуляції (ІС) у НСТ-тесті у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 3 ( $p < 0,05$ )

Таким чином, на експериментальній моделі тварин з ЛПС-індукованим перитонітом було виявлено зниження функції хемотаксису, адгезії та

ендоцитозу фагоцитуючих клітин та посилення їх спонтанної окисної активності в реакціях киснезалежного фагоцитозу. При застосуванні червоного світла ( $\lambda = 660$  нм) функціональна активність фагоцитуючих клітин у кисненезалежному фагоцитозі підвищувалася, отже червоне світло посилювало властивості хемотаксису і адгезії, а також спонтанні окислювально-відновні реакції в нейтрофільних гранулоцитах, сприяючи ефективності перебігу початкової стадії.

### **3.1.3 Гуморальні показники у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель I) протягом запальної реакції після світлового впливу червоного діапазону спектру ( $\lambda = 660$ нм)**

При запаленні відбувається цілий каскад реакцій за участю різних гуморальних факторів – цитокінів, хемокінів, інтерферонів, імуноглобулінів, при цьому відбувається вивільнення різних цитотоксичних факторів [12]. Для їх визначення використовували метод Терасакі – лімфоцитотоксичний тест, який дозволяє оцінити динаміку рівня мембранотропних цитотоксичних факторів на різних стадіях запальної реакції.

Виявили достовірне збільшення лімфоцитотоксичності (ЛЦТ) з 2-ої по 10-ту добу, в середньому на 53%, і в період з 17-ої по 23-ту добу – в 2,5 рази в групі тварин з індукованим перитонітом (група 2) в порівнянні з показником ЛЦТ в групі інтактних тварин (група 1). Така динаміка може бути наслідком зростання кількості факторів опсонізації патогенних антигенів, що утворюються в результаті розвитку першої фази запального процесу в черевній порожнині у тварин з перитонітом (рис. 3.9).

Оскільки імунологічні процеси представляють собою зміну періодів активації і зниження функцій імунних факторів при розвитку запального процесу, то індукція фаз інфільтрації і ексудації за рахунок ЛПС максимально відбувалася відразу через 6 годин після введення антигену. Як на 3-7-му добу розвитку запального процесу, так на 1-13-у добу розвитку

індукованого перитоніту спостерігали нівелювання запальної реакції за рахунок активації кисненезалежного фагоцитозу нейтрофілів, який здійснював ендоцитоз цитотоксичних антигенів. Максимальне збільшення ЛЦТ спостерігали на 20-ту добу у експериментальних тварин з ЛПС-індуковим перитонітом (група 2) (рис. 3.9).

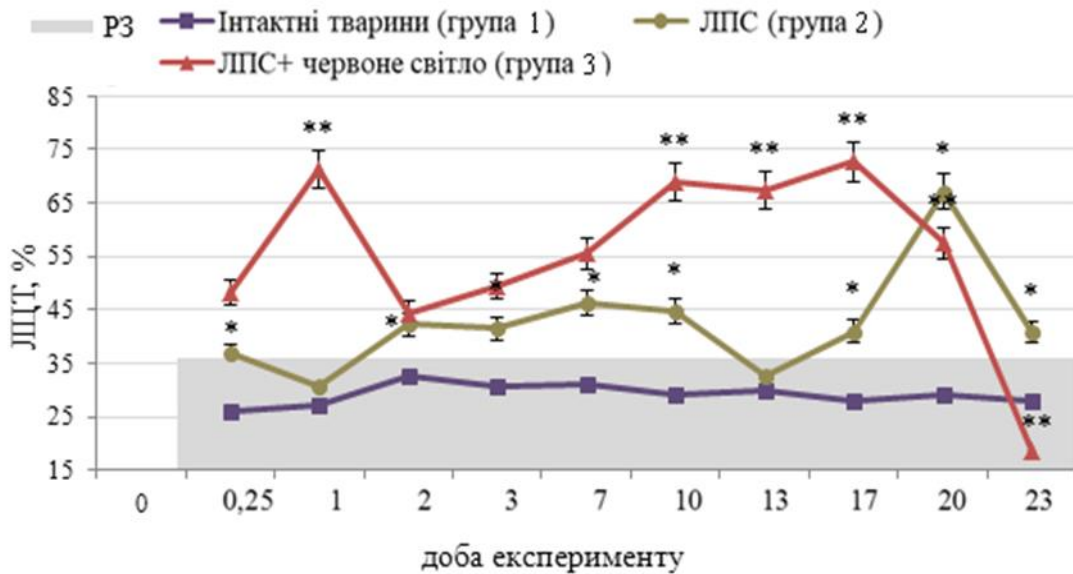


Рис. 3.9 Динаміка зміни ступеню лімфоцитотоксичності (ЛЦТ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 3 ( $p < 0,05$ )

Щоденне опромінювання тварин червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм) в групі 3 викликало періодичну активацію утворення і накопичення цитотоксичних факторів сироватки крові вже через 6 годин після індукції перитоніту. У періоди зниження рівня ЛЦТ в групі тварин 2, в групі 3 після опромінювання червоним світлом на 1-у добу спостерігали позитивну максимальну активацію ЛЦТ до  $(71,3 \pm 3,4)$  %, що у 2 рази більше, ніж у групі порівняння

(група 2), очевидно за рахунок збільшення і накопичення опсонізуючих факторів і утворення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК). На другу добу рівень мембранотропних цитотоксичних факторів різко знизився і не відрізнявся від такого у групі з індукованим перитонітом без опромінювання (група 2).

У подальшому з третьої доби спостерігали збільшення відмінностей ЛЦТ між групою 3 після опромінювання червоним світлом і групою 2 (індуковане запалення без опромінювання) на 7-у добу від 10 % і до 40 % на 20-у добу. На 23-у добу на тлі нівелювання запального процесу в черевній порожнині у експериментальних тварин виявили різку елімінацію цитотоксичних чинників до нижньої межі референтних значень. Вплив червоного світла на заключному етапі експерименту призводив до нормалізації показника ЛЦТ, а отже, до зниження рівня мембранотропних цитотоксичних факторів.

Максимально високі значення рівня ЛЦТ свідчать про накопичення факторів, що опсонізують, і утворення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), які ми також визначали у досліджуваних тварин різних експериментальних груп.

Концентрація ЦІК, що утворюються при взаємодії антитіл, антигенів та білків системи комплементу, стимулюють імунну відповідь, у інтактних тварин склала  $(69,25 \pm 8,6)$  од. Е. У нормі ЦІК швидко елімінуються з крові завдяки фагоцитозу. У тварин з індукованим неінфекційним перитонітом (група 2) концентрація ЦІК підвищувалася з 1-ої доби дослідження та залишалася високою до 23-ої доби (табл. 3.1).

Опромінювання тварин червоним світлом після введення ЛПС (група 3) призводило до коливань концентрації ЦІК, починаючи з 1-ої доби, після чого до 7-ої доби відзначали зниження цього показника в середньому на 30 %. На 10-ту добу виявили 2-й пік високого вмісту ЦІК, потім до 13-ої доби – повторне зниження значення на 50 %. До 17-ої доби відзначали 3-й пік



зростання концентрації ЦК, а максимальне значення даного показника виявили на 23-тю добу ( $166,8 \pm 22,8$ ) од. Е (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦК) у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом та тварин з ЛПС-індукованим перитонітом та після опромінювання червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм)**

Строки експерименту, доба	Концентрація ЦК, од. Е (М + m)	
	ЛПС-індукований перитоніт (група 2)	ЛПС-індукований перитоніт, червоне світло ( $\lambda = 660$ нм) (група 3)
0,25	$35,7 \pm 13,7^{*/**}$	$68,0 \pm 6,3^{**}$
1	$65,0 \pm 20,4^{**}$	$117,1 \pm 11,8^{*/**}$
2	$42,8 \pm 6,8^{*/**}$	$70,3 \pm 10,6^{**}$
3	$70,5 \pm 9,1$	$68,5 \pm 6,3$
7	$73,0 \pm 13,0$	$86,3 \pm 5,9$
10	$77,0 \pm 10,4^{**}$	$129,0 \pm 13,6^{*/**}$
13	$77,8 \pm 12,8$	$60,5 \pm 5,4$
17	$85,7 \pm 24,3$	$116,5 \pm 19,4^*$
20	$87,1 \pm 17,0$	$88,5 \pm 7,9$
23	$69,1 \pm 12,2^{**}$	$166,8 \pm 22,8^{*/**}$

Примітка: концентрація ЦК в групі інтактних тварин ( $69,35 \pm 8,6$ ) од. Е; \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 3 ( $p < 0,05$ )

### 3.1.4 Бар'єрна функція фагоцитів у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель I) протягом запальної реакції після світлового впливу зеленого діапазону спектру ( $\lambda = 530$ нм)

Як описано раніше, у групі тварин з індукованим перитонітом після одноразового введення ЛПС фагоцитарний індекс, який характеризує кількість клітин, що беруть участь у фагоцитозі, знижувався на 2-у, 7-у, 10-у та 20-ту добу відносно групи інтактних тварин. Після впливу світла зеленого діапазону спектру ( $\lambda = 530$  нм) здатність захоплювати бактеріальні клітини, починаючи з 3-ої доби, була вищою в групі тварин з ЛПС-індукованим перитонітом та дією зеленим світлом у порівнянні з групою тварин з ЛПС-індукованим перитонітом без світлового впливу (рис. 3.10).

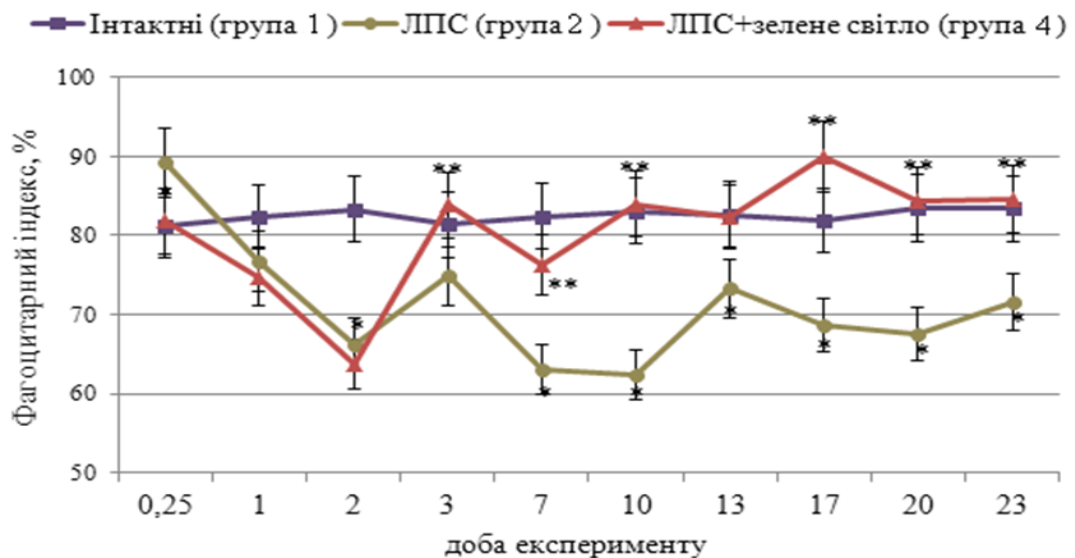


Рис. 3.10 Динаміка змін фагоцитарного індексу (ФІ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 4 ( $p < 0,05$ )

З 7-ої доби після опромінювання тварин зеленим спектром світлового діапазону ( $\lambda = 530$  нм) спостерігали позитивну активацію фагоцитарного числа (ФЧ), яке було достовірно знижено після введення ЛПС через 6 годин і до 3-ої доби та на 23-у добу (рис. 3.11).

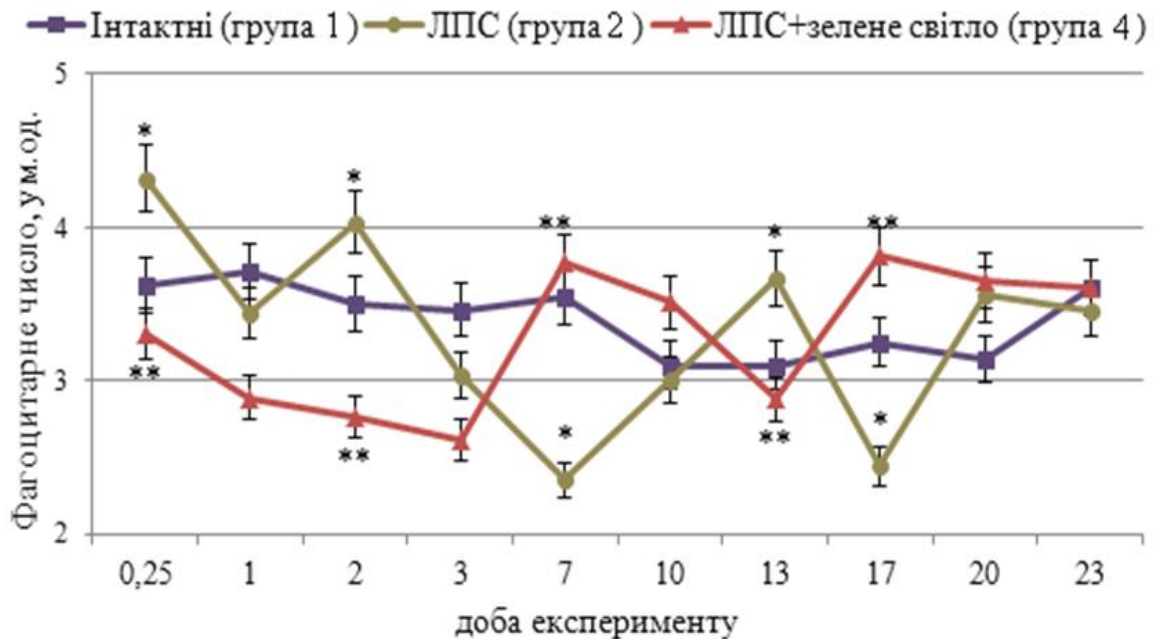


Рис. 3.11 Динаміка змін фагоцитарного числа (ФЧ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 4 ( $p < 0,05$ )

Індекс завершеності фагоцитозу на перший день експерименту у групі тварин з індукованим перитонітом після опромінювання зеленим світлом (група 4) був вищим порівняно зі здатністю фагоцитів до ендоцитозу у групі тварин з індукованим перитонітом без світлового впливу (група 2). Максимальне збільшення цього показника спостерігали на 7 добу.

У тварин, яким застосовували зелений діапазон світлового спектру (група 4), спостерігали повну ліквідацію альтерації та ексудації в черевній порожнині та прискорення регенеративних процесів, про що судили за індексом завершеності фагоцитозу (рис. 3.12).

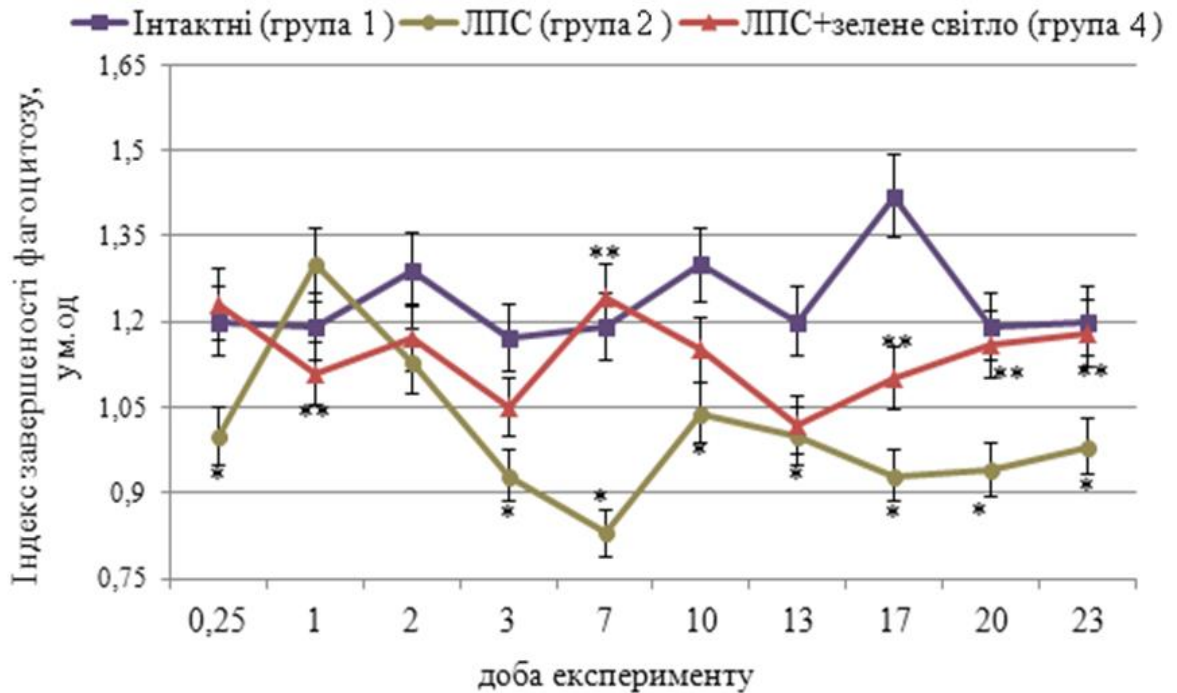


Рис. 3.12 Динаміка змін індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 4 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 3 ( $p < 0,05$ )

При дослідженні показників киснезалежного фагоцитозу виявили, що вплив зеленого світла ( $\lambda = 530$  нм) викликав достовірне зниження надмірно активованої спонтанної окислювальної здатності (СП) нейтрофільних гранулоцитів на стадії ексудації та регенерації, що відповідає проміжку з 3-ої до 10-ої доби експерименту в групі 4 у порівнянні з групою 2 (ЛПС-

індукований перитоніт без світлової дії). Різниця між групами 2 і 4 за показником спонтанної активації НАДФ-Н-оксидазної системи складала: на 3-тю добу – 5 %, на 7-у добу – 10%, на 10-у добу – 8 % (рис. 3.13).

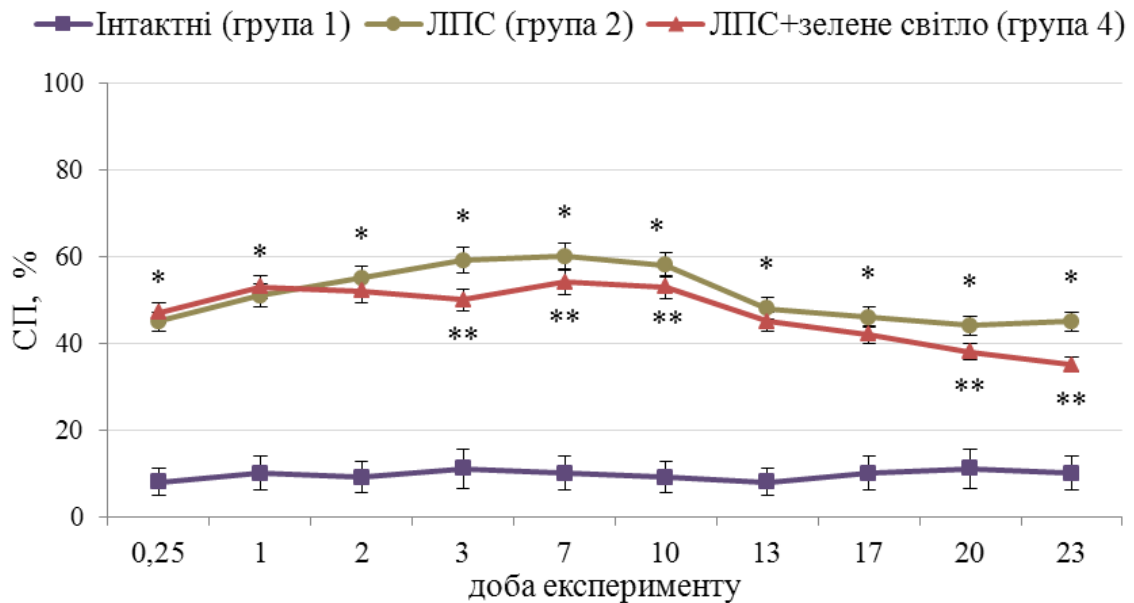


Рис. 3.13 Динаміка змін спонтанного НСТ-тесту (СП) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 4 ( $p < 0,05$ )

Також виявили достовірні відмінності в групах 2 (ЛПС-індукований перитоніт) і 4 (ЛПС-індукований перитоніт та освітлювання зеленим світлом) щодо показника стимульованої (СТ) зимозаном окислювально-відновної активності нейтрофілів у киснезалежному фагоцитозі (рис. 3.14), що свідчить про позитивний вплив зеленого світла на активність НАДФ-Н-оксидазних ферментних систем на другій стадії запального процесу.

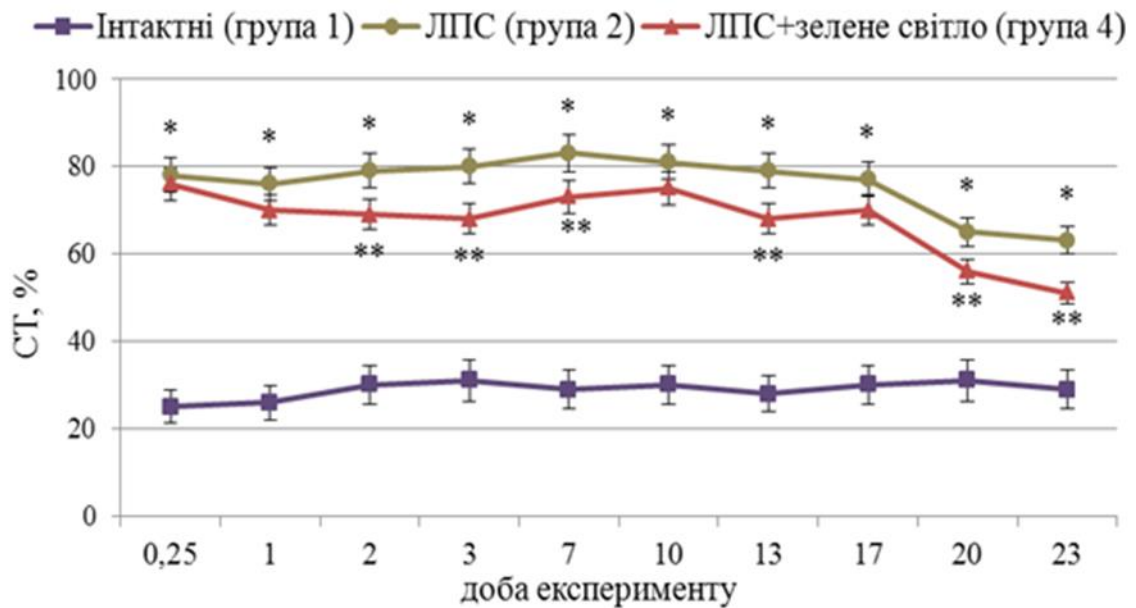


Рис. 3.14 Динаміка змін стимульованого НСТ-тесту (СТ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 4 ( $p < 0,05$ )

Окисний резерв нейтрофільних гранулоцитів у кисень залежному фагоцитозі, який визначали за показниками індексу стимуляції (ІС) в НСТ-тесті, під впливом зеленого світла ( $\lambda = 530$  нм) незначно змінювався лише через 6 годин після введення ЛПС та на другу добу експерименту (рис. 3.15).

Відомо, що на стадії ексудації та регенерації найважливішою функцією фагоцитів є ефективність перетравлювання, що сприяє очищенню вогнища запалення від мікробних антигенів. Наші дослідження показали, що найбільший ефект на цій стадії запального процесу надавало зелене світло, під дією якого збільшувалася перетравлююча здатність нейтрофілів, що виражалось в підвищенні індексу завершеності фагоцитозу.

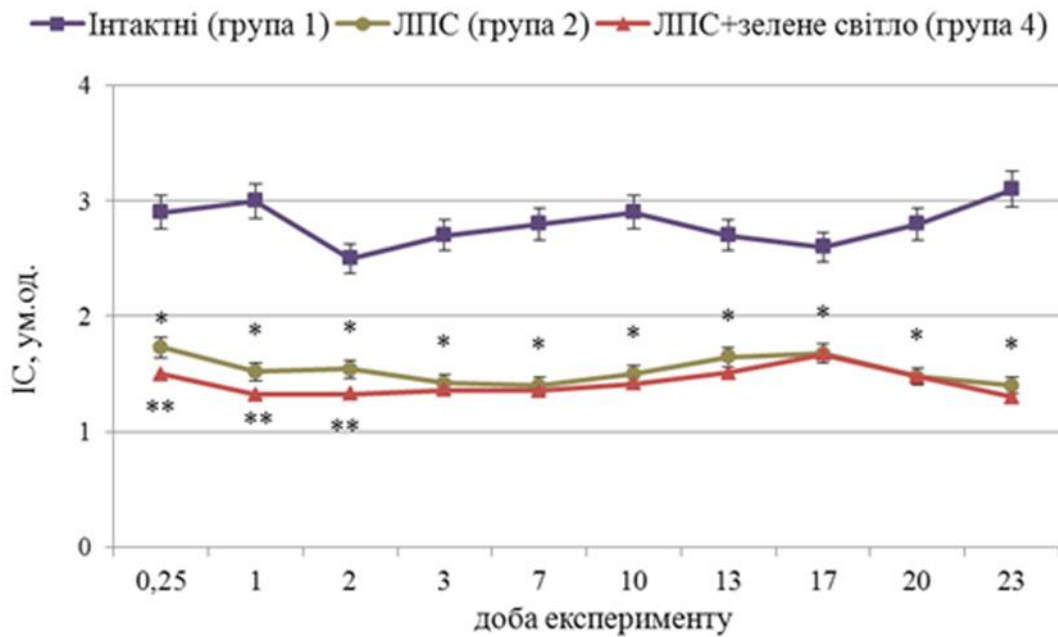


Рис. 3.15 Динаміка змін індексу стимуляції (ІС) у НСТ-тесті у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 4 ( $p < 0,05$ )

### 3.1.5 Гуморальні показники у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель І) протягом запальної реакції після світлового впливу зеленого діапазону спектру ( $\lambda = 530$ нм)

У групі тварин з ЛПС-індукованим перитонітом та після впливу зеленого світла ( $\lambda = 530$  нм) спостерігали виражену активацію утворення цитотоксичних факторів сироватки крові з 1-ої по 7-му добу. На 10-ту добу ступінь ЛЦТ різко знизився (в середньому на 30 %) внаслідок посиленої елімінації мембранотропних лізуючих компонентів. Максимальне дворазове збільшення ЛЦТ спостерігали на 3-й (в середньому  $(75,4 \pm 3,6)$  %) і 7-й ( $(73,8 \pm 5,2)$  %) добі відповідно (рис. 3.16). З 10-ої до 20-ої доби коливання рівня

ЛЦТ у тварин із ЛПС-індукованим перитонітом та дією зеленого світла в середньому були на рівні  $(37,4 \pm 4,6) \%$ . Після 20-ої доби виявили зниження ступеню ЛЦТ до  $(29,6 \pm 2,8) \%$ , що відповідало рівню ЛЦТ у інтактних тварин (група 1).

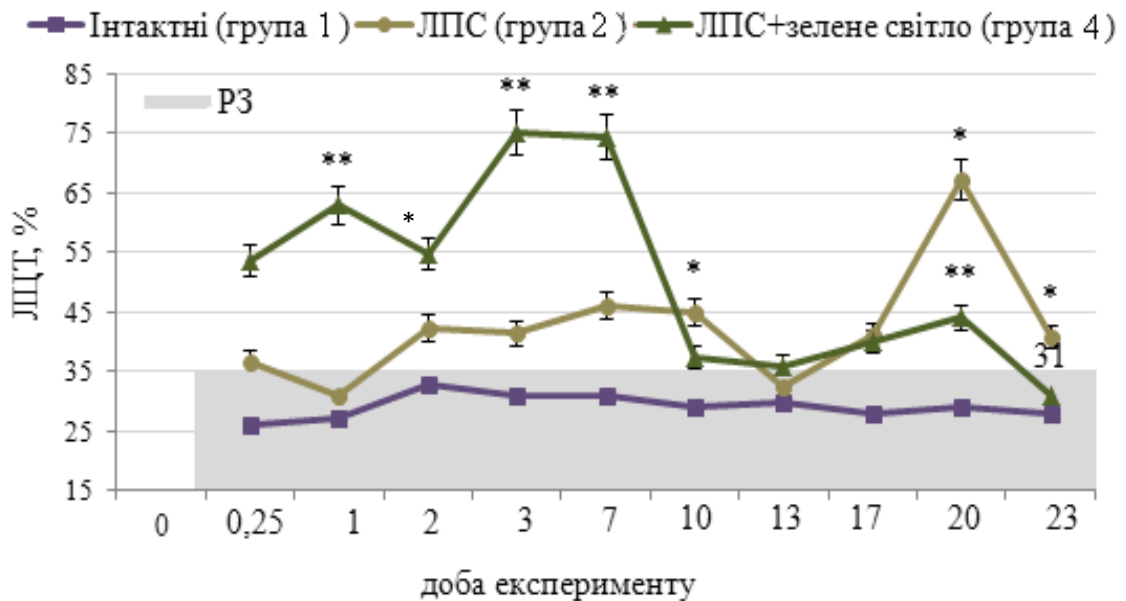


Рис. 3.16 Динаміка ступеню лімфоцитотоксичності (ЛЦТ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 4 ( $p < 0,05$ )

Динаміка концентрації ЦК у тварин групи 4 (ЛПС-індукований перитоніт та дія зеленого світла) свідчить про те, що опромінювання зеленим світлом мало менш виражений ефект на стимуляцію утворення ЦК, ніж дія червоного світла на всіх стадіях запального процесу (табл. 3.2).



Таблиця 3.2

**Концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом та тварин з ЛПС-індукованим перитонітом та після опромінювання зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм)**

Строки експерименту, доба	Концентрація ЦІК, од. Е (М + m)	
	ЛПС-індукований перитоніт (група 2)	ЛПС-індукований перитоніт, зелене світло ( $\lambda = 530$ нм) (група 4)
0,25	35,7 ± 13,7*/**	80,5 ± 7,6**
1	65,0 ± 20,4	89,7 ± 14,2
2	42,8 ± 6,8*/**	95,3 ± 13,5*/**
3	70,5 ± 9,1	68,4 ± 5,1
7	73,0 ± 13,0	69,3 ± 5,9
10	77,0 ± 10,4	69,0 ± 8,2
13	77,8 ± 12,8	73,8 ± 9,4
17	85,7 ± 24,3	76,5 ± 8,2
20	87,1 ± 17,0	78,5 ± 6,2
23	69,1 ± 12,2	66,8 ± 7,3

Примітка: концентрація ЦІК в групі інтактних тварин ( $69,35 \pm 8,6$ ) од. Е; \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 4 ( $p < 0,05$ )

Виявили максимальну концентрацію ЦІК на другу добу експерименту – ( $95,3 \pm 13,5$ ) од. Е. Після чого з третьої до десятої доби спостерігали зниження концентрації ЦІК в середньому на 37 % відносно 2-ої доби. З 13-ої до 20-ої доби експерименту виявили незначне зростання концентрації ЦІК до ( $78,5 \pm 6,2$ ) од. Е, і це було на 12 % нижче, ніж у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом без світлового впливу (група 2). На 23-у добу експерименту рівень ЛЦТ знизився ще на 20 % відносно 20-ої доби і складав ( $66,8 \pm 7,3$ ) од. Е (табл. 3.2).

### 3.1.6 Проліферативний потенціал лейкоцитів (від пацієнтів з довготривалим запальним процесом) в культурі *in vitro* (експериментальна модель II)

При культивуванні лімфоцитів периферичної крові пацієнтів з хронічним запальним процесом (трофічні виразки гомілки на тлі цукрового діабету II типу), виявили низьку спонтанну проліферативну активність клітин *in vitro*, що проявлялось значним зниженням числа великих лімфоцитів (у середньому до  $(7,6 \pm 0,8)$  %) відносно референтних значень  $(15,3 \pm 1,8)$  %. Внесення мітогену ФГА в культуру лейкоцитів пацієнтів із хронічним запальним процесом посилювало проліферативну відповідь клітин у середньому до  $(15,6 \pm 2,4)$  % (рис. 3.17).

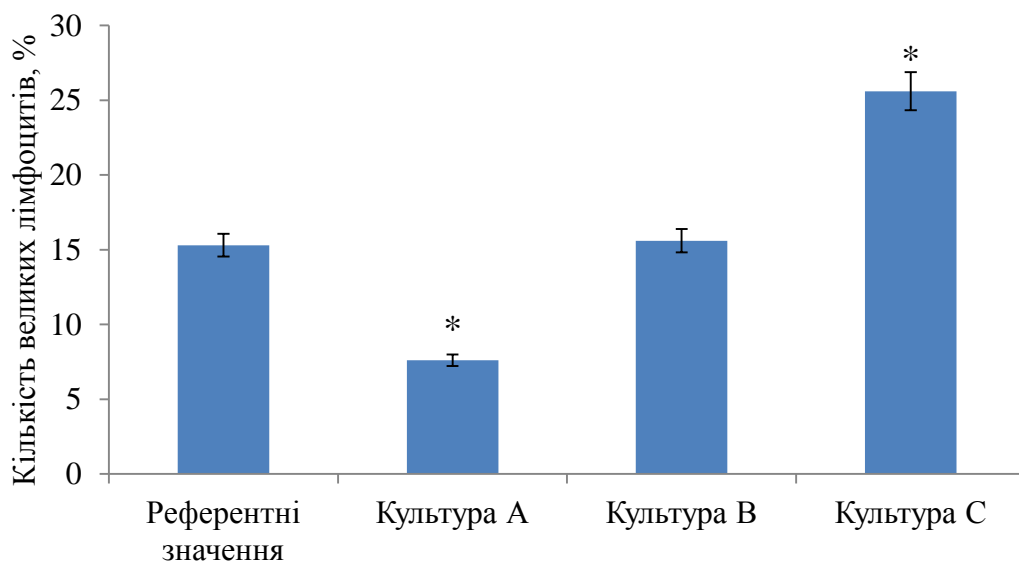


Рис. 3.17 Проліферативна активність лімфоцитів периферичної крові в культурі *in vitro*: культура А – середовище 199; культура В – середовище 199 + мітоген ФГА; культура С – середовище 199 + екзосоми МСК плаценти; \* – достовірні відмінності у порівнянні з референтними значеннями ( $p < 0,05$ )

Виявили знижену функціональну активність лімфоцитів у культурі у пацієнтів з хронічними запальними процесами (культура «А»).

Проліферативний ефект лімфоцитів пацієнтів з хронічним запальним процесом був достовірно вищий з використанням екзосом МСК (культура «С») у порівнянні з культурою «А», в яку додавали тільки фізіологічний розчин. Кількість великих лімфоцитів, що пройшли S-період клітинного циклу, у культурі «С» була на 37% вище, ніж у культурі «А», і становила  $(25,6 \pm 3,5) \%$  (рис. 3.17).

Фактори мікрооточення, які знаходяться у екзосомах, стимулювали синтетичну активність культивованих лімфоцитів. У зв'язку з цим, виявлений стимулюючий ефект екзосом, які містять екзометаболіти МСК, дозволяє використовувати їх на стадії регенерації після застосування зеленого світла ( $\lambda = 530 \text{ нм}$ ).

### **3.1.7 Бар'єрна функція фагоцитів у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель I) протягом запальної реакції після світлового впливу синього діапазону спектру ( $\lambda = 470 \text{ нм}$ )**

У групі тварин після одноразового введення ЛПС та після опромінювання синім світлом ( $\lambda = 470 \text{ нм}$ ) (група 5) виявили підвищення фагоцитарного індексу (ФІ) вже на 2-у добу експерименту на 18 % у порівнянні з групою тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (група 2). На всіх етапах дослідження групи після дії синього світла ФІ був достовірно вище групи порівняння (група 2). Максимальне збільшення ФІ в цій групі експериментальних тварин до  $(83,4 \pm 3,5) \%$  спостерігали з 10-ої по 17-ту добу (рис. 3.18). У цей період експерименту таке збільшення фагоцитарного індексу було на 20 % більше, ніж в групі 2 (ЛПС-індукований перитоніт без світлового впливу). Після 17-ої доби виявили зниження фагоцитарного індексу в групі 5 (ЛПС-індукований перитоніт та світловий вплив синього діапазону спектру) до рівня цього показника в групі 2 (ЛПС-індукований перитоніт без світлового впливу).

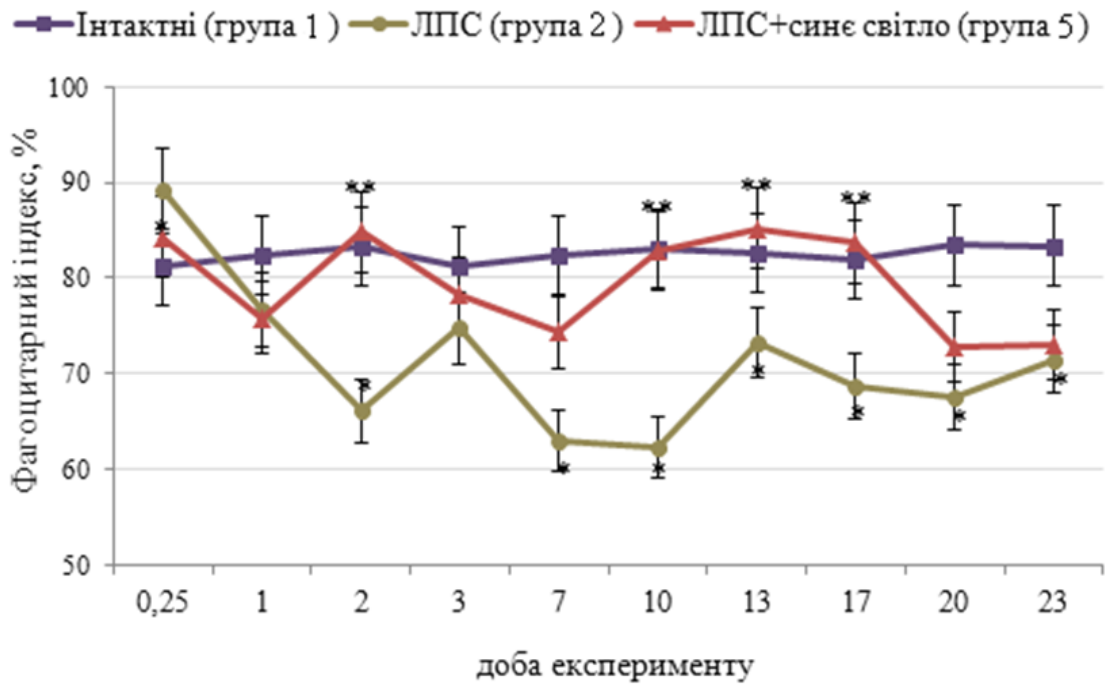


Рис. 3.18 Динаміка змін фагоцитарного індексу (ФІ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали синім світлом ( $\lambda = 470$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 5 ( $p < 0,05$ ).

Після багаторазового застосування синього світла ( $\lambda = 470$  нм) виявили зниження на 30% середньої кількості внутрішньоклітинних бактерій – фагоцитарного числа (ФЧ) – у порівнянні з групою тварин тільки з ЛПС-індукованим перитонітом з 2-ої до 17-ої доби експерименту (рис. 3.19). До кінця експерименту (до 23-ої доби) фагоцитарне число в групі 5 (ЛПС-індукований перитоніт та опромінювання синім світлом  $\lambda = 470$  нм) так і залишалось на низькому рівні –  $(2,5 \pm 0,9)$  ум. од., що було на 50 % нижче рівня фагоцитарного числа в групі 1 (інтактні тварини).

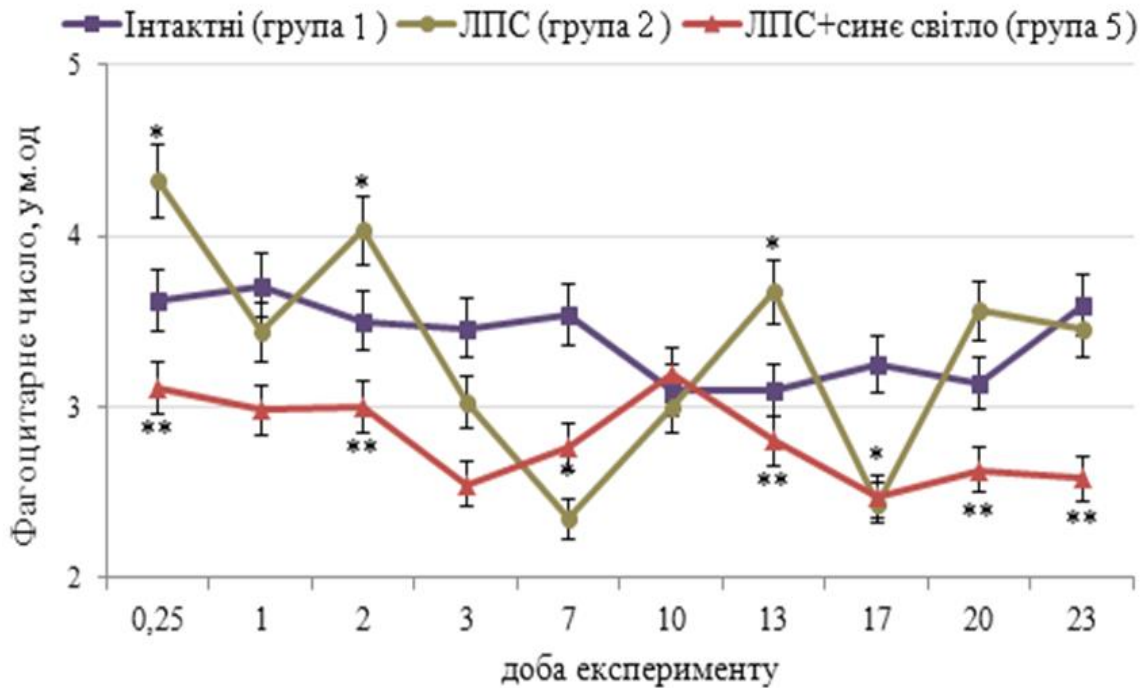


Рис. 3.19 Динаміка змін фагоцитарного числа (ФЧ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали синім світлом ( $\lambda = 470$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 5 ( $p < 0,05$ )

Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ) – здатність фагоцитів до ендоцитозу, починаючи з 2-ої доби в групі 2 (ЛПС-індукований перитоніт) був знижений відносно рівня ІЗФ у інтактних тварин (група 1). Мінімальний рівень ІЗФ відмічали на 7-му добу. У групі тварин після дії синього світла (група 5) перетравлююча здатність підвищувалася, і достовірно відрізнялася від групи тварин без впливу на 13-ту, 20-ту і 23-тю добу експерименту (рис. 3.20).

Таким чином, синє світло ( $\lambda = 470$  нм) сприяло активації фагоцитозу на тлі повного пригнічення альтерації, ексудації та проліферації тканини черевної порожнини на завершальній стадії запального процесу з першого

дня; сприяло поліпшенню мікроциркуляції, підвищенню біоенергетичного потенціалу та активності клітинних мембран; стимуляції зростання грануляцій та епітелізації ран (рис. 3.20).

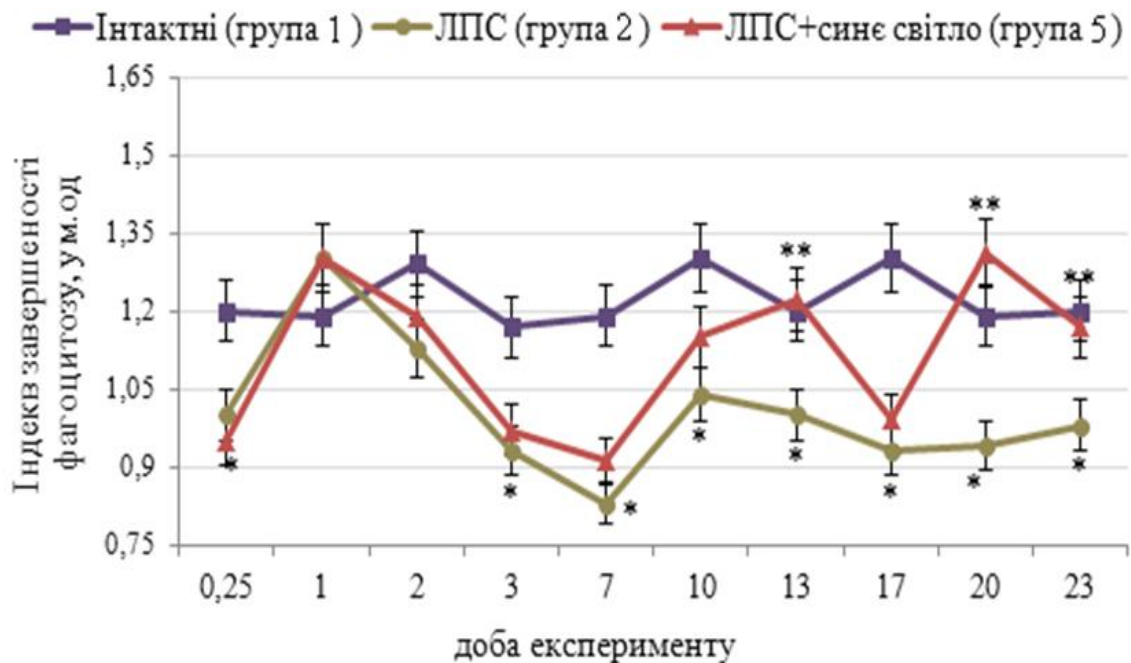


Рис. 3.20 Динаміка змін індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали синім світлом ( $\lambda = 470$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 5 ( $p < 0,05$ )

Аналізуючи результати, отримані в НСТ-тесті, виявили, що застосування синього світла ( $\lambda = 470$  нм) позитивно інгібувало спонтанну (СП) окислювальну активність нейтрофільних гранулоцитів. Спонтанний рівень активації ферментних систем нейтрофілів знижувався в середньому на 38 % протягом всього експерименту під дією синього світла відносно початкового рівня (рис. 3. 21). До 23-ої доби рівень СП під дією синього

світла майже досягав рівня групи 1 (інтактні тварини), різниця становила всього 10% (рис. 3.21).

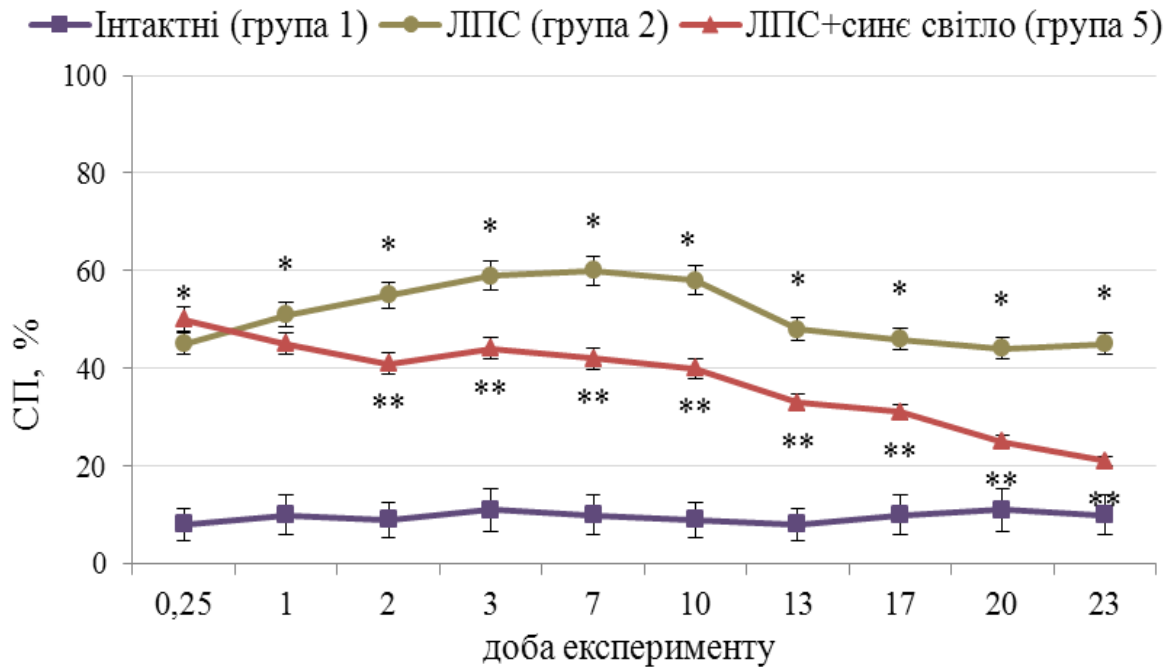


Рис. 3.21 Динаміка змін спонтанного НСТ-тесту (СП) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали синім світлом ( $\lambda = 470$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 5 ( $p < 0,05$ )

Стимульована зимозаном реакція НСТ (СТ) в групі 5 (ЛПС-індукований перитоніт та опромінювання синім світлом) була достовірно нижчою з 1-ої доби експерименту у порівнянні з групою 2 (тільки ЛПС-індукований перитоніт). З третьої доби виявили зниження рівня СТ і до кінця експерименту цей показник наблизився до рівня групи 1 (інтактні тварини) та складав в середньому ( $39,5 + 4,6$ ) % (рис. 3.22).

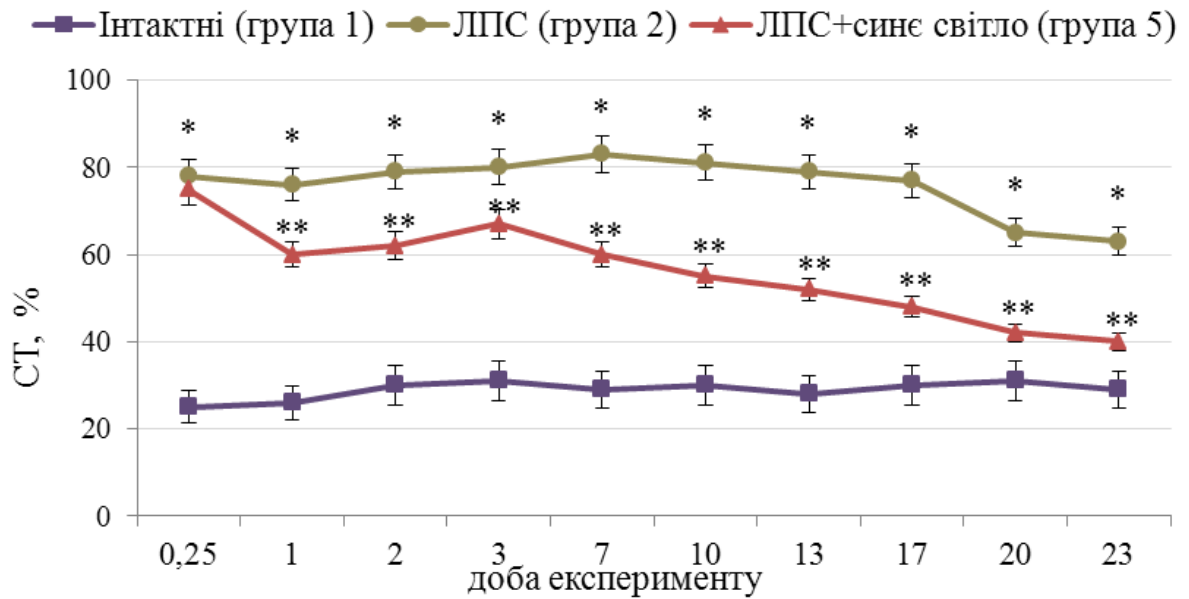


Рис. 3.22 Динаміка змін стимульованого НСТ-тесту (СТ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали синім світлом ( $\lambda = 470$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 5 ( $p < 0,05$ )

Ефективність кисневого фагоцитозу, про що свідчить індекс стимуляції (ІС) в НСТ-тесті, після впливу синього світла ( $\lambda = 470$  нм) у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом статистично значуще відрізнялася від групи 1 (інтактні тварини) на початку першої стадії запальної реакції – фази інфільтрації та альтерації (рис. 3.23). Починаючи з 1-ої доби експерименту стала помітна різниця в ІС між групами 2 (ЛПС-індукований перитоніт) та 5 (ЛПС-індукований перитоніт та синє світло,  $\lambda = 470$  нм). Ця різниця збільшувалась і була максимальною на 10-у добу експерименту. Потім було відносно зменшення різниці в показнику ІС (на 13-у добу експерименту), після чого знову спостерігали збільшення різниці в показнику ІС відносно тварин з перитонітом без дії світла, яка зберігалась до кінця експерименту (рис. 3.23).



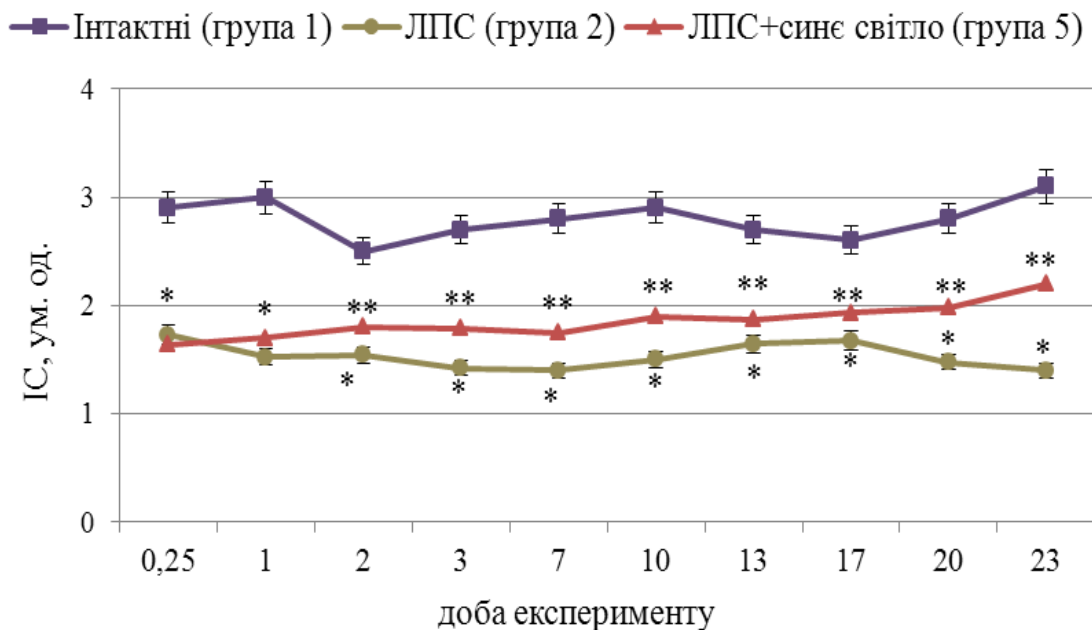


Рис. 3.23 Динаміка змін індексу стимуляції (ІС) у НСТ-тесті у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали синім світлом ( $\lambda = 470$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 5 ( $p < 0,05$ )

На заключній стадії запалення (на стадії проліферації) надлишкова активність фагоцитів негативно впливає на запальний процес, що потребує інгібування основних функцій фагоцитів [168]. Такою властивістю володіло синє світло ( $\lambda = 470$  нм), яке знижувало надмірну активність хемотаксису, адгезивних властивостей фагоцитів і нормалізувало ендоцитоз фагоцитів. Також вплив синього світла призводив до нормалізації внутрішньоклітинного бактерицидного ефекту, пов'язаного з генерацією АФК в НАДФ-Н-оксидазній реакції, що позитивно впливало на стадію проліферації.

### 3.1.8 Гуморальні показники у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом (експериментальна модель І) протягом запальної реакції після світлового впливу синього діапазону спектру ( $\lambda = 470$ нм)

У групі тварин з ЛПС-індукованим перитонітом, які піддавалися світловому впливу синього спектру ( $\lambda = 470$  нм) вже на 1-у добу ступінь ЛЦТ збільшився вдвічі. На 3-тю добу експерименту ступінь ЛЦТ після опромінювання синім світлом знизився до значення ( $47,1 \pm 3,9$ ) %, а потім зріс і залишався підвищеним в інтервалі від 59,5 % до 66,7 % до 17-ої доби експерименту. Починаючи з 20-ої доби відзначали зниження цього показника на 45 % у групі 5, яка до 21-ої доби знизився до рівня інтактних тварин (група 1) (рис. 3.24).

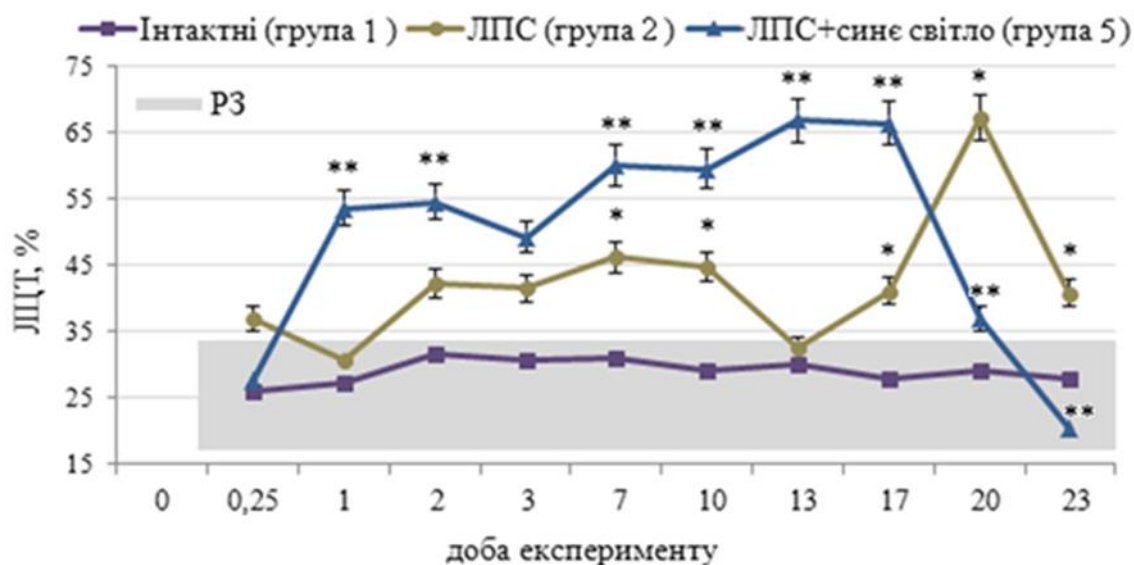


Рис. 3.24 Динаміка ступеню лімфоцитотоксичності (ЛЦТ) у експериментальних тварин: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом, яких опромінювали синім світлом ( $\lambda = 470$  нм). Кожна експериментальна точка є середнім значенням, отриманим на шести тваринах ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ ); \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 5 ( $p < 0,05$ )

Темпи нівелювання запального процесу у тварин групи 5 після дії синього світла також були інтенсивнішими, ніж у групі порівняння (група 2), які не піддавалися світловому впливу. До 23-ої доби спостерігали повну елімінацію цитотоксичних сироваткових факторів, на що вказує динаміка зміни рівня ЦК (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

**Концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦК) у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом та тварин з ЛПС-індукованим перитонітом та після опромінювання синім світлом ( $\lambda = 470$  нм)**

Строки експерименту, доба	Концентрація ЦК, од. Е ( $M \pm m$ )	
	ЛПС-індукований перитоніт (група 2)	ЛПС-індукований перитоніт, синє світло ( $\lambda = 470$ нм) (група 4)
0,25	35,7±13,7*/**	77,9±12,6**
1	65,0±20,4	98,4±11,5*
2	42,8±6,8*/**	92,8±10,3*/**
3	70,5±9,1	81,5±9,4*
7	73,0±13,0	66,8±7,9
10	77,0±10,4	69,3±6,8
13	77,8±12,8	72,3±9,6
17	85,7±24,3*	72,6±12,4
20	87,1±17,0*	71,3±14,2
23	69,1±12,2	70,5±9,9

Примітка: концентрація ЦК в групі інтактних тварин ( $69,35 \pm 8,6$ ) од. Е; \* – достовірні відмінності між групами 1 і 2 ( $p < 0,05$ ); \*\* – достовірні відмінності між групами 2 і 5 ( $p < 0,05$ )

Таким чином, у експериментальних тварин з ЛПС-індукованим неінфекційним перитонітом дія червоного світла ( $\lambda = 660$  нм) викликала активацію утворення та накопичення мембранотропних цитотоксичних факторів, що супроводжувалося високим ступенем лімфоцитотоксичності та підвищеною концентрацією ЦК, які є продуктом взаємодії комплексу АГ+АТ+комплемет, на ранніх стадіях інфільтрації та альтерації. На другій стадії запалення – ексудації та регенерації – дія зеленого світла ( $\lambda = 530$  нм) призводила до більш інтенсивного зниження ЛЦТ та концентрації ЦК. Вплив синього світла ( $\lambda = 470$  нм) призводив до нормалізації показників ЛЦТ та ЦК на заключній стадії запалення – стадії проліферації.

### **3.1.9 Дослідження цитотоксичності наночастинок церію з використанням клітинного біоіндикатора *D. viridis* (експериментальна модель III)**

Відомі виражені ефекти наночастинок (НЧ) церію, які представляють інтерес для їх використання в медичній практиці поряд з іншими наноматеріалами, які добре себе зарекомендували для лікування різних патологій. Наночастинки церію оказують вплив на структурну організацію біомолекул та клітинні органели, що змінює метаболізм та мікроциркуляцію в тканинах. Такі властивості НЧ доцільно використовувати для корекції порушень імунних каскадів при запаленні. Але разом з тим, існують реальні біологічні ризики під час використання наночастинок з різними характеристиками. У зв'язку з цим враховуючи наявність позитивних властивостей НЧ церію актуальним є визначення можливої цитотоксичності цієї речовини залежно від розмірів та концентрації. Для використання НЧ у вигляді аплікацій на штучне ранове покриття використовували експериментальну модель III, відповідно до якої проводили визначення можливої цитотоксичності НЧ діоксиду церію різних розмірів і концентрацій.

Можливу цитотоксичність сполук церію вивчали за оцінкою інтегральної цитотоксичності з використанням живого біоіндикаторного об'єкту *Dunaliella viridis*, який реагує на різні токсичні впливи втратою джгутику, повною або частковою втратою рухливості, що характеризує реакцію субодиниць іонних каналів та філаментів цитоскелету; формуванням агрегатів, що свідчить про зміну адгезивних властивостей клітинної мембрани; виділенням екзометаболіту як захисної реакції; поглинанням наночастинок, що є аналогом посилення поглинальної функції клітин під час фагоцитозу. Досліджували солі та наночастинки церію у різних концентраціях та виявили різний тип та ступінь реагування біоіндикатору на досліджувані агенти.

*Характеристика тест-культури D. viridis у контрольному зразку.* У всіх контрольних зразках клітини *D. viridis* мали овальну форму, кількість рухливих клітин становила  $(95,0 \pm 1,1) \%$ . У контрольній культурі клітини біоіндикатору не утворювали агрегатів (рис. 3.25). Рівень спонтанної цитотоксичності (Ксп) контрольної культури становив  $(2,0 \pm 0,02)$  ум. од.



Рис. 3.25 Клітини *D. viridis* у контролі. Світлова мікроскопія, збільшення  $\times 40$ , Olympus BX53

Наявність спонтанної цитотоксичності у контрольній культурі пояснюється тим, що така культура характеризується наявністю природної загибелі частини клітин, наявністю клітин у різних фазах клітинного циклу та різних функціональних станів. У зв'язку з цим такий рівень цитотоксичності прийнято спонтанним рівнем.

Характеристика тест-культури *D. viridis* після інкубації із солями діоксиду церію. Після інкубації *D. viridis* із сіллю церію (IV) гептагідрат у концентрації 0,01 М форма клітин біоіндикатору змінювалася, і більшість клітин мали грушоподібну форму (рис. 3.26).

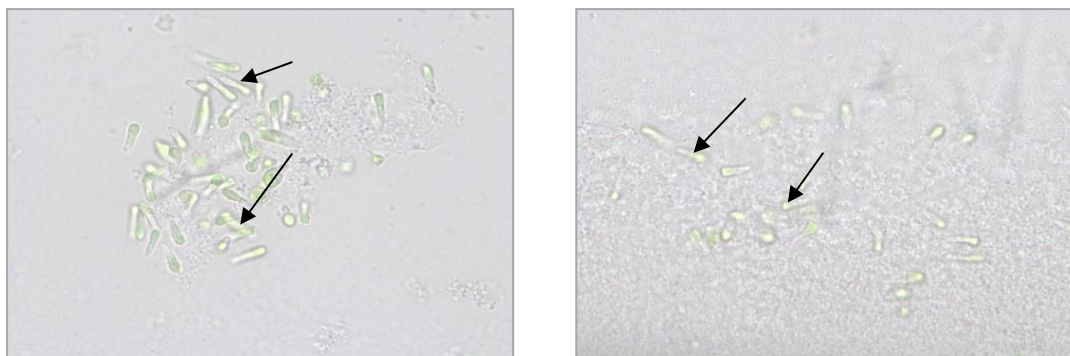


Рис. 3.26 Клітини *D. viridis* після інкубації з із сіллю церію (IV) гептагідрат. Стрілками вказані клітини *D. viridis* грушоподібної форми. Світлова мікроскопія, збільшення  $\times 40$ , Olympus BX53

В цьому випадку клітини втрачали джгутики і рух переходив з прямолінійного на круговий. Спостерігали наявність внутрішньоклітинних включень (які були відсутні в контролі), частину клітин формували мікро- і макроагрегати, навколо яких були наявні екзометаболіти. Коефіцієнт цитотоксичності (Кц) становив  $(14,0 \pm 0,08)$  ум. од., що було у 7 разів більше за контрольний рівень цитотоксичності (табл. 3.4).

Після інкубації культури *D. viridis* з нітратом церію (III) у такій самій концентрації (0,01 М) частина клітин мала грушоподібну форму, а частина клітин ставали округлими (рис. 3.27 А). Частина клітин втрачала рухливість. Клітини *D. viridis* утворювали макроагрегати (скупчення до 50-70 клітин), навколо яких були присутні екзометаболіти (рис. 3.27 Б). Коефіцієнт цитотоксичності був нижчим, ніж у випадку гептагідрату і становила  $(11,0 \pm 0,05)$  ум. од. (табл. 3.4).

Таблиця 3.4

**Коефіцієнт цитотоксичності Кц досліджуваних зразків після  
спільної інкубації з *D. viridis***

№ п/п	Зразки	Кц, ум. од.	Зразки із сироваткою	Кц, ум. од.
1	<i>D. viridis</i> + фіз. р-р	2,0 ± 0,02	<i>D. viridis</i> + інактивована сироватка	2,5 ± 0,6
2	Цитрат натрію - стабілізатор - 0,1 М	3,2 ± 0,12	Цитрат натрію - стабілізатор - 0,1 М + сироватка	2,8 ± 0,2
3	НДЦ (IV) гептагідрат церію - 0,01 М	14,0 ± 0,08*	НДЦ(IV) гептагідрат- 0,01 М + сироватка	12,2 ± 2,9*
4	НДЦ(III) нітрат церію - 0,01 М	11,0 ± 0,05*	НДЦ(III) нітрат-0,01М + сироватка	10,3 ± 1,5*
5	НДЦs190-0,01 (~ 6 нм)	8,5 ± 0,06*	НДЦs190-0,01 + сироватка	7,1 ± 0,1*
6	НДЦ190-0,01М (~ 6 нм)	7,2 ± 0,31*	НДЦ190-0,01М + сироватка	5,9 ± 0,2*
7	ЦАН – 0,2М (~ 3-4 нм)	3,6 ± 0,29	ЦАН – 0,2М + сироватка	2,9 ± 0,3
8	НДЦ16-0,1М (~ 2 нм)	2,8 ± 0,09	НДЦ16-0,1М + сироватка	2,1 ± 0,1

Примітка: \* – достовірність відмінності з контролем  $p < 0,05$

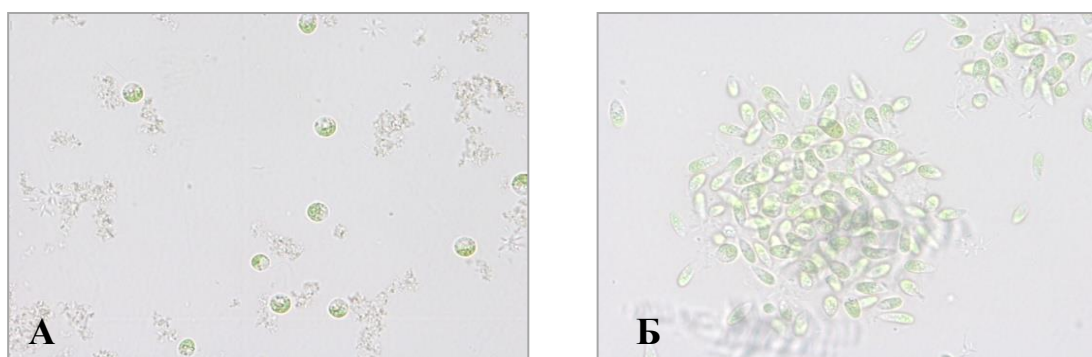


Рис. 3.27 Клітини *D. viridis* після інкубації з нітратом церію (III): А – круглі клітини; Б – утворення макроагрегату з виділенням екзометаболіту. Світлова мікроскопія, збільшення  $\times 40$ , Olympus BX53

Таким чином, можна зробити проміжний висновок, що різні солі церію проявляли цитотоксичність, і при цьому виявлялися невеликі кількісні відмінності між собою.

*Вплив наночастинок діоксиду церію різного розміру та різної концентрації на морфологічні та функціональні характеристики *D. viridis*.* Інкубація контрольної культури *D. viridis* з додаванням НЧ  $\text{CeO}_2$  різного розміру і різної концентрації призводила до зміни характеру поведінки клітин в культурі. Так, після інкубації тест-системи *D. viridis* з діоксидом церію (зразок НДЦs190) у концентрації 0,1 М спостерігали подібні цитотоксичні ефекти, як і після дії солей церію, але кількісно менш виражені. Клітини культури формували багато мікроагрегатів по 10-15 клітин (рис. 3.28 А, Б). Коефіцієнт цитотоксичності становив  $(8,5 \pm 0,06)$  ум. од., що було майже в двічі нижче, ніж за дії солей церію (табл. 3.4).

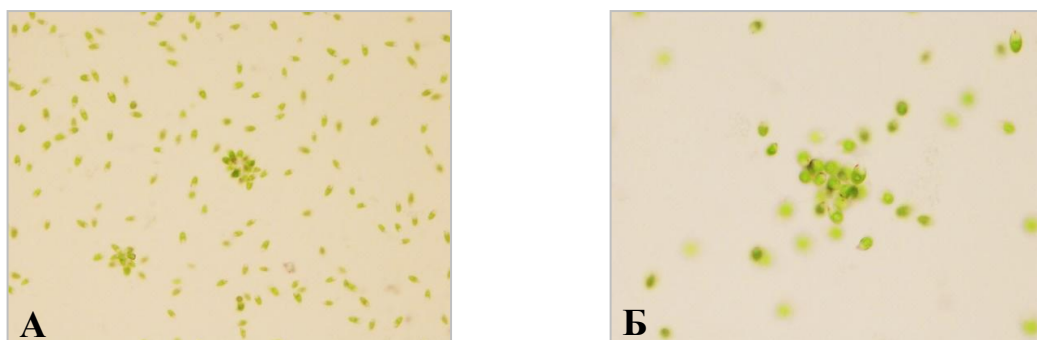


Рис. 3.28 Утворення мікроагрегатів клітинами *D. viridis* після інкубації з НЧ діоксиду церію (зразок НДЦs190). Світлова мікроскопія, збільшення  $\times 20$ (А),  $\times 40$ (Б), Olympus BX53

Після інкубації тест-системи *D. viridis* з діоксидом церію (НДЦ190) у концентрації меншою в 10 разів – 0,01 М, усі клітини через 30 хвилин інкубації набували деформованої округлої форми. У клітинах були наночастинок церію, при цьому клітини втрачали джгутики і утворювали великі скупчення навколо НЧ до агрегування на острівцях з НЧ. Коефіцієнт цитотоксичності (Кц) у зразку НДЦ190 становив  $(7,2 \pm 0,31)$  ум. од (рис. 3.29), тобто на 18 % нижче, ніж за більшої концентрації в зразку НДЦ190 (табл. 3.4).



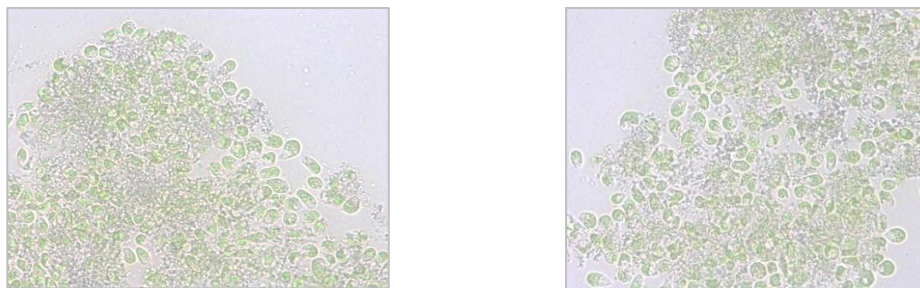


Рис. 3.29 Утворення макроагрегатів клітинами *D. viridis* (зразок НДЦ190-0,01М). Світлова мікроскопія, збільшення x40, Olympus BX53

Отже, між концентрацією НЧ церію та біологічною відповіддю немає прямої кореляції, принаймні в діапазоні концентрацій 0,01 – 0,1 М, що дозволяє припускати, що вони діють за механізмом «все або нічого».

Після інкубації культури *D. viridis* та діоксиду церію (зразок ЦАН, концентрація 0,2 М) клітини набули неправильної овальної та грушоподібної форми. Більшість клітин ( $83,0 \pm 3,3$ ) % ставали нерухливими. Виявили, що 45 % клітин утворювали макроагрегати (до 100 клітин в агрегаті) (рис. 3.30 А). Клітини в скупченнях містили велику кількість включень, розмір НЧ ЦАН становив 3 – 4 нм і вони проникали в клітини. Вплив діоксиду церію (ЦАН) у цій концентрації призводив до того, що клітини частково втрачали джгутики. Коефіцієнт цитотоксичності (Кц) в цьому випадку (зразок ЦАН, 0,2 М) становив ( $3,6 \pm 0,29$ ) ум. од., що було значно менше порівняно з НДЦ190 і мало відрізнявся від контрольного зразка ( $2,0 \pm 0,02$ ) ум. од.) (табл. 3.4).

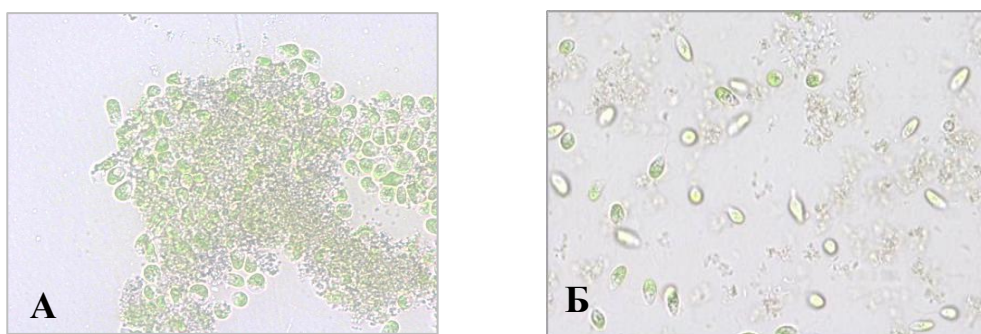


Рис. 3.30 Вплив діоксиду церію на структурно-функціональні зміни клітинного біоіндикатора *D. viridis*: А – зразок ЦАН, 0,2 М, утворення макроагрегату; Б – зразок НДЦ16, 0,1 М. Світлова мікроскопія, збільшення x40, Olympus BX53

Після внесення до тест-системи *D. viridis* НЧ діоксиду церію (зразок НДЦ16, розмір НЧ 2 нм, концентрація 0,1 М) відзначали зміни швидкості руху клітин у бік уповільнення. Достовірної зміни кількості клітин із зміненою морфологією не виявлено. У клітинах містилася велика кількість включень. Кількість рухливих клітин було на рівні  $(52,0 \pm 5,6) \%$ , кількість клітин із втраченим джгутиком становила лише 9 %. В цьому випадку клітини *D. viridis* не утворювала агрегатів. Після спільної інкубації *D. viridis* і діоксиду церію (НДЦ16) виявили появу клітин, що діляться (на рівні 10 %) (рис. 3.30 Б). Коефіцієнт цитотоксичності (Кц) у зразку НДЦ16 становив лише  $(2,8 \pm 0,09)$  ум. од., тобто не відрізнявся від контрольного варіанта (табл. 3.4).

Таким чином, солі церію та НЧ церію мали різну цитотоксичну дію на клітини мікроводорості *D. viridis*. При цьому клітини *D. viridis* виявляли різні реакції у відповідь на присутність солей і НЧ церію в середовищі. НЧ церію НДЦ16 у концентрації 0,1 М не проявляли цитотоксичності і навіть могли прискорювати проліферацію клітин.

Великий інтерес представляє оцінка можливої модифікації токсичної дії НЧ діоксиду церію шляхом можливої їх взаємодії з білками, зокрема, сироватки крові. Це важливо знати тому, що, потрапляючи в організм, НЧ насамперед потрапляють у кровообіг, де зв'язуються з білками.

*Вплив інактивованої сироватки та наночастинок церію на поведінку клітин D. viridis.* Визначали вплив компонентів сироватки на поведінку клітин *D. viridis*. Внесення сироватки крові в культуру *D. viridis* не приводило до цитотоксичного ефекту на клітини. При оцінці морфологічних змін *D. viridis* відмічали овальну форму клітин (рис. 3.31 А, Б).

При спільній інкубації *D. viridis* із солями церію (гептагідрат (IV), нітрат (III)) та інактивованої сироватки крові клітини змінювали свою морфологію: близько 60 % клітин ставали округлими, деякі виділяли екзометаболіти, утворювали мікро- та макроагрегати (рис. 3.32 А). Коефіцієнт цитотоксичності становив  $(12,2 \pm 2,9)$  ум. од. для солей

гептогідрату (IV) та  $(10,3 \pm 1,5)$  ум. од. – для нітрату (III) відповідно, що було нижче, ніж у випадку інкубації клітини біоіндикатора лише з солями церію.

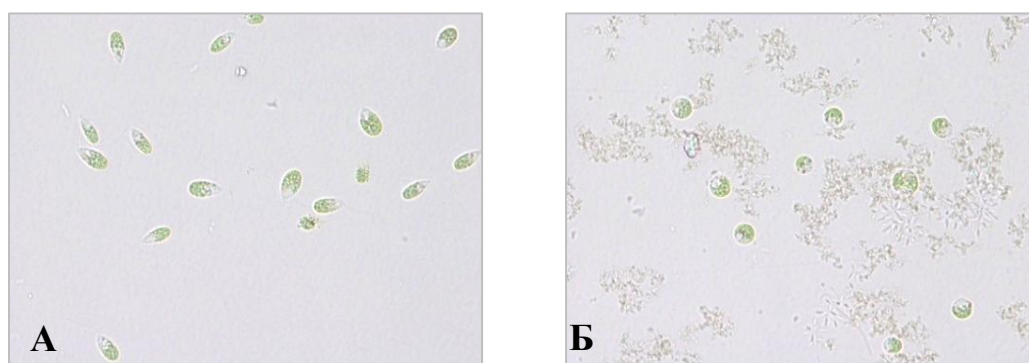


Рис. 3.31 Морфологічні зміни біоіндикатора *D. viridis* після дії сироватки (А) та спільно сироватки та діоксиду церію (ЦАН) (Б). Світлова мікроскопія, збільшення  $\times 40$ , Olympus BX53

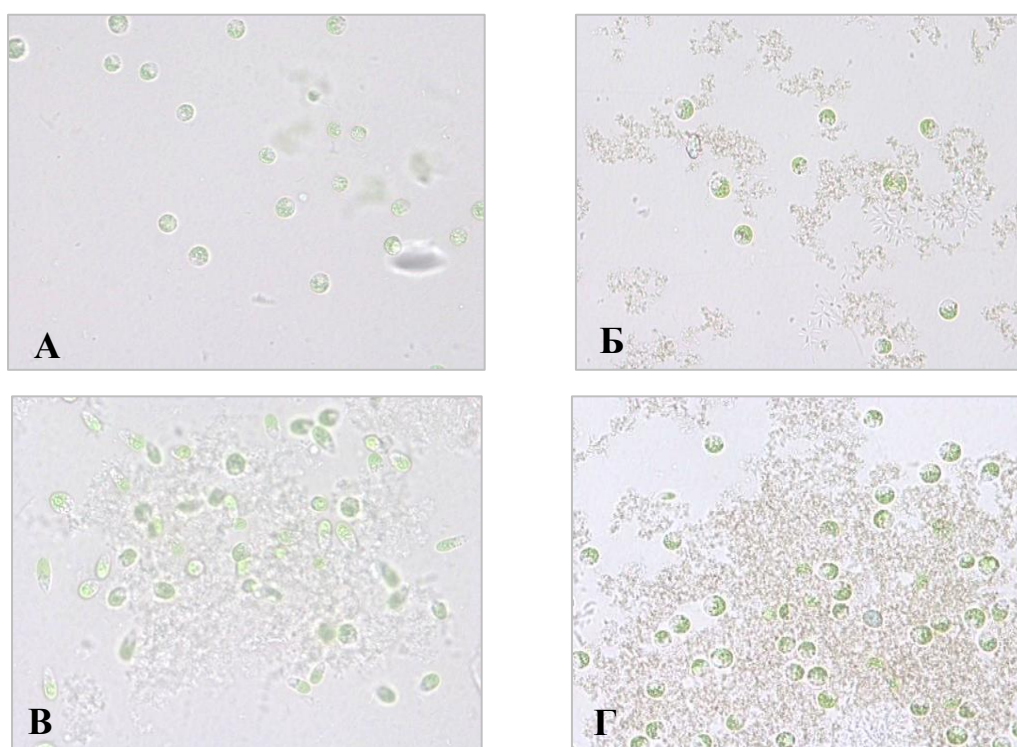


Рис. 3.32 Спільна інкубація біоіндикатора *D. viridis*, сироватки та зразків діоксиду церію: А – цитрат натрію – 0,1 М; Б – НДЦ 16 – 0,1 М; В – ЦАН – 0,2 М, Г – НДЦs190 – 0,01 М. Світлова мікроскопія, збільшення  $\times 40$ , Olympus BX53

Після додавання до тест-системи *D. viridis* водного золю наноцерію в концентрації 0,1 М, що не містить стабілізатора (зразок НДЦs190), та інактивованої сироватки виявили зниження коефіцієнта цитотоксичності до  $(7,1 \pm 0,1)$  ум. од. проти  $(8,5 \pm 0,06)$  ум. од. при використанні зразку без додавання сироватки (рис. 3.32 Г).

Клітини *D. viridis* у присутності сироватки та діоксиду церію (зразок НДЦ190) набували неправильної форми  $(76,0 \pm 0,8)$  %, рух клітин було порушено за рахунок втрати джгутиків. Більшість клітин були нерухливими  $(72,3 \pm 1,8)$  %, також клітини утворювали агрегати. Невелика кількість клітин (близько 13 %) оберталися навколо своєї осі.

Спільна інкубація тест-системи *D. viridis* із сироваткою крові та діоксидом церію (зразок ЦАН) призводила до уповільнення руху клітин (рис. 3.32 В). Коефіцієнт цитотоксичності складав  $(2,9 \pm 0,3)$  ум. од. (табл. 3.4).

При додаванні в інкубаційну суміш НЧ (зразок НДЦ 16) і сироватки крові виявляли появу овальних форм клітин (рис. 3.32 Б), швидкість руху була на рівні контролю, коефіцієнт цитотоксичності складав  $(2,1 \pm 0,1)$  ум. од. (табл. 3.4). Тобто, вплив сироватки чинив на клітини тест-системи *D. viridis* ефекти, що призводять до зниження коефіцієнта цитотоксичності до контрольного рівня (табл. 3.4). Таким чином, вплив сироватки чинив на клітини тест-системи *D. viridis* ефекти, що призводять до зниження коефіцієнта цитотоксичності до контрольного рівня (табл. 3.4).

У відповідь на присутність ксенобіотиків у середовищі первинною реакцією клітин є зміна швидкості та характер руху. Як відомо, рух клітин *D. viridis* здійснюється двома джгутиками, обертальні рухи яких реалізуються в результаті гідролізу макроергічних зв'язків. Отже, швидкість руху клітин *D. viridis* залежить від стану енергетичного метаболізму клітини [169, 170]. Зміна форми клітин свідчить про зміну структурно-функціональних особливостей апарату руху. Порушення руху (що супроводжується втратою джгутиків) і форми клітин біоіндикатора *D. viridis* очевидно пов'язане зі зміною компонентів цитоскелета, який бере

участь у внутрішньоклітинному транспорті, регуляції секреції, обміні рецепторних білків, передачі сигналу від рецепторів плазматичної мембрани всередину [171].

Як показано Schroer T.A. (1994) зміна характеру руху клітин з прямолінійного на обертальне або втрата рухливості безпосередньо залежить від функціонування скорочувальних систем мікрофіламентів цитоскелета: актин-міозинових в мікрофіламентах і тубулін-дінеїнових взаємодій в мікротрубах. Порушення стабілізуючої та структурної функції цитоскелету може викликати порушення скорочувальних філаментів цитоскелету, індукувати виділення клітинами водорості екзометаболітів, як захисного фактора, що обволікає клітини та знижує концентрацію токсичного агента, що оточує клітину [172]. Сполуки церію викликають утворення мікро- та макроагрегатів, що може бути викликано індукцією адгезивних властивостей клітинних мембран біоіндикатора. Формування агрегатів залежить від рухливості клітин, секреторної активності та характеристик поверхневого апарату клітин. Речовини з ад'ювантною дією, наприклад цитокіни (IL-1b, IL-2, ФНП- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) впливають на високоафінні рецептори на клітинах-мішенях і здатні в малих концентраціях викликати біологічні ефекти [173, 174].

### **3.2 Показники імунореактивності після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі**

Результати визначення основних імунологічних показників, отримані на експериментальній моделі «неінфекційного ЛПС-індукованого перитоніту» дозволяють використовувати вплив різного діапазону спектру – червоного ( $\lambda = 630$  нм), зеленого ( $\lambda = 530$  нм) та синього ( $\lambda = 470$  нм) на практиці для впливу на перебіг запального процесу при хронічних ранах нижніх кінцівок. В якості біологічного фактора на другій стадії запального процесу після активації запальної реакції червоним світлом використовували аплікації екзосом мезенхімальних стовбурових клітин плаценти, які містять

біологічні активні речовини, такі як цитокіни, ростові фактори (фактор росту ендотелію судин (VEGF), тромбоцитарний фактор, і мікроРНК). У клініці ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії НАМН України» розроблено технологію лікування хронічних ран у пацієнтів з гнійними ранами нижніх кінцівок на тлі цукрового діабету II типу із застосуванням комплексної терапії. На першому етапі для активації запального процесу на стадії альтерації проводили опромінювання осередку рани червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм) протягом 15 хвилин. На стадії ексудації з метою локалізації запального процесу та стимуляції регенерації та факторів імунорезистентності застосовували багаторазове опромінювання зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм). Для інгібування імунних факторів, завершення запалення та для запобігання рецидивам застосовували багаторазове опромінювання синім світлом ( $\lambda = 470$  нм).

### **3.2.1 Активність нейтрофілів в кисненезалежному та киснезалежному фагоцитозу після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі**

Фагоцитуючі клітини виконують роль в підтримці імуногенетичного контролю внутрішнього середовища організму завдяки наявності специфічних поверхневих рецепторів, і тим самим ці клітини здатні до хемотаксису, адгезії і ендоцитозу. Поглинальну і окислювальну здатність фагоцитуючих нейтрофілів оцінювали *in vitro* після застосування комплексного впливу світла різних довжин хвиль ( $\lambda = 660$  нм,  $\lambda = 530$  нм,  $\lambda = 470$  нм) та екзосом МСК. Показники фагоцитарної активності нейтрофілів (фагоцитарний індекс, фагоцитарне число і індекс завершеності фагоцитозу) мали тенденцію до нормалізації після світлової дії. Так, фагоцитарний індекс (ФІ), який характеризує кількість клітин, що беруть участь у фагоцитозі після комплексного впливу знижувався в середньому на 26 % у порівнянні з даним показником до комплексного світлового впливу та екзосом МСК (рис. 3.33).

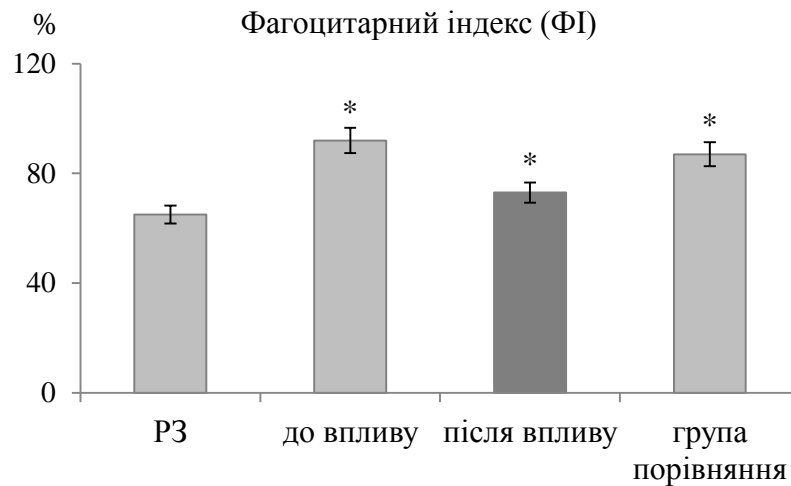


Рис. 3.33 Фагоцитарний індекс (ΦІ) до та після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з референтними значеннями (РЗ)

Середня кількість антигенних частинок, поглинених одним нейтрофілом – фагоцитарне число (ΦЧ) – до впливу була підвищена і становило в середньому  $(4,9 \pm 0,3)$  ум. од. при референтному рівні  $(2,9 \pm 0,1)$  ум. од. (рис. 3.34). Після комбінованої дії рівень ΦЧ двократно знижувався, і навіть ставав нижче на 26 % за референтний рівень (рис. 3.34).

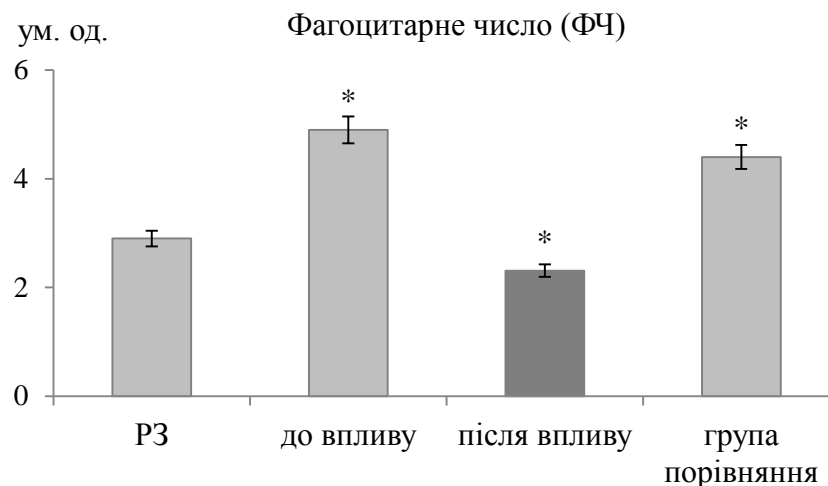


Рис. 3.34 Фагоцитарне число (ΦЧ) до та після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з референтними значеннями (РЗ)

Після комбінованого впливу виявили незначне зростання (на 12 %) індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ), який характеризує виконання нейтрофілами їх фагоцитуючих функцій (рис. 3.35).

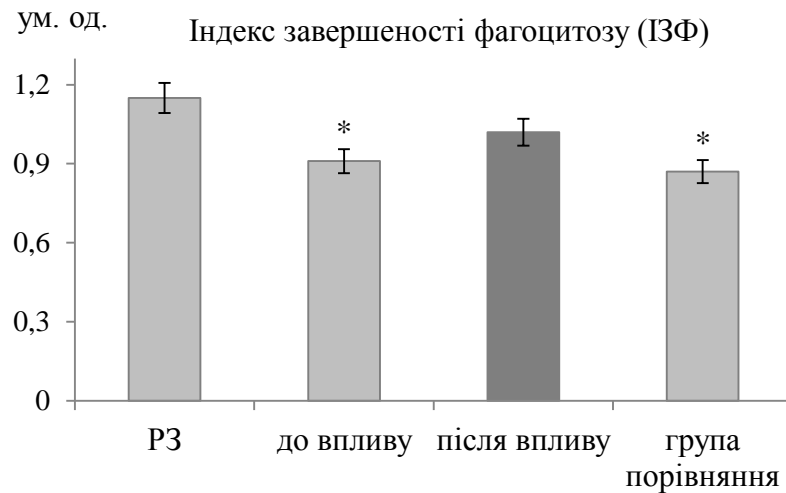


Рис. 3.35 Індекс завершеності фагоцитозу (ІЗФ) до та після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з референтними значеннями (РЗ)

У випадку, коли не застосовували комбіновану дію фізичних та біологічних факторів при довготривалому запальному процесі (група порівняння) ІЗФ становив в середньому  $(0,87 \pm 0,2)$  ум. од. і був на рівні ІЗФ до комплексного світлового впливу (рис. 3.35).

Незавершеність фагоцитарної функції нейтрофілів призводить до накопичення інфекційних антигенів в тканинних депо і можливого розповсюдження інфікованих клітин гематогенним шляхом, з подальшим інтенсивним утворенням аутоантитіл до тканин різної локалізації [18]. Здатність фагоцитуючих нейтрофілів периферичної крові до переварювання антигену на різних етапах світлового впливу свідчить про значне збільшення ендоцитозу антигенів при гострій системній запальній реакції.

Серед широкого спектру проявів функціональної активності нейтрофілів особливе місце відводиться кисневому метаболізму – унікальній



системі немітохондріального дихання клітини, яке різко зростає в процесі клітинної активації. Цей процес супроводжується підвищеним споживанням глюкози і кисню, а також збільшенням продукції АФК: супероксид аніону, пероксиду водню, гідроксил радикалу і синглетного кисню [186].

Результати досліджень загальної окисно-відновної активності нейтрофілів в тесті відновлення нітросинього тетразоля (НСТ-тест) показали, що клітини поглинали і окислювали гранули барвника НСТ з різною інтенсивністю, залежно від відновлювальної здатності ферментів, під впливом супероксид аніону ( $O_2^-$ ), що утворюється в НАДФ-Н-оксидазній реакції.

Було оцінено кількість клітин, що поглинули барвник НСТ в спонтанно (СП) та індукованому під дією зимозану (СТ). Рівень спонтанної активації ферментних системі нейтрофілів після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі становив  $(25,4 \pm 3,6) \%$ , тобто знижувався відносно рівня до впливу, але залишався у 2,5 рази вище за референтний рівень (рис. 3.36).

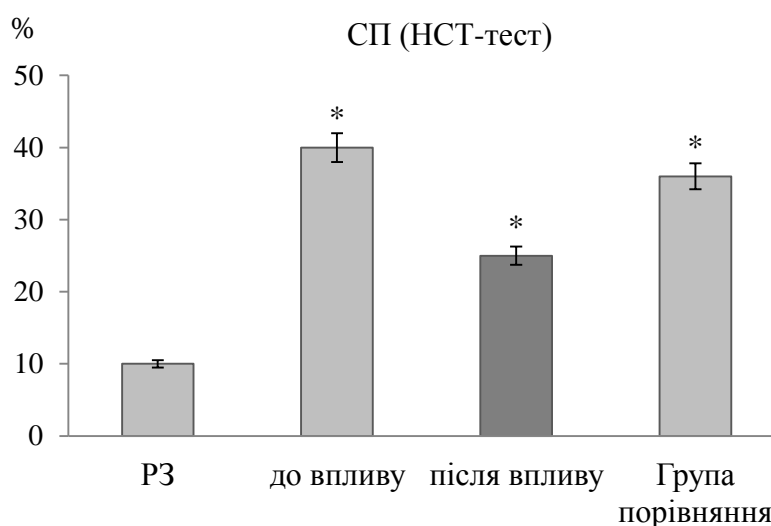


Рис. 3.36 Спонтанна активність ферментів нейтрофілів (СП) у НСТ-тесті до та після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з референтними значеннями (РЗ)

Додаткова стимуляція зимозаном приводила до збільшення на 50 % рівня активності ферментних систем (СТ) нейтрофілів після комбінованого впливу при довготривалому запальному процесі (рис. 3.37).

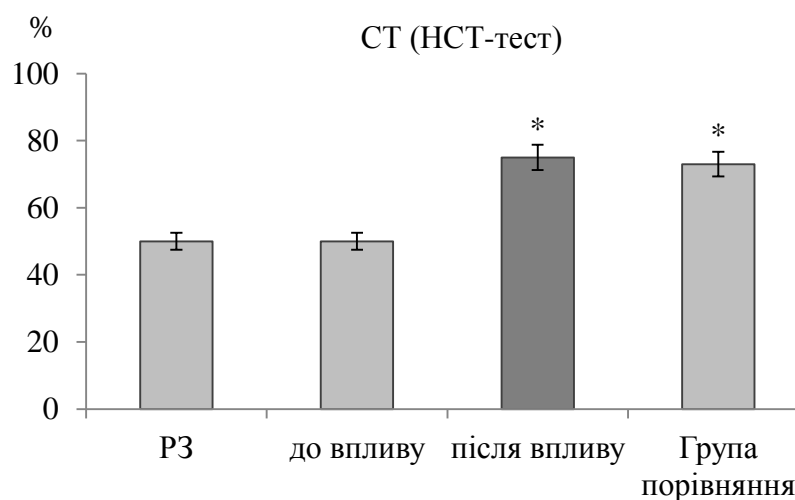


Рис. 3.37 Стимульована зимозаном активність ферментів нейтрофілів (СТ) у НСТ-тесті до та після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з референтними значеннями (РЗ)

Лізосомальні ферменти в фагосомі руйнують мікроорганізми за допомогою механізму ендоцитозу за участі АФК – аніон пероксиду ( $O_2^-$ ) і з утворенням перекисів водню –  $H_2O_2$ , хлорноватистої кислоти –  $HOCl$ , мієлопероксидази –  $MPO$  і фосфоліпази  $A2-PLA2$ . Гідролітичні ферменти фагосоми – гранзіми, лактоферин, протеази, нуклеази, ліпази, фосфоліпази, фосфатази, сульфатази каталізують реакції розщеплення речовин, що складають структуру мікроорганізмів [186]. Одночасна дія синглетного кисню і гідролітичних ферментів викликає руйнування мембрани фагоцитів за механізмом перекисного окислення ліпідів. Шкідлива дія фотохімічного процесу обумовлена утворенням активних форм синглетного кисню в фагоцитуючих клітинах і вільно-радикальними реакціями, які аналогічні природним процесам імунної відповіді [187].

Високий рівень індукції НАДФ-Н-оксидазних реакцій зимозаном характеризував нормальну імунореактивність, а підвищення спонтанної окисної активності свідчило про виснаження окисного резерву нейтрофілів. Індекс стимуляції (ІС) зростав у 3 рази після комбінованої світлової дії, що свідчить про активацію ферментних метаболічних систем фагоцитів (рис. 3.38).

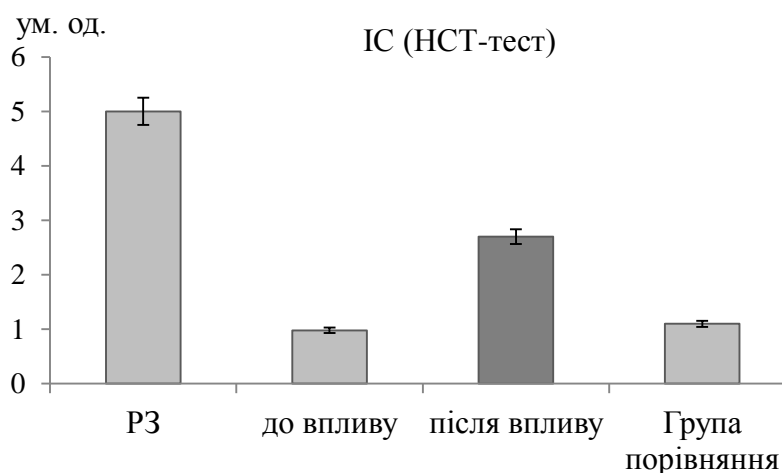


Рис. 3.38 Індекс стимуляції (ІС) у НСТ-тесті до та після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з референтними значеннями (РЗ)

При ефективному застосуванні комплексної світлової дії при довготривалому запальному процесі важливе значення має саме рівень спонтанних ферментних реакцій нейтрофілів (рис. 4.4), що є критерієм глибини ремісії і підставою для скорочення терміну запального процесу.

### 3.2.2 Показники гуморального імунітету після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі

Порушення функції імуногенетичного контролю при опосередкованій оцінці аутоімунних реакцій за допомогою визначення ступеню лімфцитотоксичності (ЛЦТ) свідчить про позитивне регулювання функціональної активності В-лімфоцитів – продуцентів аутоантитіл після

регулярного світлового впливу при запальному процесі [78]. До комбінованого світлового впливу було виявлено значний рівень ЛЦТ ( $65,2 \pm 6,4$ ) %. Після світлового опромінювання та екзосом МСК показник ЛЦТ знижувався на 91 % і становив ( $34,3 \pm 4,5$ ) % (рис. 3.39).

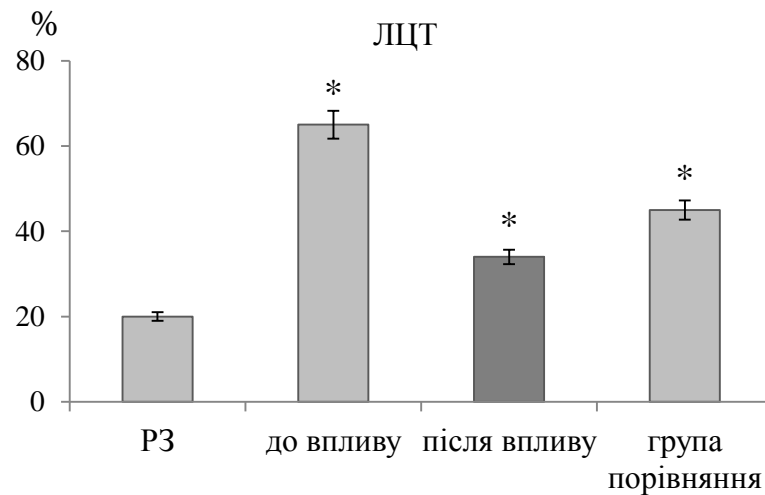


Рис. 3.39 Ступінь лімфоцитотоксичності (ЛЦТ) до та після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з референтними значеннями (РЗ)

Також визначали загальну цитотоксичність сироватки крові при довготривалому запаленні з використанням універсального біоіндикатора *D. viridis*. Було виявлено незначне збільшення рівня коефіцієнту цитотоксичності (Кц) після комплексної світлової дії (до  $8,9 \pm 0,9$  ум. од.) при Кц в контролі ( $2,0 \pm 0,02$ ) ум. од., і це в свою чергу було на 40 % вище за рівень Кц до комплексного впливу (рис. 3.40). Вочевидь, збільшення коефіцієнту цитотоксичності, який відображає вплив цитотоксичних факторів різної природи, відбувалось за рахунок їх накопичення в організмі як продуктів завершення запального процесу (після комплексного впливу).

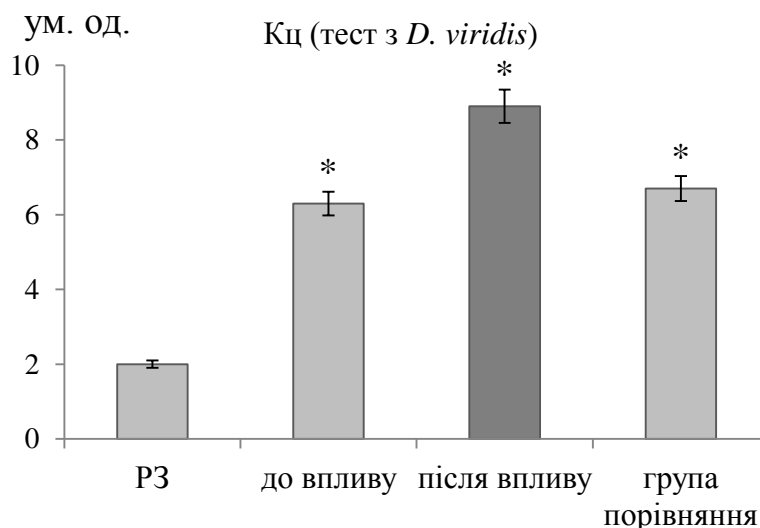


Рис. 3.40 Коефіцієнт цитотоксичності (Кц), визначений з використанням клітинного біоіндикатора *D. viridis*, до та після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з референтними значеннями (РЗ)

Мікробні антигени при попаданні в організм опсонізуються білками системи комплементу (С3, С4, С5) та імуноглобулінами IgA, IgM, IgG. Антитіла з антигенами та комплементом (АТ + АГ + комплемент) утворюють циркулюючі імунні комплекси (ЦІК), які можуть виводитися з організму або їх подальший процесинг може здійснюватися за допомогою фагоцитозу [187].

До застосування комплексного світлового впливу виявили значне зростання концентрації ЦІК до  $(203,4 \pm 21,4)$  од. Е, що у 3,6 рази перевищувало референтний рівень. Після комплексного світлового та біологічного впливу концентрація ЦІК достовірно знижувала, ймовірно за рахунок їх елімінації, і становила  $(120,3 \pm 12,6)$  од. Е (рис. 3.41).

Після регулярного світлового впливу різними довжинами хвиль ( $\lambda = 660, 530, 470$  нм) та у поєднанні з використанням додаткового біологічного фактору, який активує проліферативні процеси, знижувалась концентрація патогенних ЦІК за рахунок зниження антигенного вантажу та збільшення

активності гідролітичних ферментів, які стимулюють кліренс ЦК з організму.

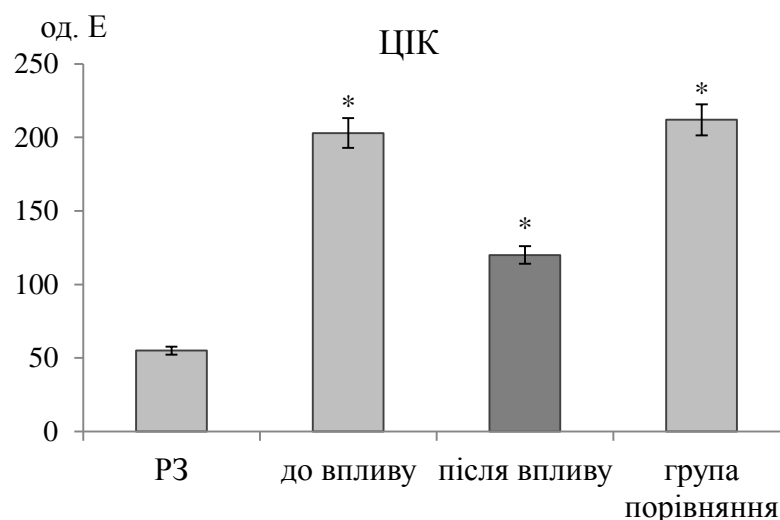


Рис. 3.41 Концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦК) до та після комбінованої світлової дії при довготривалому запальному процесі. \* –  $p < 0,05$  у порівнянні з референтними значеннями (РЗ)

Екзосоми МСК у поєднанні зі світловим впливом чинили позитивну метаболічну дію за рахунок біологічно активних екзаметоболітів, діяли як додаткові фактори мікрооточення для таргетних клітин і чинили виражений загоювальний ефект, а саме мали здатність індукувати ангіогенез, проліферацію, міграцію і диференціацію основних типів клітин, не лише на локальному рівні, а й організму в цілому.

Таким чином, на першому етапі запальної реакції після багаторазового світлового впливу червоне світло ( $\lambda = 660$ ) викликало посилення гуморальних реакцій і фагоцитозу з інтенсивним утворенням АФК і з подальшим посиленням локальної інфільтрації рани та альтерації тканинних ран. На другій фазі світлового впливу зеленим світлом ( $\lambda = 530$ ) та аплікацій екзосом МСК нормалізувалась бар'єрна функція фагоцитозу та показники гуморального імунітету, що призводило до посилення регенеративних

процесів. На завершальній стадії запалення використання синього світла ( $\lambda = 470$ ) сприяло нормалізації гуморальних реакцій (рис. 3.42).

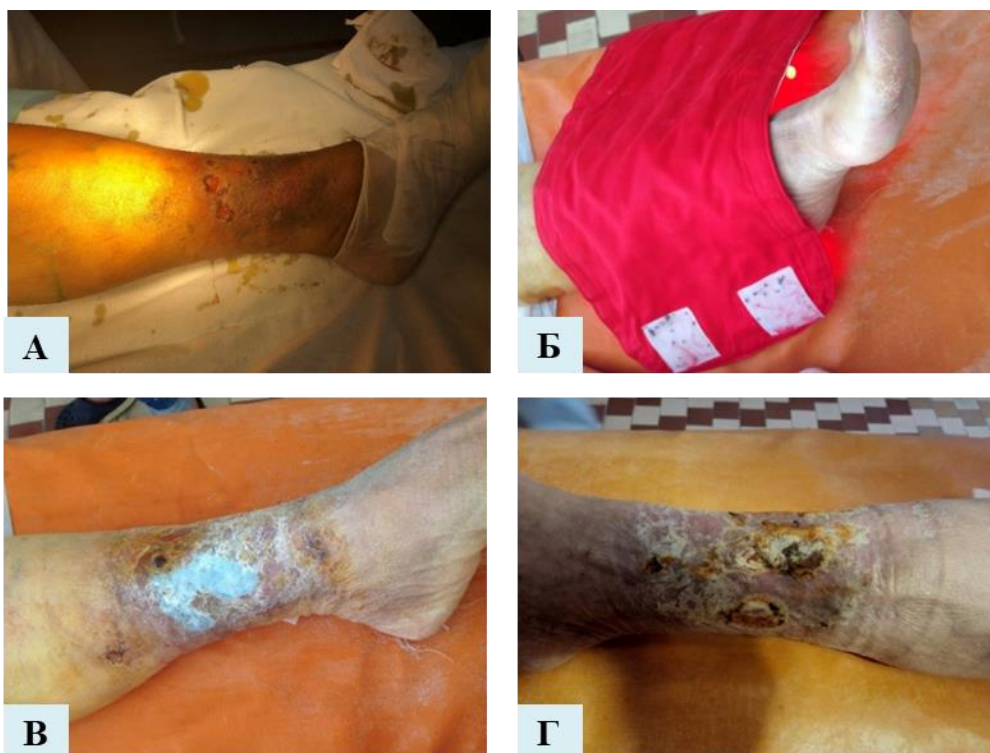


Рис. 3.42 Результати комплексного світлового впливу (червоного  $\lambda = 660$  нм, зеленого  $\lambda = 530$  нм, синього  $\lambda = 470$  нм) та екзосом МСК при довготривалому запальному процесі: А – трофічна виразка гомілки до лікування; Б – світловий вплив на осередок довготривалого запального процесу; В – лікування рани на 5-ту добу; Г – загоєння рани на 7-у добу

Фотопроміювання (червоне світло –  $\lambda = 660$  нм, зелене світло  $\lambda = 530$  нм, синє світло –  $\lambda = 470$  нм) у комплексі з використанням екзосом МСК сприяло корекції імунної відповіді, відновленню метаболічних реакцій, а також проявляло ефекти на тривалість етапів запального процесу, а саме сприяло якнайшвидшому очищенню ран, поліпшенню мікроциркуляції; стимуляції утворення АТФ у мітохондріях, підвищенню біоенергетичного потенціалу та активності клітинних мембран; стимуляції грануляцій та епітелізації, загоєнню ран.

### Висновки до розділу 3

З отриманих результатів на моделі ЛПС-індукованого перитоніту (експериментальна модель I) виявили, що під впливом червоного світла ( $\lambda = 660$  нм) активуються функції хемотаксису та адгезії нейтрофілів у кисненезалежному фагоцитозі, і посилюється їх бактерицидна активність, пов'язана з надмірним утворенням АФК у кисненезалежному фагоцитозі. Дія червоного діапазону спектру призводила до збільшення концентрації опсонізуючих гуморальних факторів, які мають мембранотропну цитотоксичну дію (підвищення ступеню лімфоцитотоксичності), що позитивно впливало на першу стадію запального процесу – альтерацію.

Під впливом зеленого світла ( $\lambda = 530$  нм) посилювалася поглинальна здатність фагоцитів, що призводило до ефективної елімінації циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) та сприяло очищенню запального вогнища від патогенів на стадії ексудації. Після застосування зеленого світла на другій стадії запалення доцільним є використання екзосом МСК (експериментальна модель II), які б активували проліферативні процеси.

На стадії проліферації найбільшим позитивним ефектом володіло синє світло ( $\lambda = 470$  нм), яке достовірно інгібувало запальний процес, а саме зайву фагоцитарну активність і посилювало ендоцитоз фагоцитів, що сприяло проліферації на заключній стадії запалення.

В якості додаткового фактору інгібування імунологічних реакцій на цьому етапі запального процесу можливе використання аплікацій із застосуванням НЧ діоксиду церію малого розміру (2 нм, в концентрації 0,1 М), які не проявляють цитотоксичного ефекту, що було показано на клітинній тест-системі *D. viridis* (експериментальна модель III).

Таким чином, комбінована світлова дія з використанням різних довжин хвиль (червоне світло  $\lambda = 660$  нм, зелене світло  $\lambda = 530$  нм, синє світло  $\lambda = 470$  нм) та у поєднанні з додатковим біологічним фактором стимулює утворення АФК, регулюючи функціональний стан фагоцитів, що



проявляється в активації хемотаксису та ендоцитозу нейтрофілів, посиленні стимуляції окислювального резерву ферментів у кисень-залежному фагоцитозі. Також комбінована дія впливала на показники гуморального імунітету, і відображала активність клітинних механізмів відповідно до певних стадій запального процесу – відбувалась нормалізація ступеню лімфоцитотоксичності та зниження концентрації циркулюючих імунних комплексів. Поетапне комплексне використання світлового впливу різного діапазону (червоне світло –  $\lambda = 660$  нм, зелене світло  $\lambda = 530$  нм, синє світло –  $\lambda = 470$  нм) та екзосом МСК сприяли позитивній модуляції та скороченню всіх стадій запального процесу, що показано на прикладі довготривалого запального процесу.

Результати досліджень даного розділу наведено у публікаціях здобувача [175-185], [188-199].

## РОЗДІЛ 4

### ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Запальна реакція в осередку ураження складається з тісно пов'язаних між собою послідовних фаз: альтерації, ексудації, інфільтрації, регенерації та проліферації. Тривалість та вираженість запального процесу залежать від характеру ушкодження, етіологічних факторів, вираженості окремих стадій запалення та розвитку різних типів імунної відповіді [12].

Осередок запалення є потужним джерелом розвитку патологічних імунно-нейро-ендокринних реакцій з подальшим розладом мікроциркуляції та клітинного метаболізму [168]. Запалення є зміною гомеостазу, яка характеризується динамічною сталістю лише на тлі нормальної реактивності та резистентності організму, що й спостерігалось у тварин з ЛПС-індуковним перитонітом групи 2 (експериментальна модель I). При формуванні імунопатології реакції на тлі запалення необхідно приймати до уваги вектор його розвитку з урахуванням гострої течії, хронізації процесу чи рецидиву. Для корекції гострих і хронічних запальних процесів традиційно використовують антибактеріальні препарати, які впливають на вогнище запалення, мають інгібуючу дію на імунітет, але негативно впливають на корисний мікробіом організму. Крім того, часто виникають ускладнення через попадання в кровообіг продуктів життєдіяльності мікробних антигенів. У зв'язку з цим відбувається розлад клітинної реактивності, що проявляється зміною структури та функції клітинних мембран [16]. Як альтернативу при хронічних запальних процесах використовують фотоопромінювання, лазерну та фотодинамічну терапію, а також клітинну терапію із застосуванням мезенхімальних стовбурових клітин [26, 200].

Комплекс заходів, спрямованих на корекцію порушень гомеостазу, має враховувати тимчасові особливості запальної реакції в осередку ураження, [168]. Первинна стадія – альтерація – обумовлена дією пошкоджуючого фактора на тканину зі зміною в ній обміну речовин, структури та функції, а

вплив мікробного антигену в нормі викликає активацію нейтрофілів. На стадії альтерації фагоцитуючі клітини реагують першими, і повинні забезпечувати завершений ендоцитоз антигенів [201]. Але, як правило, перший етап запальної реакції не завжди ефективний. Нами у тварин групи 2 (ЛПС-індукований перитоніт без світлового впливу) на першому етапі запалення виявлено достовірне зниження всіх показників бар'єрної функції кисненезалежного фагоцитозу, в тому числі ендоцитозу, в порівнянні з інтактними тваринами групи 1. Спостережуване пригнічення фагоцитозу на наступній стадії запалення – ексудації та інфільтрації – при посиленні катаболізму у групі 2, відбувалося через накопичення у міжклітинному просторі продуктів тканинного обміну у вигляді токсичних молекулярних патернів, пов'язаних з пошкодженням клітин (DAMP – damage-associated molecular pattern). На завершальній стадії запального процесу показники фагоцитозу у тварин групи 2 не досягали контрольного рівня значень хемотаксису, адгезії та ендоцитозу. У роботі показано, що фактори уродженого імунітету в групі 2 не справлялися з запальним процесом на другому етапі. Через недостатність компенсаторних процесів при запаленні фагоцитуючі клітини формують філоподібні вирости – так звані «нейтрофільні пастки» у вигляді денатурованих ниток ДНК у міжклітинному просторі на тлі екзогенного викиду протеаз (гіалуронідази, еластази, колагенази) [202], що призводило до незавершеності ендоцитозу, яке спостерігається у тварин групи 2 на цій стадії. На другій стадії запалення ініціюється системи гемостазу, провокується розвиток ексудативно-судинних реакцій [203]. У тварин групи 2 на стадії ексудації – виявили активацію клітинної деструкції, про що свідчило збільшення лімфотоксичності в 1,5 рази в порівнянні з групою 1 інтактних тварин (рис. 3.9). Також виявили недостатнє утворення циркулюючих імунних комплексів (ЦК) через затримку диференціювання антитілоутворюючих специфічних клонів плазматичних В-лімфоцитів – продуцентів імуноглобулінів на ранньому етапі запалення. Кількість специфічних імуноглобулінових антитіл на першому етапі запалення може

бути неадекватно низькою, що знижує нейтралізацію відповідних антигенів. Виявлене пригнічення антителиутворення у групі 2 на першому етапі запального процесу після введення ЛПС є оптимальним при запаленні, яке має набувати оборотний перебіг. Транзиторне пригнічення специфічної реакції взаємодії антитіл з антигенами може бути наслідком недостатності функції тимусу та селезінки при запаленні [18].

Процес ексудації має двояке біологічне значення: патогенне та адаптивне. Адаптивне значення полягає у фіксації в осередку запалення токсичних молекул DAMP у вигляді флогогену та створенні умов для їх інактивації, а патогенне – у можливому поширенні запального процесу в сусідні тканини та утворення безлічі вогнищ деструкції [203]. У деяких тварин 2-ї групи спостерігали дифузне поширення запального процесу всередині очеревини, оскільки при запаленні на фоні активації перекисного окислення виділяється безліч цитотоксичних молекул, які викликають зміни у навколишніх тканинах. На цьому фоні пошкодження епітеліальних та ендотеліальних клітин сприяє вивільненню медіаторів запалення. Важливим завершальним механізмом розвитку запальної реакції є процеси, спрямовані на активацію міжклітинної взаємодії та регенерацію тканини, при якій збільшується число стромальних та паренхіматозних клітин, утворюються міжклітинні речовини у вогнищі запалення [201].

Відомо, що формування адаптивних пристосувальних процесів забезпечується індивідуальними механізмами [16]. При розвитку стадій запалення адаптація організму може переходити на пасивний шлях пристосування, при якому знижується споживання кисню, продукція макроергічних сполук, потреба в поживних речовинах, вітамінах, призводить до зменшення рівня обмінних процесів, біотрансформації та розвитку тканинного ацидозу в осередку запалення [204].

Виявлені зміни імунологічних маркерів достовірно відрізнялися від контролю (група 1 – інтактні тварини), причому як норму слід вважати лише інтервал оптимального функціонування імунної системи. На підставі

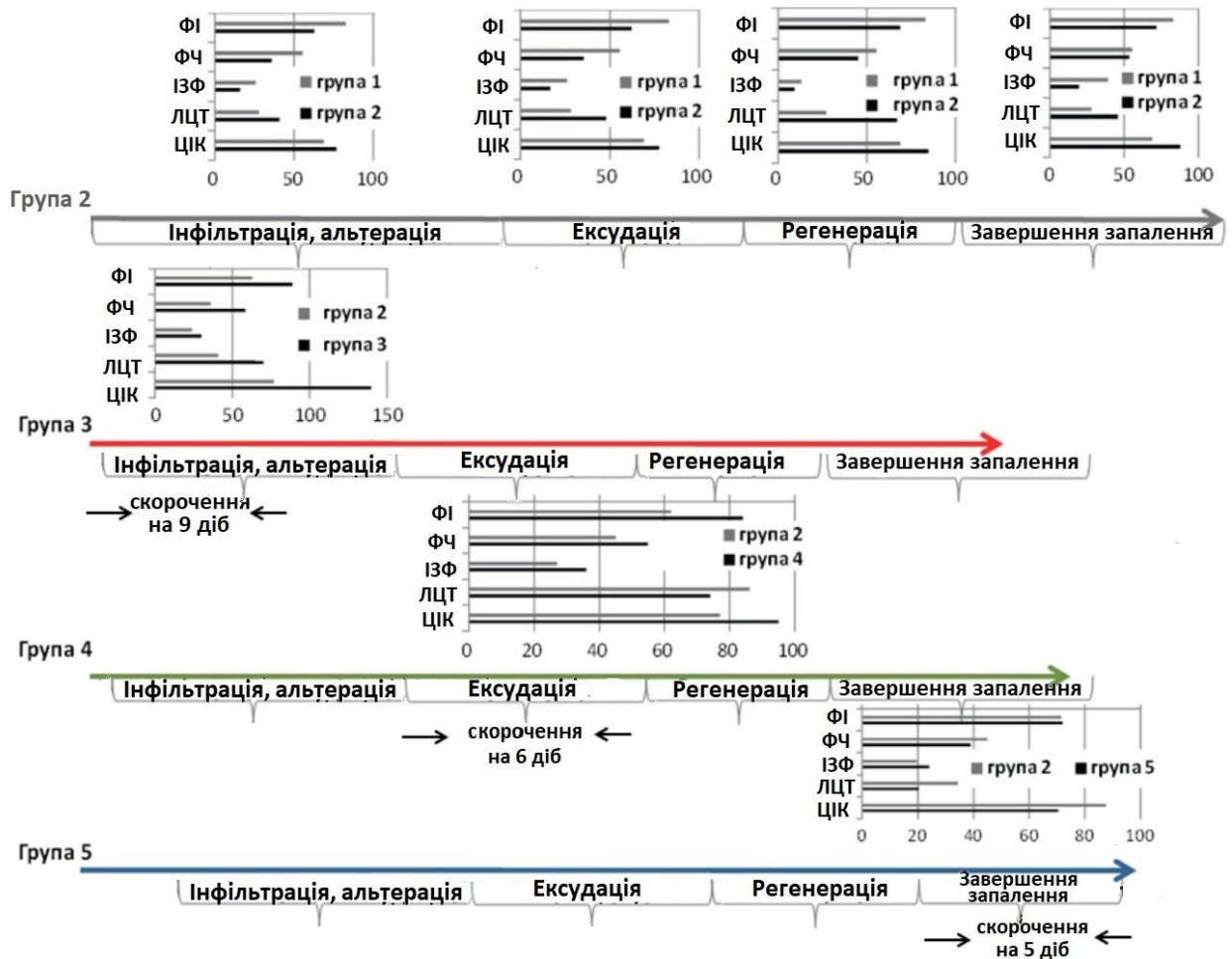
моніторингу характеру змін імунореактивності у експериментальних тварин (групи 3, 4, 5) після фотоопромінювання протягом усього експерименту для детального порівняльного аналізу було обрано саме ті періоди запалення, при яких відбувалися виражені позитивні зміни в порівнянні з групою 2 (ЛПС-індукований перитоніт без світлового впливу) для кожної довжини хвилі видимого світла.

Ankri R. et al. показали, що клітини організму вибірково використовують діапазон електромагнітних хвиль за допомогою специфічних рецепторів для активації електрозалежних енергетичних біохімічних процесів [74]. У тварин групи 2 (група порівняння – ЛПС-індукований перитоніт без світлового впливу) виявили більш тривалий перебіг стадій запального процесу, ніж у тварин груп 3, 4, 5 після фотоопромінювання різними довжинами хвиль (рис. 4.1). Довготривалий запальний процес у групі 2 характеризувався розвитком вираженої токсичності у деяких тварин, що є основною ланкою патогенезу та індивідуальний розвиток цього процесу обумовлено безпосередньою дією специфічних тригерних факторів. На думку Motwani M. P. et al., це може бути наслідком індивідуального порушення регуляторної ланки імунно-нейро-ендокринного комплексу, внаслідок чого і відбувається розлад механізмів закінчення та біотрансформації на етапі альтерації та ексудації [203].

На різних етапах запального процесу, які відрізняються вираженістю імунопатологічних реакцій від групи 2 їх специфічними кількісними характеристиками, фотоопромінювання різними довжинами хвиль надавало різноспрямований вплив у групах 3, 4, 5. При співставленні тривалості запального процесу у групах після фотоопромінювання (група 3, 4, 5) з групою 2 (без фотоопромінювання) виявили зменшення тривалості запального процесу, що протікає на тлі ЛПС-індукованого перитоніту.

Достовірно значні зміни досліджуваних показників виявлено у групі 3 (ЛПС-індукований перитоніт та вплив червоно світла  $\lambda = 660$ ). Активація показників фагоцитозу призводила до зменшення тривалості фази альтерації порівняно з групою 2, що скорочувало перебіг запалення на 9 діб. Тривалість

запального процесу зменшувалася на 6 діб за рахунок фази ексудації в період розлитого перитоніту у групі 4 на фоні опромінювання зеленим світлом  $\lambda = 530$  нм). У групі 5 (ЛПС-індукований перитоніт та фотовплив синього світла  $\lambda = 470$  нм) призводило до скорочення тривалості запального процесу на 5 діб (рис. 4.1).



У роботі виявили активацію показників бар'єрної функції фагоцитозу (фагоцитарний індекс, фагоцитарне число, індекс завершеності фагоцитозу, спонтанна активність ферментних реакцій) у тварин групи 3 на першому етапі запалення після фотоопромінювання червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм) (рис. 4.1).

Збільшення окисного стресу призводило до підвищеної загибелі клітин [76]. Як показано Freitas L. F. et al. [78], одним з механізмів взаємодії фотонів світла з біологічними мембранами є зміни чутливості іонних каналів клітинних мембран через наявність іонних градієнтів.

Виявлено також активацію гуморального імунітету після фотоопромінювання червоним світлом (група 3). У цій групі антитіла інтенсивно опсонізували токсичні молекули DAMP та інфекційні антигени PAMP (pathogen-associated molecular pattern) у вогнищі запалення, що призводило до значного збільшення концентрації циркулюючих імунних комплексів (ЦК) (табл. 3.1). Спостерігали максимальний розмах значень лімфоцитотоксичності у групі 3 після впливу червоним світлом на етапі інфільтрації (рис. 3.9). Стимуляція фагоцитозу та індукція утворення цитотоксичних факторів і антитіл сприяло значному скороченню тривалості запального процесу на 9 діб.

Chen A. C. et al. показали, що світлове опромінювання відновлює гомеостаз клітин і призводить до прискорення загоєння ран [205]. На певних стадіях запального процесу велике значення має розвиток або пасивних, або активних механізмів пристосування. Пасивні механізми характеризуються спазмом судин, а активні – вираженою фагоцитарною інфільтрацією за рахунок міграції фагоцитів у вогнище запалення, де відбувається активний клітинний кілінг [16].

Поряд з цим у деяких тварин групи 3 (ЛПС-індукований перитоніт та дія червоного світла) на стадії інфільтрації виявили індивідуальну реакцію на фотоопромінювання – активація запалення не спостерігалася. Про це свідчить виявлений під час статистичної обробки високий розмах значень ЦК у групі 3 через центральні тенденції асиметричного розподілу досліджуваних показників у вибірці (табл. 3.1). Математична обробка результатів дослідження дозволяє знаходити причинно-наслідкові взаємодії у досліджуваних параметрах. Основні патерни показника лімфоцитотоксичності у цій групі були представлені між 20 % та 60 %. Але в деяких тваринах

спостерігали індивідуальні зміни імунореактивності Розмах величин значень лімфоцитотоксичності в інших групах, у тому числі й у інтактних тварин, був нижчим і не перевищував 15 % (рис. 3.9).

Таким чином, дія червоного світла ( $\lambda = 660$  нм) сприяла загостренню запального процесу за рахунок активації бар'єрної функції кисне незалежного і кисне незалежного фагоцитозу, процесів катаболізму та анаболізму, та специфічного антитілоутворення на першій стадії запального процесу. Опромінювання даної довжиною хвилі сприяло значному скороченню часу перебігу запального процесу порівняно з групою 2 тварин за рахунок скорочення стадії альтерації.

Yoshino F. & Yoshida A. виявили позитивний ефект після застосування червоного та синього світлодіодного випромінювання при локалізованих гнійно-некротичних процесах, що проявлялось зниженням вираженості запально-проліферативних реакцій та позитивними змінами у клітинних структури паренхіматозних органів [206].

Сибірною Н. О. із співавторами показано, що дія низькоінтенсивного фотоопромінювання в діапазоні видимого спектру  $\lambda = 660$  нм (червоне світло) викликало стимуляцію кістковомозкового кровотворення, що виявлялося у збільшенні кількості еритроцитів та лейкоцитів у тварин [76, 207]. Існує думка, що фотони червоного світла забезпечують активацію міжклітинної взаємодії, викликають прискорення фізико-хімічних реакцій, активуючи рецептори, заповнюють енергію організму за допомогою активації утворення АТФ, посилюють обмін кисню та  $\text{CO}_2$ , що сприяє покращенню лімфообігу, сприяє вивільненню біологічно активних речовин, а також надає симпатикотонічний вплив, активує кортико-адренову систему [67, 73]. Також було виявлено вплив видимого світла на проникність лізосом та зміни цілісності клітинних мембран, що призводило до виходу з них білків катепсинів, що може ініціювати утворення фаголізосом та активувати гранзимні ферменти фагоцитуючих клітин. Ці процеси запускають апоптоз на



фоні активації апоптичних лісосомальних і мітохондріальних ферментних каскадів [208].

В дисертаційній роботі показано, що багаторазове застосування фотоопромінювання зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм) видимого діапазону спектра у тварин групи 4 з експериментальним ЛПС-індукованим перитонітом на стадіях альтерації та ексудації запальної реакції чинило виражений позитивний ефект на показники фагоцитозу. Гуморальні фактори імунітету в цій групі – ступінь лімфоцитотоксичності та сироватковий вміст ЦК – у більшості тварин знизилися в порівнянні з групою 2, що є позитивною зміною, оскільки на цій стадії запалення після утворення клітинного дебрису та DAMP відсутній антигенний субстрат для індукції лімфоцитотоксичності та утворення ЦК. Підтвердженням цього є скорочення тривалості цього етапу запального процесу у групі 4 на 6 діб (рис. 4.1).

Фотовплив може бути спрямований на різні клітинні органоїди шляхом регуляції їх структурно-функціональних особливостей. Найбільш чутливими до фотодії є мітохондрії – енергетичні фабрики клітини. При фотодії посилюється проникність клітинних мембран та функція цитотоксичних клітин – продукція порфіринів, які мають спорідненість до мітохондріальних мембран. В свою чергу, фотозбудження порфіринів посилюється в мітохондріях вторинною генерацією мітохондріальних АФК [208].

Виявили значне зниження лімфоцитотоксичності порівняно з цим показником у групі 2 на етапі альтерації та ексудації, що відповідає наявним відомостям про антисептичну дію зеленого світла [87]. Дія зеленого світла з довжиною хвилі 530 нм викликала посилення проникності мембран клітин та активацію синтезу нових молекул, що виражалося збільшенням лімфоцитотоксичності за рахунок синтезу токсичних молекул і ЦК, що являють собою продукт взаємодії антигенів з антитілами та комплементом, що нагадує індукцію ферментів при фотосинтезі (рис. 3.16). Фотоопромінювання зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм) видимого діапазону спектра сприяє

вазодилатації, розширенню капілярної сітки, збільшенню клітинної проникності на стадії ексудації, і тим самим має антисептичну дію [209].

У роботі показано, що зелена частина спектру ( $\lambda = 530$  нм) сприятливо впливала на стадію ексудації, що сприяло регенерації шляхом синхронізації тих ефектів катаболізму та анаболізму, які створюються фотоопромінюванням червоною та синьою частинами спектру. Показано, що довжина хвилі, яка відповідає зеленій частині спектру, активує каскад перетворень, що сприяє нормалізації клітинного метаболізму [75].

Ряд авторів показали, що фотоопромінювання зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм) видимого діапазону спектру має потужну енергію і надає стимулюючу дію на імунно-гормональну сферу за допомогою функції гіпофіза, також активує трофіку тканин та проникність мембран, що сприяє прискоренню процесів ексудації та подальшої регенерації за рахунок динамічної рівноваги катаболічних та анаболічних процесів [75, 76, 85, 209]. Фотоопромінювання зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм) сприяє активації синтезу фактора росту ендотелію судин (VEGF) та трансформуючого фактора росту  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), а також посилюється проліферація клітин. Отже, зелене світло за рахунок активації синтезу факторів росту посилює анаболічні репаративні процеси та регенерацію судинного ендотелію [84, 201, 210].

Формування індивідуальної природної резистентності визначається сукупністю ланок імунореактивності. Процес загоєння ран за інших рівних умов у різних осіб має свої характерні особливості, зокрема відомо, що при зниженій імунореактивності загоєння ран надзвичайно мляве. Ефективність фотоопромінювання зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм) на стадії альтерації та ексудації може бути недостатньою для досягнення ефекту подальшої стимуляції регенеративних процесів. У цьому випадку для активації регенерації та загальної регуляції гомеостазу після фотоопромінювання зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм) доцільним є застосування біологічних факторів – екзометаболітів мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) плаценти. Екзосоми МСК активують фактори мікрооточення; мають здатністю

активувати ангиогенез, проліферацію, міграцію та диференціацію основних типів клітин, що беруть участь у регенерації [11]. Раніше було показано, що застосування фотодинамічної терапії та внутрішньовенне введення МСК у хворих з хронічними гнійними ранами викликає активацію вродженого та адаптивного імунітету, швидке очищення ран та ефективну грануляцію ранової поверхні, що призводило до значного скорочення термінів запального процесу [211, 212].

На експериментальній моделі II для оцінки впливу екзосом, що містять екзометаболіти МСК плаценти, на проліферативний потенціал лімфоцитів у культурі *in vitro*, після спільного культивування лімфоцитів з екзосомами, виявили 3-кратну стимуляцію проліферації лімфоцитів, взятих у пацієнтів із трофічними гнійними ранами на тлі вираженої токсіємії (рис. 3.17).

Завдяки феномену везикулярного транспорту, стовбурові клітини, що продукують біологічно активні речовини ( $\gamma$ -інтерферон, цитокіни, фактори росту), накопичують і виділяють їх в везикулах в позаклітинний простір у вигляді екзосом [100].

Для гальмування гіперреактивності деяких реакцій імунітету традиційно застосовують різні джерела фотоопромінювання синьою частиною спектра світлового діапазону [213]. Показано, що синє світло ( $\lambda = 470$  нм) має властивість гальмування багатьох функцій, і тим самим надає виражений бактерицидний ефект [48]. Терапевтичний потенціал у видимій частині світлового діапазону при довжині хвилі  $\lambda = 470$  нм призводив до структурно-функціональних змін лейкоцитів, зростання кількості моноцитів та гранулоцитів [56]. Також відомо, що синя частина видимого діапазону спектра надавала певний модулюючий ефект на цитотоксичну активність нормальних кілерних клітин, пригнічувала активність дендритних клітин [214]. Однак недостатньо вивчено етіотропну дію світла на функції вродженого та адаптивного імунітету.

У наших експериментах на тваринах синє світло ( $\lambda = 470$  нм) надавало гальмуючу дію на імунні реакції, що виражалось зниженням ступеня синтезу

мембранотропних цитотоксичних факторів (лімфоцитотоксичність), імуноглобулінів, білків системи комплементу, що утворюють ЦІК (рис. 3.24, табл. 3.3). При цьому синє світло сприяло активації фагоцитозу на тлі повного інгібування альтерації, ексудації та проліферації тканини черевної порожнини на завершальній стадії запального процесу (рис. 3.23). Фотоопромінювання експериментальних тварин сприяло покращенню мікроциркуляції, підвищенню біоенергетичного потенціалу та активності клітинних мембран, що призводило до інгібування рецидивів запальної реакції.

Синє світло ( $\lambda = 470$  нм) має високу хімічну енергію, виражену протизапальну дію, а також посилює кровообіг по венозних судинах і знижується набряк та судинний опір до норми [76]. Дія синього світла має високу терапевтичну ефективність, у зв'язку з цим його рекомендують застосовувати з метою протизапального ефекту при гнійно-інфекційних захворюваннях, резистентних до антибіотиків [48, 56, 61].

Як відомо, антропогенний вплив на довкілля став потужним екологічним фактором, і інтенсивний розвиток нанотехнологій та нанобіотехнологій [135], як антропогенного фактора, має кілька важливих аспектів: 1 – нові наноматеріали можуть знайти широке застосування та впливати на різні біологічні системи; 2 – нові матеріали можуть стати «інструментом» у медичних технологіях, а й у наукових дослідженнях щодо біологічних об'єктів; 3 – необхідні розробки різноманітних тест-об'єктів з метою оцінки нешкідливості нових наноматеріалів.

Існують різні методи скринінгу нових продуктів на генотоксичність, цитотоксичність та специфічність дії нових матеріалів. Однак ці методи трудомісткі, дорогі і не завжди дають однозначні біологічні відповіді. У зв'язку з цим актуальним є розробка та впровадження простих експресних методів первинного скринінгу. Як тест-об'єкт при первинному скринінгу вдалим є використання мікроводоростей; і під час створення нових наноматеріалів необхідні як знання фізико-хімічних характеристик цих

матеріалів, так й оцінка їх потенційної дії на біологічні системи різного рівня організації (від мікроорганізмів до тварин).

З використанням III експериментальної моделі було проведено оцінку цитотоксичності наночастинок (НЧ) діоксиду церію різного розміру та концентрації. За даними Sharifi S. et al. наночастинки можуть легко проникати через захисні бар'єри живих організмів і потрапляти безпосередньо в органи і тканини [215]. НЧ церію мають властивості антиоксидантів і можуть бути використані в біології та медицині як неорганічні антиоксиданти [139].

Одноклітинна водорість *D. viridis* має низку особливостей та переваг у порівнянні з іншими мікрводоростями, що дозволяє доповнити арсенал об'єктів біотестування та дослідження механізмів їх дії. Відсутність клітинної стінки у *D. viridis* забезпечує прямий контакт ксенобіотиків з плазмолемою, як і в клітинах тварин. Це дозволяє клітинам швидко залежно від коливань умов культивування змінювати форму та розміри, що є інтегральною відповіддю на наявність активних сполук або зміною фізико-хімічних факторів середовища [165].

При використанні тест-об'єкта *D. viridis* було виявлено, що НЧ церію малого розміру (2 нм) не проявляли цитотоксичного ефекту відносно клітин біоіндикатору. Такі НЧ володіють вираженим антиоксидантною дією та приймають участь у корекції метаболічних порушень, які пов'язані з патологічним рівнем глюкози в сироватці крові. Наночастинки діоксиду церію мали в 2 рази менш виражену токсичність порівняно з солями церію або були нетоксичні у концентрації 0,2 М та 0,1 М. Слід зазначити, що компоненти сироватки зменшували токсичність як солей церію, так і НЧ. Це вказує на те, що церій здатний формувати комплекси з органічними речовинами, що не мають токсичності. Цю властивість НЧ церію можна використовувати на практиці, як аплікації на завершальній стадії запалення для посилення дії синього світла з інгібуючою властивістю для пригнічення імунних факторів та завершення запалення.

Є припущення, що кванти видимого світла викликають фотомодифікацію клітин, а потім ефекти, отримані при випромінюванні, завдяки механізмам міжклітинної взаємодії, розподіляються по всьому об'єму циркулюючої крові та лімфи. Це призводить до активації рецепторів клітин тканин з наступною секрецією біологічно активних речовин. Так, дія червоного світла ( $\lambda = 660$  нм) у тварин викликала активацію синтезу гуморальних факторів імунітету, що виражалось підвищенням ступеня ЛЦТ та ЦК. Первинно вільні радикали, що утворюються, активують ланцюгові реакції і являють собою фізіологічні механізми, що формуються при поглинанні кванта світла. Крім того, дія червоного світла активувала внутрішньоклітинні процеси кисненезалежного та киснезалежного фагоцитозу. Синє світло ( $\lambda = 470$  нм) надавало парасимпатичний вплив, а зелена частина спектру ( $\lambda = 530$  нм) синхронізувала обидва впливи. Каскад перетворень, який формується після фотоопромінювання, активує метаболізм всього організму.

У роботі вперше показано, що червоне світло ( $\lambda = 660$  нм) ефективно застосовувати на стадії альтерації з метою активації запального процесу; прискорення процесів катаболізму та репарації на стадії ексудації успішно відбуваються після фотоопромінювання зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм); прискорення завершального етапу запального процесу можна досягти за допомогою багаторазового опромінювання синім світлом ( $\lambda = 470$  нм), що сприяє вазодилатації та інгібує залишкові ознаки запального процесу.

Отримані дані про ефекти фотоопромінювання, проліферативний потенціал екзосом МСК плаценти на проліферацію та відсутність цитотоксичних ефектів НЧ церію дозволяють обґрунтувати застосування їх комбінованого використання для впливу на перебіг довготривалого запального процесу.

Застосування фізичних та біологічних факторів при довготривалому запальному процесі посилює молекулярні механізми міжклітинної взаємодії всіх етапах активації первинного імунітету. Особливістю хронічних гнійних

ран, патофізіологічно складних, є тривале запалення на тлі бактеріального інфікування з незавершеними стадіями запалення (альтерації, ексудації і інфільтрації, проліферації). Це призводить до значного пошкодження тканини через надмірне виділення медіаторів, накопичення клітинного дебрису та інших продуктів розпаду (DAMP), наявності некротичної тканини, порушення мікроциркуляції, що перешкоджає загоєнню [20].

В результаті поєднаного застосування світлового впливу та біологічного фактору відбувалась стимуляція всіх етапів процесингу антигену в результаті активації кисеньнезалежного ендоцитозу і «кисневого вибуху» (утворення АФК) у фагоцитуючих нейтрофілах тканини, що приводить до активації регенеративних процесів та до епітелізації рани (рис. 3.35, 3.38).

До пригнічення регенеративних процесів і гальмування загоєння рани призводить порушення імунного гомеостазу. Хронічний процес в осередку запалення поширюється вглиб тканин і ускладнюється запальною реакцією, де головну захисну роль грає бар'єрна функція фагоцитів. Нейтрофіли, які мають потужний цитотоксичний потенціал, виключну реактивність і високу мобілізаційну готовність, виступають в першій лінії ефektorних механізмів імунологічного гомеостазу, і забезпечують підтримку імуногенетичного контролю внутрішнього середовища організму за рахунок наявності специфічних поверхневих рецепторів. На тлі складних патофізіологічних станів (наприклад, цукровий діабет) корекція хронічного запалення зводиться до тривалого застосування антибіотиків, що ускладнює перебіг процесу; гіперглікемія призводить до незворотних змін метаболізму та імунітету, що ускладнює завершення запалення [76, 212].

В результаті посилення запальної реакції на першій стадії – альтерації – опромінюванням червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм) відбувалось посилення запальної реакції. Виявили стимуляцію хемотаксису і ендоцитозу фагоцитами, тобто активацію ряду ефektorних механізмів: вторинної запальної альтерації тканин, судинної реакції. Вільнорадикальні процеси при фотовпливі призводили до інтенсивного утворення синглетного кисню, який є

сильним окислювачем, що ушкоджував бактеріальні клітини, прискорював процеси автофагії і апоптозу дефектних клітин. Після застосуванням червоного світла ( $\lambda = 660$  нм) відбувалась стимуляція інфільтрації рани за рахунок активації кисненезалежного і киснезалежного фагоцитозу при довготривалому запальному процесі (хронічні рани нижніх кінцівок, в тому числі у пацієнтів з цукровим діабетом), що виражалось у підвищенні ендоцитозу нейтрофілів.

З метою поліпшення очищення рани застосовували низькоінтенсивне опромінювання зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм) і багатократні аплікації мультимолекулярних комплексів МСК – екзосом на вогнище запалення, і виявили значне прискорення загоєння ран (відбувалась стимуляція регенеративних процесів та епітелізація на тлі нормалізації показників усіх стадій кисненезалежного фагоцитозу (хемотаксису, адгезії і ендоцитозу) і активації НАДФ-Н ферментативних реакції киснезалежного фагоцитозу). Для очищення рани і грануляції було достатньо одноразового застосування цієї довжини хвилі. Застосування кондиційного середовища МСК, що містить екзосоми, у пацієнтів з гнійно-запальними процесами різного генезу призводить до повного загоєння ран в найкоротші терміни. Екзосоми, крім їх позитивної метаболічної дії за рахунок наявності екзаметоболітів діють як додаткові фактори мікрооточення для таргетних клітин і чинять виражений загоювальний ефект, мали здатність індукувати загальні процеси ангіогенезу, проліферації, міграції і диференціювання основних типів клітин, не лише на локальному рівні, а й організму в цілому.

Застосування синього світла ( $\lambda=470$  нм) видимого діапазону спектра на завершальній стадії сприяло інгібуванню залишкових ознак запального процесу.

Таким чином, після проведення комплексного світлового впливу та застосування екзо-метаболітів МСК відбувалось прискорення загоєння рани та тривала нормалізація метаболічних порушень.



Фотоопромінювання сприяє загоєнню хронічних ран, які пов'язані з порушенням функції імунокомпетентних клітин, зниження клітинної міграції, проліферації, синтезу NO фагоцитуючими клітинами, факторів росту, синтезу колагену та інших білків позаклітинного матриксу [84]. Фотовплив збільшує кількість протеїназ, які руйнують позаклітинний матрикс і фагоцитуючі клітини залишаються у фазі інфільтрації запального процесу при загоєнні ран. Після низькоінтенсивного світлового впливу на рану відбувається збільшення АТФ, посилюється клітинна міграція, проліферація, збільшується концентрація мітохондрій та активність цитохром-С та оксидаз [75].

Застосування фізичних та біологічних факторів, що включає світловий вплив та аплікації екзосом, сприяє корекції імунної відповіді і відновленню метаболічних реакцій, а також нормалізації функції ендотелію і стимуляції мікроциркуляції, тим самим забезпечуючи процеси прискорення загоєння ран, тривало усуваючи можливі рецидиви.

#### **Висновки до розділу 4**

Таким чином, для оцінки етапів запального процесу використано експериментальну модель хронічної запальної реакції – ЛПС-індукований перитоніт. На всіх етапах запального процесу досліджували показники вродженого та адаптивного імунітету. У тварин групи 3 (ЛПС-індукований перитоніт та фотоопромінювання червоним світлом  $\lambda = 660$  нм) виявили значні зміни імунних маркерів порівняно з тваринами групи 2 (ЛПС-індукований перитоніт без опромінювання) на першій стадії запалення. Терміни запального процесу зменшились на 9 діб у групі 3 за рахунок скорочення у часі етапу альтерації. У групі 4 (ЛПС-індукований перитоніт та фотоопромінювання зеленим світлом  $\lambda = 530$  нм) виявили значні зміни імунних маркерів порівняно з тваринами групи 2 на другому етапі запалення. Терміни запального процесу зменшились на 6 діб у групі 4 за рахунок скорочення у часі етапу ексудації та інфільтрації. У 5-й групі тварин (ЛПС-

індукований перитоніт та фотоопромінювання синім світлом  $\lambda = 470$  нм), виявили значні зміни імунних маркерів у порівнянні із тваринами групи 2. Терміни запального процесу зменшилися на 5 діб у групі 5 за рахунок скорочення у часі завершального етапу запалення. В якості додаткових ефективних факторів запропоновано використання екзосом МСК плаценти (після опромінювання зеленим світлом), які сприяли стимуляції міжклітинних взаємодій імунних клітин і проліферації, та НЧ діоксиду церію малого розміру, як додатковий інгібуючий чинник на заключній стадії запального процесу.

Використання комплексної схеми світлової дії та екзосом МСК сприяє нормалізації загальних метаболічних порушень диференціювання професійних фагоцитів та показників гуморального імунітету (ступінь лімфоцитотоксичності, концентрація циркулюючих імунних комплексів). Фотоопромінювання та застосування екзосом МСК показало синергічну протизапальну дію. Фотовплив різними довжинами хвиль при довготривалому запальному процесі сприяє повному очищенню гнійних ран, швидкому зменшенню ранової поверхні та позитивній динаміці. Застосування екзосом у вигляді аплікацій на ранову поверхню посилює регенеративну функцію та процес епітелізації.

Результати досліджень даного розділу наведено у публікаціях здобувача [175-185], [188-199].

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі вивчено біологічні ефекти та механізми дії фотоопромінювання різних довжин хвиль (червоне  $\lambda = 660$  нм, зелене  $\lambda = 530$  нм, синє  $\lambda = 470$  нм) на стадії запального процесу, що дозволило визначити оптимальні терміни активації певних імунних маркерів для кожної довжини хвилі. Проаналізовані можливості біологічних (екзосоми мезенхімальних стовбурових клітин) та хімічних (наночастинки діоксиду церію) факторів, які можуть бути використані у поєднанні зі світловим впливом для скорочення окремих стадій запальної реакції.

1. Фотоопромінювання тварин з ЛПС-індукованим перитонітом різними довжинами хвиль ( $\lambda = 660$  нм,  $\lambda = 530$  нм,  $\lambda = 470$  нм) показало різноспрямовані ефекти на етапах запальної реакції. Вплив червоним світлом ( $\lambda = 660$  нм) сприяв активації ендоцитозу, посиленню гуморальних реакцій, що супроводжувалось скороченням першої стадії запального процесу порівняно з контролем на 9 діб.

2. Фотоопромінювання тварин зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм) сприяло збільшенню поглинальної здатності нейтрофілів, пригніченню гуморальних реакцій, що характеризувало завершення альтерації та стимуляцію регенеративних процесів, і зменшення запального процесу на 6 діб.

3. Фотоопромінювання тварин синім світлом ( $\lambda = 470$  нм) оказувало найменший ефект на досліджувані імунологічні параметри на ранніх етапах запалення, а на завершальній стадії запального процесу виявили достовірне зниження показників фагоцитозу нейтрофілів та інгібування гуморальних реакцій. Синє світло ( $\lambda = 470$  нм) сприяло скороченню завершального етапу та тривалості запального процесу на 5 діб.

4. Виявили триразове збільшення проліферативної активності в культурі *in vitro* лейкоцитів пацієнтів із хронічним запаленням після внесення екзосом мезенхімальних стовбурових клітин, що спільно з фотоопромінюванням

зеленим світлом ( $\lambda = 530$  нм) стимулювало проліферативні процеси на стадії регенерації.

5. Наночастинки діоксиду церію розміром 6 нм в концентрації 0,1 М проявляли значний цитотоксичний ефект. Наночастинки діоксиду церію розміром 2 нм в концентрації 0,1 М мали оптимальні характеристики і не проявляли цитотоксичної дії відносно клітин біоіндикатору *D. viridis*.

6. Виявлено імунокоригуючі ефекти комбінованої світлової дії різних довжин хвиль ( $\lambda = 660$  нм,  $\lambda = 530$  нм,  $\lambda = 470$  нм) при хронічному запальному процесі, які проявлялись у нормалізації молекулярних механізмів на етапах імунореактивності та імунорезистентності, а саме: стимуляції утворення активних форм кисню, регуляції функціонального стану фагоцитуючих клітин і гуморальних факторів. Поліфункціональний підхід для корекції запального процесу полягає у застосуванні на стадії інфільтрації та альтерації червоного світла ( $\lambda = 660$  нм) з метою активації запального процесу; на стадії ексудації для корекції та скорочення тривалості стадії запальних міжклітинних взаємодій та посилення регенеративних процесів у клітині та проліферації – використання зеленого світла ( $\lambda = 530$  нм) та екзосом мезенхімальних стовбурових клітин у вигляді аплікацій; на заключній стадії запального процесу – синє світло ( $\lambda = 470$  нм) для інгібування залишкових ознак запального процесу.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Furman D., Campisi J., Verdin E. et al. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med.* 2019. Vol. 25(12). P. 1822–1832.
2. Frykberg R. G., Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015. Vol. 4(9). P. 560–582.
3. Hofmann A. T., Slezak P., Neumann S. et al. Ischemia Impaired Wound Healing Model in the Rat – Demonstrating Its Ability to Test Proangiogenic Factors. *Biomedicines*. 2023. No. 11(4). P. 1043.
4. O'Meara S., Cullum N., Majid M., Sheldon T. Systematic reviews of wound care management: antimicrobial agents for chronic wounds; diabetic foot ulceration. *Health Technol Assess.* 2000. No. 4(21). P. 1–237.
5. Lyon K. C. The case for evidence in wound care: investigating advanced treatment modalities in healing chronic diabetic lower extremity wounds. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2008. No. 35(6) P. 585–590.
6. Houreld N. N., Abrahamse H. Effectiveness of helium-neon laser irradiation on viability and cytotoxicity of diabeticwounded fibroblast cells. *Photomed. and Laser Surg.* 2007. Vol. 25. № 6. P. 474–481.
7. Al-Watban F. A. Laser therapy converts diabetic wound healing to normal healing. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009. Vol. 27. № 1. P. 127–135.
8. Кармаш О. І., Люта М. Я., Єфіменко Н. В. та ін. Вплив низькоінтенсивного світлового випромінювання на глікемічний профіль та фізико-хімічні характеристики еритроцитів за умов цукрового діабету у щурів. *Фізіол. журн.* 2018. Т. 64. № 6. С. 68–76.
9. Conlan M. J. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation: a review. *J Clin. Periodontology*. 1996. Vol. 23. № 5. P. 492–496.
10. Al-Khawaga S., Abdelalim E. M. Potential application of mesenchymal stem cells and their exosomes in lung injury: an emerging

therapeutic option for COVID-19 patients. *Stem Cell Res. Ther.* 2020. № 11. P. 1–33.

11. Basu J., Ludlow J. W. Exosomes for repair, regeneration and rejuvenation. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2016. № 16. P. 489–506.

12. Chen L., Deng H., Cui H. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget.* 2017. No. 9(6). P. 7204–7218.

13. Cheng L., Jiang X., Wang J. et al. Nano-bio effects: interaction of nanomaterials with cells. *Nanoscale.* 2013. № 5(9). P. 3547–3569.

14. Babu K. S., Anandkumar M., Tsai T. Y. et al. Cytotoxicity and antibacterial activity of gold-supported cerium oxide nanoparticles. *International Journal Nanomedicine.* 2014. № 9. P. 5515–5531.

15. Kang S. J., Liang H. E., Reizis B., Locksley R. M. Regulation of hierarchical clustering and activation of innate immune cells by dendritic cells. *Immunity.* 2008. № 29(5). P. 819-833.

16. Cronkite D. A., Strutt T.M. The Regulation of Inflammation by Innate and Adaptive Lymphocytes. *J Immunol Res.* 2018. № 11. P. 1467538.

17. Robson M. C. Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surg. Clin. North. Am.* 1997. Vol. 77. P. 637–650.

18. Okin D., Medzhitov R. Evolution of inflammatory diseases. *Curr Biol.* 2012. № 22(17). P. 733-740.

19. Sugimoto M. A., Sousa L. P., Pinho V., Perretti M., Teixeira M.M. Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset? *Front Immunol.* 2016. № 26;7. P. 160.

20. Harding K. G., Morris H. L., Patel G. K. Healing chronic wounds. *BMJ.* 2002. V. 324. P. 160–163.

21. Gailit J., Clark R. A. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol.* 1994. № 6(5). P. 717–725.

22. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002. № 420(6917). P. 846-852.

23. Johnson K. E., Wilgus T. A. Vascular Endothelial Growth Factor and Angiogenesis in the Regulation of Cutaneous Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014. № 3(10). P. 647-661.
24. Nathan C., Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*. 2010. № 140(6). P. 871–882.
25. Knighton D. R., Fiegel V. D., Ciresi K. F., Austin L. L., Butler E. L. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. *Ann. Surg.* 1986. № 204. P. 322–330.
26. Han G., Ceilley R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv Ther.* 2017. № 34(3). P. 599–610.
27. Schilrreff P., Alexiev U. Chronic Inflammation in Non-Healing Skin Wounds and Promising Natural Bioactive Compounds Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022. № 23(9). P. 4928.
28. Fonder M. A., Lazarus G. S., Cowan D. A., Aronson-Cook B., Kohli A. R, Mamelak A. J. Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings. *J Am Acad Dermatol*. 2008. № 58(2). P. 185–206.
29. Ge Y., Wang Q. Current research on fungi in chronic wounds. *Front Mol Biosci*. 2023. № 9. P. 1057766.
30. Zhao R., Liang H., Clarke E., Jackson C., Xue M. Inflammation in Chronic Wounds. *Int J Mol Sci*. 2016. № 17(12). P. 2085.
31. Arto I. The energy requirements of a developed world. *Energy for Sustainable Development*. 2016. № 33. P. 1–13.
32. Cosic I., Cosic D., Lazar K. Environmental Light and Its Relationship with Electromagnetic Resonances of Biomolecular Interactions, as Predicted by the Resonant Recognition Model. *Int J Environ Res Public Health*. 2016. № 13(7). P. 647.
33. Vanhaelewyn L., Van Der Straeten D., De Coninck B., Vandebussche F.. Ultraviolet Radiation From a Plant Perspective: The Plant-Microorganism Context. *Frontiers in plant science*. 2020. № 11. P. 597642.

34. Moreira-Rodriguez M., Nair V., Benavides J., Cisneros-Zevallos L., Jacobo-Velazquez D. A. UVA, UVB light, and methyl jasmonate, alone or combined, redirect the biosynthesis of Glucosinolates, Phenolics, Carotenoids, and chlorophylls in *Broccoli sprouts*. *Intern. J. Mol. Sci.* 2017. № 18. P. 2330.
35. Fassioli F., Olaya-Castro A., Scholes G. D. Coherent energy transfer under incoherent light conditions. *J. Phys. Chem. Lett.* 2012. № 3. P. 3136–3142.
36. Turner D. B., Arpin P. C., McClure S. D., Ulness D. J., Scholes G. D. Coherent multidimensional optical spectra measured using incoherent light. *Nat. Commun.* 2013. № 4. P. 2298.
37. Gilchrest B. A. Sun exposure and vitamin D sufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition.* 2008. V. 88. P. 570S–577S.
38. Haldar C., Ahmad R. Photoimmunomodulation and melatonin. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology.* 2010. Vol. 98 (2). P. 107–117.
39. Shixian C., Xiaoyuan T., Mingyue C. et al. Solvatochromic Near-Infrared Aggregation-Induced Emission-Active Acrylonitriles by Acceptor Modulation for Low-Power Stimulated Emission Depletion Nanoscopy. *Chemistry of Materials.* 2023. № 35(6). P. 2472-2485.
40. Fajuyigbe D., Young A. R. The impact of skin colour on human photobiological responses. *Pigment cell & melanoma research.* 2016. № 29(6). P. 607–618.
41. Santos A. L., Oliveira V., Baptista I. et al. Wavelength dependence of biological damage induced by UV radiation on bacteria. *Arch Microbiol.* 2013. № 195(1). P. 63–74.
42. Calles C., Schneider M., Macaluso F. et al. Infrared A. Radiation influences the skin fibroblast transcriptome: mechanisms and consequences. *J. Invest. Dermatol.* 2010. Vol. 130. P. 1524–1536.
43. Botta C., Di Giorgio C., Sabatier A., De Meo M. Genotoxicity of visible light (400–800 nm) and photoprotection assessment of ectoin, L-



ergothioneine and mannitol and four sunscreens. *Photochemistry and Photobiology B: Biology* 91. 2008. Iss. 1. P. 24–34.

44. Berson D. M., Dunn F. A., Takao M. Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science*. 2002. № 295. P. 1070–1073.

45. Sand A., Schmidt T. M., Kofuji P. Diverse types of ganglion cell photoreceptors in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*. 2012. № 31(4). P. 287–302.

46. Sato S., Sakurai T., Ogasawara J. et al. A circadian clock gene, Rev-erbalpha, modulates the inflammatory function of macrophages through the negative regulation of Ccl2 expression. *Journal of immunology*. 2014. Vol. 192, № 1. P. 407–417.

47. Calles C., Sowa P., Rutkowska-Talipska J. et al. Optical Radiation in Modern Medicine. *Adv. Dermatol. Allergol*. 2013. V. 4. P. 246–251.

48. Garza Z. C. F., Born M., Hilbers P. A. J. et al. Visible Blue Light Therapy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Curr. Med. Chem*. 2019. V. 25. P. 5564–5577.

49. Duteil L., Cardot-Leccia N., Queille-Roussel C. et al. Differences in visible light-induced pigmentation according to wavelengths: a clinical and histological study in comparison with uvb exposure. *Pigment. Cell Melanoma Res*. 2014. V. 27. P. 822–826.

50. Verceles A., Liu X., Terrin M. et al. Ambient light levels and critical care outcomes. *Journal of critical care*. 2013. Vol. 28, №1. P. 110e111–118.

51. Lee J. W., Ratnakumar K., Hung K. F. et al. Deciphering UV-induced DNA Damage Responses to Prevent and Treat Skin Cancer. *Photochem Photobiol*. 2020. № 96(3). P. 478–499.

52. Jason C. S. Yam, Alvin K. H. Kwok. Ultraviolet light and ocular diseases. *Int Ophthalmol*. 2014. № 34. P. 383–400.

53. Bergmanson J. P. Corneal damage in photokeratitis--why is it so painful? *Optometry and vision science: official publication of the American Academy of Optometry*. 1990. № 67(6). P. 407–413.

54. Li Y., Cao Z., Guo J. et al. Assessment of efficacy and safety of UV-based therapy for psoriasis: a network meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Med.* 2022. № 54(1). P. 159–169.
55. Yuan D., Huang H. et al. Blue light reduces organ injury from ischemia and reperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Concepts of Biology.* 2021. Vol. 10, №8. P. 16–19.
56. Karandashov V. I. Biological effects of blue light irradiation and perspectives of its application in practical medicine. *Photobiol. Exp. Photomed.* 2013. Vol. 1, no. 2. P. 98–106.
57. Єфіменко Н., Люта М., Кармаш О., Гіжецька О., Коробов А., Сибірна Н. Вплив низькоінтенсивного світлового випромінювання синього кольору на фізико-хімічні властивості еритроцитів крові щурів за умов цукрового діабету. *Цитологія і генетика.* 2020. Т. 54, № 5. С. 89–96.
58. Kocher J., Arwood L., Roberts R. et al. Visible blue light inactivates SARS-CoV-2 variants and inhibits Delta replication in differentiated human airway pithelia. *BioRxiv: the preprint server for biology.* Jan 31. 2022.
59. Leite D. P., Paolillo F. R., Parmesano T. N., Fontana C. R., Bagnato V. S. Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral disinfection: a randomized controlled trial. *Photomed Laser Surg.* 2014. № 32(11). P. 627–632.
60. Makdoui K., Hedin M., Bäckman A. Different photodynamic effects of blue light with and without riboflavin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and human keratinocytes in vitro. *Lasers Med Sci.* 2019. № 34(9). P. 1799–1805. doi: 10.1007/s10103-019-02774-9.
61. Lewis A. J., Zhang X., Griepentrog J. E. et al. Blue Light Enhances Bacterial Clearance and Reduces Organ Injury During Sepsis. *Crit Care Med.* 2018. № 46(8). P. e779–e787.
62. Leanse L., Anjos C., Mushtaq S., Dai T. Antimicrobial blue light: A ‘Magic Bullet’ for the 21st century and beyond? *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2022. Vol. 180. P. 114057.

63. Enwemeka C. Antimicrobial blue light: an emerging alternative to antibiotics. *Photomed Laser Surg.* 2013. Vol. 31. P. 509–511.
64. Wang Y., Wu X., Chen J. et al. Antimicrobial Blue Light Inactivation of Gram-Negative Pathogens in Biofilms: In Vitro and In Vivo Studies. *J Infect Dis.* 2016. Vol. 213. P. 1380–1387.
65. Bumah V. V., Masson–Meyers D. S., Cashin S. E., Enwemeka C. S. Wavelength and bacterial density influence the bactericidal effect of blue light on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Photomed. Laser Surg.* 2013. № 31. P. 547–553.
66. Pileggi G., Wataha J.C., Girard M. et al. Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2013. № 10. P. 134–140.
67. KazemiKhoo N., Ansari F. Blue or red: which intravascular laser light has more effects in diabetic patients? *Lasers Medical Sci.* 2014. Vol. 30, no. 1. <https://doi.org/10.1007/s10103-014-1672-7>.
68. Kundu B., Han G., Sun Y. Derivatized Benzothiazoles as Two-Photon-Absorbing Organic Photosensitizers Active under Near Infrared Light Irradiation. *J. Am. Chem. Soc.* 2023. Vol. 145, No. 6. P. 3535–3542.
69. Дубовик О. С., Наумова О. В., Коробов А. М. та ін. Вплив світлодіодного випромінювання та протимікробних засобів на морфологічний стан тканин при локалізованому гнійно-запальному процесі. *Вісник проблем біології і медицини.* 2014. № 1. P. 246–250.
70. Ronqui M. R., de Aguiar Coletti T. M., de Freitas L. M. et al. Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. *J Photochem Photobiol B.* 2016. № 158. P. 122–129.
71. Nesi-Reis V., Lera-Nonose D.S., Oyama J. et al. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2018. V. 21. P. 294–305.

72. Buscone S., Mardaryev A. N., Westgate G. E., et al. Cryptochrome 1 Is Modulated by Blue Light in Human Keratinocytes and Exerts Positive Impact on Human Hair Growth. *Exp. Dermatol.* 2021. V. 30. P. 271–277.
73. Vladimirov Y. A., Gorbatenkova E. A., Paramonov N. V., Azizova O. A. Photoreactivation of superoxide dismutase by intensive red (laser) light. *Free radical biology & medicine.* 1988. № 5(5-6). P. 281–286.
74. Ankri R., Lubart R., Taitelbaum H. Estimation of the optimal wavelengths for laser-induced wound healing”. *Lasers in Surgery and Medicine.* 2010. V. 42, no. 8. P. 760–764.
75. Catão M. H., Costa R. O., Nonaka C. F., Junior R. L., Costa I. R.. Green L.E.D. light has anti-inflammatory effects on burns in rats. *Burns.* 2016. № 42(2). P. 392–396.
76. Karmash O. I., Liuta M. Ya., Korobov A. M., Sybirna N. O. Effect of Photomodulation Therapy on Development of Oxidative Stress in Blood Leukocytes of Rats with Streptozocin-Induced Diabetes Mellitus. *Cytol Genet.* 2020. V. 54, N. 5. P. 456–464.
77. Opländer C., Deck A., Volkmar C.M. et al. Mechanism and biological relevance of blue-light (420–453 nm)-induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivatives in human skin in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 65. P. 1363–1377.
78. Freitas L. F., Hamblin M. R. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light. Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron.* 2016. V. 22(3).
79. Allison R. R., Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin. Endosc.* 2013. Vol. 46. P. 24–29.
80. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., et al. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998. Vol. 90. P. 889–905.
81. Mang T. S. Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2004. No 1. P. 43–48.

82. Teng M., Tong J., Xie Y. et al. Re-recognizing fluorescence quenching Units: Improve abnormally the luminescent efficiency of AIEgens for fluorescence Sensing, organelle targeted imaging and photodynamic therapy. *Chemical Engineering Journal*. 2023. № 460. P. 141792.
83. Sibata C. H., Colussi V. C., Oleinick N. L., Kinsella T. J. Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin. Pharmacother.* 2001. Vol. 2. P. 917–927.
84. Zhu J., Thompson C. B. Metabolic regulation of cell growth and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019. № 20(7). P. 436-450.
85. Коробов А. М., Коробов В. А., Лісна Т. О. Фототерапевтичні апарати Коробова А. – Коробова В. серії «Барва» : Харків, 2015. 176 с.
86. Сімонова-Пушкар Л. І., Білогурова Л. В., Гертман В. З. Вплив локальної фотоманітної терапії на деякі показники периферичної крові у щурів з місцевими променевими ушкодженнями шкіри. *Застосування лазерів в медицині та біології* : Матеріали XXXIX Міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 22-24 травня 2013 р. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2013. С. 130–132.
87. Коробов А. М., Шульга С. М., Білошенко К. С. та ін. Про можливість застосування випромінювання зеленого діапазону спектра для профілактики синдрому діабетичної стопи. *Застосування лазерів у медицині та біології* : Матеріали 50-ої Міжнар. наук.-практ. конф. Харків. 2014. С. 200–201.
88. Brancalion L., Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.* 2002. Vol. 17. P. 173–186.
89. Niu N., Ying Y., Zhijun Z. et al. A cell membrane-targeting AIE photosensitizer as a necroptosis inducer for boosting cancer theranostics. *Chemical Science*. 2022. Vol. 13, № 20. P. 5929-5937.
90. Dos Santos A. F., Inague A., Arini G. S. et al. Distinct photo-oxidation-induced cell death pathways lead to selective killing of human breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 2020. № 11. P. 1070.

91. Abrahamse H., Hamblin M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem J.* 2016. № 473(4). P. 347–364.
92. Ya-Fang X., Wen-Cheng C., Jia-Xiong C. et al. Amplifying Free Radical Generation of AIE Photosensitizer with Small Singlet–Triplet Splitting for Hypoxia-Overcoming Photodynamic Therapy. *ACS Applied Materials & Interfaces.* 2022. Vol. 14, № 4. P. 5112–5121.
93. Miyata Y., Mukae Y., Harada J. et al. Pathological and Pharmacological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in Malignant. *Molecules.* 2020. № 25. P. 5252.
94. Pinto G. P., Lopes K. A. R., Salles N. G. et al. N-acetyl Glucosamine Distribution and Mitochondrial Activity of Tumor Cell Exposed to Photodynamic Therapy. *J Fluoresc.* 2016. № 26. P. 1923–1926.
95. Kim J., Santos O. A., Park J. H. Selective photosensitizer delivery into plasma membrane for effective photodynamic therapy. *J Control Release.* 2014. № 191. P. 98–104.
96. Rezende L. G., Tasso T. T., Candido P. S. et al. Assessing Photosensitized Membrane Damage: Available Tools and Comprehensive Mechanisms. *Photochemistry & Photobiology.* 2021. № 98. P. 572–590.
97. Miyoshi Y., Kadono M., Okazaki S. et al. Endosomal Escape of Peptide-Photosensitizer Conjugates Is Affected by Amino Acid Sequences near the Photosensitizer. *Bioconjug Chem.* 2020. № 31(3). P. 916–922.
98. Wang J., Yao Y., Chen X. et al. Host derived exosomes-pathogens interactions: potential functions of exosomes in pathogen infection. *Biomed. Pharmacother.* 2018. № 108. P. 1451–1459.
99. Keshtkar S., Azarpira N., Ghahremani M. H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy.* 2018. Vol. 9, no. 1. P. 63.
100. Larabi A., Barnich N., Nguyen H. T. T. Emerging role of exosomes in diagnosis and treatment of infectious and inflammatory bowel diseases. *Cells.* 2020. № 9. P. 1111.

101. Yuana Y., Sturk A., Nieuwland R. Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Rev.* 2013. № 27. P. 31–39.
102. Zhao A. G., Shah K., Cromer B., Sumer H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles and their therapeutic potential. *Stem Cells Int.* 2020. P. 8825771.
103. Abreu S. C., Weiss D. J., Rocco P. R. Extracellular vesicles derived from mesenchymal stromal cells: a therapeutic option in respiratory diseases? *Stem Cell Res. Ther.* 2016. № 7. P. 1–10.
104. Zhang Y., Liu Y., Liu H., Tang W. H. Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell Biosci.* 2019. № 9. P. 1–18.
105. Salimi L., Akbari A., Jabbari N. et al. Synergies in exosomes and autophagy pathways for cellular homeostasis and metastasis of tumor cells. *Cell Biosci.* 2020. № 10. P. 1–18.
106. Shi Y., Du L., Lv D. Emerging role and therapeutic application of exosome in hepatitis virus infection and associated diseases. *J. Gastroenterol.* 2021. № 56. P. 336–349.
107. Nikfarjam S., Rezaie J., Kashanchi F., Jafari R. Dexosomes as a cell-free vaccine for cancer immunotherapy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2020. № 39. P. 1–20.
108. Doyle L. M., Wang M. Z. Overview of extracellular vesicles, their origin, composition, purpose, and methods for exosome isolation and analysis. *Cells.* 2019. № 8. P. 727.
109. Hassanzadeh A., Rahman H. S., Markov A. et al. Mesenchymal stem/stromal cell-derived exosomes in regenerative medicine and cancer; overview of development, challenges, and opportunities. *Stem Cell Res. Ther.* 2021. № 12. P. 1–22.
110. Zhu Y., Feng X., Abbott J. et al. Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice. *Stem cells.* 2014. № 32. P. 116–125.

111. Monsel A., Zhu Y-g, Gennai S. et al. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cell–derived microvesicles in severe pneumonia in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015. № 192. P. 324–336.
112. Park J., Kim S., Lim H. et al. Therapeutic effects of human mesenchymal stem cell microvesicles in an ex vivo perfused human lung injured with severe E. coli pneumonia. *Thorax.* 2019. № 74. P. 43–50.
113. Hao Q., Gudapati V., Monsel A. et al. Mesenchymal stem cell–derived extracellular vesicles decrease lung injury in mice. *J. Immunol.* 2019. № 203. P. 1961–1972. 10.4049/jimmunol.1801534
114. Song Y., Dou H., Li X., et al. Exosomal miR-146a contributes to the enhanced therapeutic efficacy of interleukin-1 $\beta$ –primed mesenchymal stem cells against sepsis. *Stem Cells.* 2017. № 35. P. 1208–1221. 10.1002/stem.2564
115. Cheng Y., Cao X., Qin L. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: a novel cell-free therapy for sepsis. *Front. Immunol.* 2020. № 11. P. 647.
116. Yang X., Shi G., Guo J., Wang C., He Y. Exosome-encapsulated antibiotic against intracellular infections of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Nanomed.* 2018. № 13. P. 8095. 10.2147/IJN.S179380
117. Longatti A. The dual role of exosomes in hepatitis A and C virus transmission and viral immune activation. *Viruses.* 2015. № 7. P. 6707–6715.
118. Qian X., Xu C., Fang S. et al. Exosomal microRNAs derived from umbilical mesenchymal stem cells inhibit hepatitis C virus infection. *Stem Cells Transl. Med.* 2016. № 5. P. 1190–1203. 10.5966/sctm.2015-0348
119. Zhou Y., Wang X., Sun L. et al. Toll-like receptor 3-activated macrophages confer anti-HCV activity to hepatocytes through exosomes. *FASEB J.* 2016. № 30. P. 4132–4140.
120. Kouwaki T., Fukushima Y., Daito T. Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responses to hepatitis B virus infection. *Front. Immunol.* 2016. № 7. P. 335.



121. Sims B., Gu L., Krendelchtchikov A., Matthews Q. L. Neural stem cell-derived exosomes mediate viral entry. *Int. J. Nanomed.* 2014. № 9. P. 4893.
122. Popowski K. D., Dinh P. U. C., George A., Lutz H., Cheng K. Exosome therapeutics for COVID-19 and respiratory viruses. *View (Beijing, China)*. 2021. № 2(3). P. 20200186.
123. Sengupta V., Sengupta S., Lazo A. et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells as treatment for severe COVID-19. *Stem Cells Dev.* 2020. № 29. P. 747–754.
124. Liang L., Wang L., Zhou S. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells repair injured endometrial epithelial cells. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2020. № 37. P. 395–403.
125. Moloudizargari M., Govahi A., Fallah M. et al. The mechanisms of cellular crosstalk between mesenchymal stem cells and natural killer cells: therapeutic implications. *J. Cell. Physiol.* 2021. № 236. P. 2413–2429.
126. Inal J. M. Decoy ACE2-expressing extracellular vesicles that competitively bind SARS-CoV-2 as a possible COVID-19 therapy. *Clin. Sci.* 2020. № 134. P. 1301–1304.
127. Jayaramayya K., Mahalaxmi I., Subramaniam M. D. et al. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells and mesenchymal stem-cell-derived exosomes for COVID-19 treatment. *BMB Rep.* 2020. № 53. P. 400.
128. Maqsood M., Kang M., Wu X. et al. Adult mesenchymal stem cells and their exosomes: sources, characteristics, and application in regenerative medicine. *Life Sci.* 2020. № 256. P. 118002.
129. Cruz F. F., Borg Z. D., Goodwin M. et al. Systemic administration of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell extracellular vesicles ameliorates aspergillus hyphal extract-induced allergic airway inflammation in immunocompetent mice. *Stem Cells Transl. Med.* 2015. № 4. P. 1302–1316.
130. Malekpour K., Hazrati A., Zahar M. et al. The potential use of mesenchymal stem cells and their derived exosomes for orthopedic diseases treatment. *Stem Cell Rev. Rep.* 2021. P. 1–19.

131. Zhang L., Ju Y., Chen S., Ren L. Recent Progress on Exosomes in RNA Virus Infection. *Viruses*. 2021. № 13. P. 256.
132. Melzer C., Rehn V., Yang Y. et al. Taxol-loaded MSC-derived exosomes provide a therapeutic vehicle to target metastatic breast cancer and other carcinoma cells. *Cancers (Basel)*. 2019. № 11. P. 798.
133. Huang Y.-C., Lai L.-C. The potential roles of stem cell-derived extracellular vesicles as a therapeutic tool. *Ann. Transl. Med.* 2019. № 7. P. 693.
134. Brakhage A. A., Zimmermann A.-K., Riviuccio F. et al. Host-derived extracellular vesicles for antimicrobial defense. *MicroLife*. 2021. P. 2:uqab003.
135. Abbas F., Jan T., Iqbal J., Haider M. S. Fe doping induced enhancement in room temperature ferromagnetism and selective cytotoxicity of CeO<sub>2</sub> nanoparticles. *Current Applied Physics*. 2015. № 15(11). P. 1428–1434.
136. Babu K. S., Anandkumar M., Tsai T. Y. et al. Cytotoxicity and antibacterial activity of gold-supported cerium oxide nanoparticles. *International Journal Nanomedicine*. 2014. № 9. P. 5515–5531.
137. Park E. J., Choi J., Park Y. K., Park K. Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*. 2008. № 245(1-2). P. 90–100.
138. Eom H. J., Choi J. p38 MAPK activation, DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis as mechanisms of toxicity of silver nanoparticles in Jurkat T cells. *Environmental science & technology*. 2010. № 44(21). P. 8337–8342.
139. Hirst S., Karakoti A., Tyler R. et al. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles. *Small*. 2009. №. 5(24). P. 2848–2856.
140. Nelson B. C., Johnson M. E., Walker M. L. et al. Antioxidant Cerium Oxide Nanoparticles in Biology and Medicine. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2016. № 5(2). P. 15.
141. Arya A., Sethy N. K., Das M. et al. Cerium oxide nanoparticles prevent apoptosis in primary cortical culture by stabilizing mitochondrial membrane potential. *Free radical research*. 2014. № 48(7). P. 784–793.

142. Guan Y., Li M., Dong K. et al. Ceria/POMs hybrid nanoparticles as a mimicking metallopeptidase for treatment of neurotoxicity of amyloid- $\beta$  peptide. *Biomaterials*. 2016. № 98. P. 92–102.
143. Arya A., Sethy N. K., Singh S. K. et al. Cerium oxide nanoparticles protect rodent lungs from hypobaric hypoxia-induced oxidative stress and inflammation. *International journal of nanomedicine*. 2013. № 8. P. 4507–4520.
144. Celardo I., Pedersen J. Z., Traversa E., Ghibelli L. Pharmacological potential of cerium oxide nanoparticles. *Nanoscale*. 2011. № 3(4). P. 1411–1420.
145. Pagliari F., Mandoli C., Forte G. et al. Cerium oxide nanoparticles protect cardiac progenitor cells from oxidative stress. *ACS nano*. 2012. № 6(5). P. 3767–3775.
146. Karakoti A. S., Singh S., Kumar A. et al. Pegylated nanoceria as radical scavenger with tunable redox chemistry. *J. Am. Chem. Soc.* 2009. № 131. P. 14144–14145.
147. Xue Y., Luan Q., Yang D., Yao X., Zhou K. Direct evidence for hydroxyl radical scavenging activity of cerium oxide nanoparticles. *J. Phys. Chem. C*. 2011. № 115. P. 4433–4438.
148. Dowding J. M., Seal S., Self W. T. Cerium oxide nanoparticles accelerate the decay of peroxynitrite (ONOO(-)). *Drug delivery and translational research*. 2013. № 3(4). P. 375–379.
149. Qi L., Fresnais J., Muller P. et al. Interfacial activity of phosphonated-peg functionalized cerium oxide nanoparticles. *Langmuir*. 2012. № 28. P. 11448–11456.
150. Walkey C., Das S., Seal S. et al. Catalytic Properties and Biomedical Applications of Cerium Oxide Nanoparticles. *Environmental science. Nano*. 2015. № 2(1). P. 33–53.
151. Estevez A. Y., Erlichman J. C. The potential of cerium oxide nanoparticles (nanoceria) for neurodegenerative disease therapy. *Nanomedicine*. 2014. № 9. P. 1437–1440. doi:10.2217/nnm.14.87

152. Kong L., Cai X., Zhou X. et al. Nanoceria extend photoreceptor cell lifespan in tubby mice by modulation of apoptosis/survival signaling pathways. *Neurobiology of disease*. 2011. № 42(3). P. 514–523.
153. Cisterna B. A., Kamaly N., Choi W. I. et al. Targeted nanoparticles for colorectal cancer. *Nanomedicine (London, England)*. 2016. № 11(18). P. 2443–2456.
154. Yong J. M., Fu L., Tang F. et al. ROS-Mediated Anti-Angiogenic Activity of Cerium Oxide Nanoparticles in Melanoma Cells. *ACS biomaterials science & engineering*. 2022. № 8(2). P. 512–525.
155. Noll A. J. Cerium oxide nanoparticles for the detection of antimicrobial resistance. *HIM*. 2011. № 1990-2015. P. 1171.
156. Yefimova S., Klochkov V., Kavok N. et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity study of cerium oxide nanoparticles with two different sizes. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. 2023. № 111(4). P. 872–880.
157. Council Directive on the approximation of laws, regulation and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Official Journal*. 1986. N 358. P. 0001–0028.
158. Shablii V., Kuchma M., Svitina H. et al. High Proliferative Placenta-Derived Multipotent Cells Express Cytokeratin 7 at Low Level. *BioMed Research International*. 2019. Article ID 2098749. P. 1–13. URL: <https://doi.org/10.1155/2019/2098749>
159. Muniz-Junqueira M. I, Peçanha L. M, Silva-Filho V. L, Cardoso M. C. A., Tosta C.E. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. *Clinical and Vaccine Immunology*. 2003. № 10. P. 1096–1102.
160. Segal A. W., Levi A. J. The mechanism of the NBT (nitroblue tetrazolium) test. *Clin Sci*. 1973. № 44(6). 26 p.

161. Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand J Clin Lab Investig.* 1968. № 21(97). P. 1-9.
162. Terasaki P. I., Melelland J. D. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature.* 1964. P. 204-205.
163. Riha I., Haskova V., Kaslik J., Maierova M., Stransky J. The use of polyethylene glycol for immune complex detection in human sera. *Mol Immunol.* 1979. № 16. P. 489–493.
164. Ocklind G. Stimulation of human lymphocytes by phytohemagglutinin (PHA) in a new ultra-microtest plate. *Immunobiology.* 1986. № 171(4-5). P. 339–344.
165. Спосіб біосенсорної індикації цитотоксичних факторів біологічної і хімічної природи : пат. 08958 Україна; заявл. 28.08.2009; опубл. 10.03.2010, Бюл. №5. 6 с
166. Grossweiner L. I., Fernandez J. M., Bilgin M. D. Photosensitisation of red blood cell haemolysis by photodynamic agents. *Lasers Med. Sci.* 1998. Vol. 13. P. 42–54.
167. Nozomi A., Kaname O. Chapter One - Revisiting immune complexes: Key to understanding immune-related diseases. *Advances in Clinical Chemistry.* 2020. Vol. 96. P. 1–17.
168. Askenase M. H., Sansing L. H. Stages of the inflammatory response in pathology and tissue repair after intracerebral hemorrhage. *Semin Neurol.* 2016. Vol. 36(3). P. 288–297.
169. Bozhkov A., Padalko V., Dlubovskaya V. et al. Resistance to heavy metal toxicity in organisms under chronic exposure. *Indian J. of Experimental Biology.* 2010. V. 48(7). P. 679–696.
170. Hexin L., Xianggan C., Fazli W. et al. Analysis of the Physiological and Molecular Responses of *Dunaliella salina* to Macronutrient Deprivation. *PLoS One.* 2016. № 11(3). P. e0152226. doi: 10.1371/journal.pone.0152226

171. Shi K., Cui L., Jiang H. et al. Characterization of the microtubule-binding activity of kinesin-like calmodulin binding protein from *Dunaliella salina*. *Research in Microbiology*. 2013. № 164(10). P. 1028–1034.
172. Schroer T. A. Structure, function and regulation of cytoplasmic dynein. *Current Opinion in Cell Biology*. 1994. № 6. P. 69.
173. Fontes J. A., Barin J. G., Talor M. V. et al. Complete Freund's adjuvant induces experimental autoimmune myocarditis by enhancing IL- 6 production during initiation of the immune response. *Immunity, Inflammation, Disease*. 2017. № 5(2). P. 163–176.
174. Tomlenovich L., Show C. Aluminum adjuvants in vaccines. *Current Medicinal Chemistry*. 2011. № 18. P. 2630–2637.
175. Клімова О. М., Коробов А. М., Биченко К. О., Лавінська О. В., Кордон Т. І., Дроздова Л. А. Вплив низько інтенсивного випромінювання оптичного діапазону спектру на показники імунорезистентності у тварин з експериментальним перитонітом. *Вісник КНУ ім. Т. Шевченко. Серія «Біологія»*. 2020. № 3(82). С. 35–42.
176. Клімова О. М., Биченко К. О., Коробов А. М., Кордон Т. І., Лобинцева Г. С. Вплив фото опромінювання різними довжинами хвиль на етапи запалення та стимуляція проліферації екзосомами стовбурових клітин у експерименті. *Клінічна інформатика та телемедицина*. 2021. № 17. С. 100–117.
177. Klimova E. M., Bozhkov A. I., Bychenko E. A., Lavinskaya E. V., Zholobak N. M., Korobov A. M. Characteristics of the response of the microalga (*Dunaliella viridis*) for corium compounds in culture. *Biosystems Diversity*. 2019. Vol. 27(2). P. 142–147.
178. Клімова О. М., Биченко К. О. Дослідження на різних моделях біологічних ефектів компонентів комплексного впливу (фотоопромінювання; екзосоми мезенхімальних стовбурових клітин та наночастинки) для корекції запального процесу. *Вісник ОНУ ім. І. І. Мечникова. Серія «Біологія»*. 2023. Т. 28, № 1(52). С. 118–135.

179. Klimova E., Korobov A., Bozhkov A., Lesnaya T., Lavinskaya E., Bichenko E., Agarkova A. Nonspecific resistance factors and humoral immunity indicators animals blood with experimental peritonitis after visible light irradiation  $\lambda=595$ . *Photodiagnosis and photodynamic therapy. Application of lasers in medicine and biology*, Helsinki, Finland, 24-29 August 2012. № 9(1). S27.

180. Клімова О. М., Биченко К. О. Вплив низько інтенсивного світлового впливу на процеси запальної реакції та регенерації у експериментальних тварин. *Modern Science, Practice : Abstracts XVIII International Scientific and Practical Conference*, Boston, USA, 2-6 May 2020. P. 307–309.

181. Клімова О., Биченко К., Лавінська О., Жолобак Н., Ільїна А., Коробов А. Реакція біоіндикатора *Dunaliella viridis* на вплив наночастинок і солей діоксида церію. *Застосування лазерів у медицині та біології : матеріали XLVIII міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 24-25 травня 2018*. С. 140–143.

182. Клімова О., Биченко К. Вивчення механізмів впливу низько інтенсивного світлового впливу (зелений ( $\lambda =530$  нм, синій ( $\lambda=440$  нм) на перебіг запальної реакції та імунорезистентність у експериментальних тварин з індукованим перитонітом. *Perspective directions for the development of science and practice : Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference*, Athens, Greece, 08-09 June 2020. С. 180–183.

183. Клімова О., Лавінська О., Биченко К. Визначення ступеню цитотоксичності наночастинок діоксида церію за допомогою клітинної тест-системи. *World Science Problems, Prospects and innovation : Materials V International scientific and practical conference*, Toronto, 27-29 January 2021. С. 700–704.

184. Клімова О. М., Лавінська О. В., Биченко К. О., Жолобак Н. М. Оцінка цитотоксичних ефектів наночастинок діоксида церію на клітинній тест-системі. *Нанотехнології і наноматеріали у фармації та медицині :*

матеріали V Всеукр. наук.-практ. інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 23 квітня 2021. С. 38.

185. Клімова О. М., Биченко К. О., Лавінська О. В., Мережко О. С., Лобинцева Г. С. Застосування фізичних та біотехнологічних методів для лікування хронічних трофічних ран у пацієнтів з вираженою антибіотикорезистентністю. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології* : матеріали міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 25 березня 2021. С. 186–187.

186. Lam G. Y., Huang J., Brumell J. H. The many roles of NOX2 NADPH oxidase-derived ROS in immunity. *Seminars in Immunopathology*. 2010. № 32(4). P. 415–430.

187. Ge J., Lan M., Zhou B. et al. A grapheme quantum dot photodynamic therapy agent with high singlet oxygen generation. *Nat. Commun.* 2014. N 5. P. 4596.

188. Клімова О. М., Коробов А. М., Іванова Ю. В., Лавінська О. В., Биченко К. О. Зміна імунореактивності у пацієнтів з гнійно-септичними ранами нижніх кінцівок на тлі цукрового діабету другого типу після світлової дії. *Фотобіологія та фотомедицина*. 2017. № 1,2. С. 64–72.

189. Тимченко М. Є., Клімова О. М., Коробов А. М., Іванова Ю. В., Биченко К. О. Експериментальне обґрунтування використання електромагнітного випромінювання світлового діапазону та тканинних факторів росту у лікуванні неспроможності кишечних анастомозів. *Photobiol Photomed.* 2019. № 26. С 73–80.

190. Клімова О. М., Коробов А. М., Бойко В. В., Іванова Ю. В., Лавінська О. В., Биченко К. О., Понамарьов Г. В. Імунокоригуючий ефект фото динамічної терапії у пацієнтів з гнійно-септичними ускладненнями. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLIV міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 26-28 травня 2016. С. 146–148.

191. Клімова О. М., Коробов А. М., Лавінська О. В., Іванова Ю. В., Биченко К. О. Вплив світлової дії та тромбоцитарного фактору росту на



зміни функціонального стану імунокомпетентних клітин та показників гуморального імунітету. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVI міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 25-27 травня 2017. С. 95–96.

192. Клімова О. М., Коробов А. М., Лавінська О. В., Дроздова Л. А., Іванова Ю. В., Биченко К. О. Активація регенеративних процесів та нормалізація імунорезистентності у хворих з трофічними виразками після сумісного впливу світла та тромбоцитарного фактору росту. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVII міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 12-14 жовтня 2017. С. 41–42.

193. Іванова Ю., Мушенко Є., Клімова О., Коробов А., Кірієнко Д., Биченко К., Криворучко І. Лікування ран з використанням фото динамічної терапії та сучасних ранових покриттів. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVII міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 12-14 жовтня 2017. С. 48–49. (*Особистий внесок здобувача: проведення досліджень, обробка результатів*).

194. Клімова О. М., Іванова Ю. В., Коробов А. М., Лавінська О. В., Биченко К. О. Комплексне лікування гнійних ран кінцівок у хворих з цукровим діабетом з використанням світлового впливу, гемо поетичних стовбурових клітин та тромбоцитарного фактору росту. *Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю., м. Київ, 9-10 листопада 2017. С. 154–156.

195. Клімова О. М., Лавінська О. В., Биченко К. О., Коробов А. М., Іванова Ю. В. Фотодинамічна терапія активує кисеньзалежний фагоцитоз у хворих з трофічними виразками. *Application of lasers in medicine and biology and 2<sup>nd</sup> Gamaleia's readings* : Materials XLIX international scientific and practical conference, Hajduszoboszlo, Hungary, 3-7 October 2018. P. 103–106.

196. Klimova E. M., Korobov A. M., Bychenko E. A., Drozdova L. A., Lavinskaya E. V., Kordon T. I., Ivanova Yu. V. Mechanisms of immunocorrective action of complex treatment using photodynamic, cell and tissue therapy in

patients with purulent wounds of the lower extremities. *IEEE 8<sup>th</sup> International Conference on Advanced Optoelectronic and lasers, CAOL 2019*. Conference Proceedings. Sozopol, Bulgaria, 06-08 September 2019. P. 107–112. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, участь в написанні статті).

197. Klimova O., Lavinska O., Bychenko E. Phagocytes barrier functions and complement system proteins in patients with lower limbs trophic ulcers before and after combined exposure. *Scientific achievements of modern society : Materials XII International scientific and practical conference, Liverpool, United Kingdom, 22-24 July 2020*. P. 17–22.

198. Бойко В. В., Іванова Ю. В., Клімова О. М., Коробов А. М., Мушенко Є. В., Кірієнко Д. А., Лавінська О. В., Биченко К. О. Лікування ран у хворих з критичною ішемією нижніх кінцівок на тлі цукрового діабету. *Харківська хірургічна школа*. 2018. № 1(88). С. 41–46.

199. Клімова О. М., Іванова Ю. В., Биченко К. О., Мережко О. С., Прасол В. О., Лобинцева Г. С. Механізми імунокоригуючої дії фотодинамічної терапії та екзосом мезенхімальних стовбурових клітин у хворих з хронічними ранами нижніх кінцівок різного генезу. *Харківська хірургічна школа*. 2021. № 4. С. 20–27.

200. Raghuram A. C., Yu R. P., Lo A. Y., Sung C. J. et al. Role of stem cell therapies in treating chronic wounds: A systematic review. *World J Stem Cells*. 2020. Vol. 26, no.12. P. 659–675.

201. Lande'n N. X., Li D., Stahle M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell. Mol. Life Sci*. 2016. Vol. 73. P. 3861–3885.

202. Fuchs T. A., Brill A., Wagner D. D. Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2012. Vol. 32, no. 8. P. 1777–1783.

203. Motwani M. P., Newson J., Kwong S. et al. Prolonged immune alteration following resolution of acute inflammation in humans. *PLoS One*. 2017. Vol. 12, no. 10. P. 264–328.
204. Enoch S., Price P. E. Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide Wounds*. 2004. 17 p.
205. Chen A. C., Arany P. R., Huang Y. et al. Low-Level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS ONE*. 2011. Vol. 6, no. 7. P. 256–261.
206. Yoshino F., Yoshida A. Effects of blue-light irradiation during dental treatment Japan. *Dental Sci. Rev*. 2018. Vol. 54. P. 160–161.
207. Сибірна Н. О., Люта М. Я., Климишин Н. І. Молекулярні механізми депонування оксиду азоту в еритроцитах. *Biol. Stud*. 2010. Vol. 4, no. 1. P. 143–160.
208. Li J. Yu., Zhang K., Xu D. et al. Mitochondrial Fission Is Required for Blue Light-Induced. Apoptosis and Mitophagy in Retinal Neuronal, R28 Cells. *Front. Mol. Neurosci*. 2018. Vol. 27. P. 432–446.
209. Marques M. M., Pereira A. N., Fujihara N. A. et al. Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2004. Vol. 34, no. 3. P. 260–265.
210. Serrage H., Heiskanen V., Palin W. M. et al. Under the Spotlight: Mechanisms of Photobiomodulation Concentrating on Blue and Green Light. *Photochem. Photobiol. Sci*. 2019. Vol. 18. P. 1877–1909.
211. Спосіб лікування цукрового діабету I та II типів за допомогою клітинних трансплантатів різного походження : пат. 37684 Україна. Бойко В. В., Клімова О. М., Вотякова І. А., Іванов В. М., Дроздова Л. А. Опубл. 10.12.2008, Бюл. № 23. 6 с.
212. Іванова Ю. В., Клімова О. М., Коробов А. М. та ін. Мультидисциплінарний підхід до лікування ішемічної форми стопи діабетика. *Сучасні медичні технології*. 2019. №2(41), Ч. 2. С. 53–59.

213. Kim H. J., Choi M. S., Bae I. H. et al. Short wavelength visible light suppresses innate immunity-related responses by modulating protein S-nitrosylation in keratinocytes. *J. Investig. Dermatol.* 2016. Vol. 136. P. 727–731.
214. Fischer M. R., Abel M., Kostka S. L. et al. Blue Light irradiation suppresses dendritic cells activation in vitro. *Exp. Dermatol.* 2013. Vol. 22. P. 558–560.
215. Sharifi S., Behzadi S., Laurent S. et al. Toxicity of nanomaterials. *Chemical Society Reviews.* 2012. № 41(6). P. 2323–2343.

**ДОДАТОК А**  
**СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

*Публікації у виданнях, включених до переліку фахових видань України з присвоєнням категорії «А» та проіндексованих у базі даних Scopus:*

1. Klimova E. M., Bozhkov A. I., Bychenko E. A., Lavinskaya E. V., Zholobak N. M., Korobov A. M. Characteristics of the response of the microalga (*Dunaliella viridis*) for corium compounds in culture. *Biosystems Diversity*. 2019. Vol. 27(2). P. 142–147. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті*).

*Публікації у виданнях, включених до переліку фахових видань України з присвоєнням категорії «Б»:*

2. Клімова О. М., Коробов А. М., Биченко К. О., Лавінська О. В., Кордон Т. І., Дроздова Л. А. Вплив низько інтенсивного випромінювання оптичного діапазону спектру на показники імунорезистентності у тварин з експериментальним перитонітом. *Вісник КНУ ім. Т. Шевченко. Серія «Біологія»*. 2020. № 3(82). С. 35–42. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті*).

3. Клімова О. М., Биченко К. О. Дослідження на різних моделях біологічних ефектів компонентів комплексного впливу (фотоопромінювання; екзосоми мезенхімальних стовбурових клітин та наночастинки) для корекції запального процесу. *Вісник ОНУ ім. І. І. Мечникова. Серія «Біологія»*. 2023. Т. 28, № 1(52). С. 118–135. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, написання статті, підготовка статті до друку*).

***Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:***

4. Klimova E., Korobov A., Bozhkov A., Lesnaya T., Lavinskaya E., Bichenko E., Agarkova A. Nonspecific resistance factors and humoral immunity indicators animals blood with experimental peritonitis after visible light irradiation  $\lambda=595$ . *Photodiagnosis and photodynamic therapy. Application of lasers in medicine and biology*, Helsinki, Finland, 24-29 August 2012. № 9(1). S27. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів).

5. Клімова О. М., Коробов А. М., Бойко В. В., Іванова Ю. В., Лавінська О. В., Биченко К. О., Понамарьов Г. В. Імунокоригуючий ефект фото динамічної терапії у пацієнтів з гнійно-септичними ускладненнями. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLIV міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 26-28 травня 2016. С. 146–148. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, підготовка доповіді).

6. Клімова О. М., Коробов А. М., Лавінська О. В., Іванова Ю. В., Биченко К. О. Вплив світлової дії та тромбоцитарного фактору росту на зміни функціонального стану імунокомпетентних клітин та показників гуморального імунітету. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVI міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 25-27 травня 2017. С. 95–96. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, підготовка матеріалів до друку, підготовка доповіді).

7. Клімова О. М., Коробов А. М., Лавінська О. В., Дроздова Л. А., Іванова Ю. В., Биченко К. О. Активація регенеративних процесів та нормалізація імунорезистентності у хворих з трофічними виразками після сумісного впливу світла та тромбоцитарного фактору росту. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVII міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 12-14 жовтня 2017. С. 41–42. (Особистий внесок здобувача: аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку, підготовка доповіді).

8. Іванова Ю., Мушенко Є., Клімова О., Коробов А., Кірієнко Д., Биченко К., Криворучко І. Лікування ран з використанням фото динамічної терапії та сучасних ранових покриттів. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVII міжнар. наук.-практ. конф., м. Київ, 12-14 жовтня 2017. С. 48–49. (*Особистий внесок здобувача: проведення досліджень, обробка результатів*).

9. Клімова О. М., Іванова Ю. В., Коробов А. М., Лавінська О. В., Биченко К. О. Комплексне лікування гнійних ран кінцівок у хворих з цукровим діабетом з використанням світлового впливу, гемо поетичних стовбурових клітин та тромбоцитарного фактору росту. *Інноваційні напрями в генетичній та регенеративній медицині* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю., м. Київ, 9-10 листопада 2017. С. 154–156. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, аналіз результатів, підготовка матеріалів до друку*).

10. Клімова О. М., Биченко К. О. Вплив низько інтенсивного світлового впливу на процеси запальної реакції та регенерації у експериментальних тварин. *Modern Science, Practice* : Abstracts XVIII International Scientific and Practical Conference, Boston, USA, 2-6 May 2020. P. 307–309. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, підготовка матеріалів до друку*).

11. Клімова О., Биченко К., Лавінська О., Жолобак Н., Ільїна А., Коробов А. Реакція біоіндикатора *Dunaliella viridis* на вплив наночастинок і солей діоксида церію. *Застосування лазерів у медицині та біології* : матеріали XLVIII міжнар. наук.-практ. конф., м. Харків, 24-25 травня 2018. С. 140–143. (*Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, підготовка доповіді*).

12. Клімова О. М., Лавінська О. В., Биченко К. О., Коробов А. М., Іванова Ю. В. Фотодинамічна терапія активує кисеньзалежний фагоцитоз у хворих з трофічними виразками. *Application of lasers in medicine and biology*

and 2<sup>nd</sup> *Gamaleia's readings* : Materials XLIX international scientific and practical conference, Hajduszoboszlo, Hungary, 3-7 October 2018. P. 103–106. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів).

13. Klimova E. M., Korobov A. M., Bychenko E. A., Drozdova L. A., Lavinskaya E. V., Kordon T. I., Ivanova Yu. V. Mechanisms of immunocorrective action of complex treatment using photodynamic, cell and tissue therapy in patients with purulent wounds of the lower extremities. *IEEE 8<sup>th</sup> International Conference on Advanced Optoelectronic and lasers, CAOL 2019*. Conference Proceedings. Sozopol, Bulgaria, 06-08 September 2019. P. 107–112. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті).

14. Клімова О., Биченко К. Вивчення механізмів впливу низько інтенсивного світлового впливу (зелений ( $\lambda = 530$  нм, синій ( $\lambda = 440$  нм) на перебіг запальної реакції та імунорезистентність у експериментальних тварин з індукованим перитонітом. *Perspective directions for the development of science and practice* : Abstracts of XX International Scientific and Practical Conference, Athens, Greece, 08-09 June 2020. С. 180–183. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, підготовка матеріалів до друку).

15. Klimova O., Lavinska O., Bychenko E. Phagocytes barrier functions and complement system proteins in patients with lower limbs trophic ulcers before and after combined exposure. *Scientific achievements of modern society* : Materials XII International scientific and practical conference, Liverpool, United Kingdom, 22-24 July 2020. P. 17–22. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті).

16. Клімова О., Лавінська О., Биченко К. Визначення ступеню цитотоксичності наночатиснок диоксиду церію за допомогою клітинної тест-системи. *World Science Problems, Prospects and innovation* : Materials V International scientific and practical conference, Toronto, 27-29 January 2021. С.



700–704. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті*).

17. Клімова О. М., Лавінська О. В., Биченко К. О., Жолобак Н. М. Оцінка цитотоксичних ефектів наночастинок діоксида церію на клітинній тест-системі. *Нанотехнології і наноматеріали у фармації та медицині* : матеріали V Всеукр. наук.-практ. інтернет-конф. з міжнар. участю, м. Харків, 23 квітня 2021. С. 38. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, підготовка матеріалів до друку*).

18. Клімова О. М., Биченко К. О., Лавінська О. В., Мережко О. С., Лобинцева Г. С. Застосування фізичних та біотехнологічних методів для лікування хронічних трофічних ран у пацієнтів з вираженою антибіотикорезистентністю. *Проблеми та досягнення сучасної біотехнології* : матеріали міжнар. наук.-практ. інтернет-конф., м. Харків, 25 березня 2021. С. 186–187. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті*).

***Публікації, які додатково відображають наукові результати  
дисертації:***

19. Клімова О. М., Коробов А. М., Іванова Ю. В., Лавінська О. В., Биченко К. О. Зміна імунореактивності у пацієнтів з гнійно-септичними ранами нижніх кінцівок на тлі цукрового діабету другого типу після світлової дії. *Фотобіологія та фотомедицина*. 2017. № 1,2. С. 64–72. (*Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, участь у написанні статті*).

20. Тимченко М. Є., Клімова О. М., Коробов А. М., Іванова Ю. В., Биченко К. О. Експериментальне обґрунтування використання електромагнітного випромінювання світлового діапазону та тканинних факторів росту у лікуванні неспроможності кишечних анастомозів. *Photobiol*

*Photomed.* 2019. № 26. С 73–80. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів, написання статті).

21. Бойко В. В., Іванова Ю. В., Клімова О. М., Коробов А. М., Мушенко Є. В., Кірієнко Д. А., Лавінська О. В., Биченко К. О. Лікування ран у хворих з критичною ішемією нижніх кінцівок на тлі цукрового діабету. *Харківська хірургічна школа.* 2018. № 1(88). С. 41–46. (Особистий внесок здобувача: проведення дослідження, обробка результатів).

22. Клімова О. М., Іванова Ю. В., Биченко К. О., Мережко О. С., Прасол В. О., Лобинцева Г. С. Механізми імунокоригуючої дії фотодинамічної терапії та екзосом мезенхімальних стовбурових клітин у хворих з хронічними ранами нижніх кінцівок різного генезу. *Харківська хірургічна школа.* 2021. № 4. С. 20–27. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, проведення дослідження, обробка результатів, написання статті, підготовка матеріалів до друку).

23. Клімова О. М., Биченко К. О., Коробов А. М., Кордон Т. І., Лобинцева Г. С. Вплив фото опромінювання різними довжинами хвиль на етапи запалення та стимуляція проліферації екзосомами стовбурових клітин у експерименті. *Клінічна інформатика та телемедицина.* 2021. № 17. С. 100–117. (Особистий внесок здобувача: аналіз літературних джерел, розробка моделі та проведення дослідження, обробка результатів, написання статті, підготовка статті до друку).

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ  
створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 15:46:38 16.11.2023

Назва файлу з підписом: Вученко\_diss.pdf.p7s  
Розмір файлу з підписом: 17.2 КБ

Перевірені файли:  
Назва файлу без підпису: Вученко\_diss.pdf  
Розмір файлу без підпису: 2.7 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: БИЧЕНКО КАТЕРИНА ОЛЕКСІЇВНА  
П.І.Б.: БИЧЕНКО КАТЕРИНА ОЛЕКСІЇВНА  
Країна: Україна  
РНОКПП: 3029522468  
Організація (установа): ФІЗИЧНА ОСОБА  
Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 15:46:37  
16.11.2023  
Сертифікат виданий: КНЕДП АЦСК АТ КБ "ПРИВАТБАНК"  
Серійний номер: 5E984D526F82F38F0400000000723001128F9304  
Алгоритм підпису: ДСТУ-4145  
Тип підпису: Удосконалений  
Тип контейнера: Підпис та дані в CMS-файлі (CAdES)  
Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAdES-X Long)  
Сертифікат: Кваліфікований