

[https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.1\(52\).284691](https://doi.org/10.18524/2077-1746.2023.1(52).284691)

УДК 57.042:616-002

О. М. Клімова^{1,2}, д.б.н., професор

К. О. Биченко^{1,2}, молодший науковий співробітник, аспірант

¹ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМНУ», діагностична лабораторія з імуноферментним та імунофлуоресцентним аналізом. Україна, 61103, м. Харків, в'їзд Балакірева, 1.

²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, кафедра молекулярної біології та біотехнології. Пл. Свободи, 4, Харків, 61000, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ НА РІЗНИХ МОДЕЛЯХ БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ КОМПОНЕНТІВ КОМПЛЕКСНОГО ВПЛИВУ (ФОТООПРОМІНЮВАННЯ; ЕКЗОСОМИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН ТА НАНОЧАСТИНКИ) ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ

Пошук нових оптимальних методів для лікування хронічних запальних процесів є актуальним. В роботі на 3-х експериментальних моделях досліджували біологічні ефекти різних довжин хвиль фотоопромінювання; екзосом з метаболітами стовбурових клітин; ступень цитотоксичності різних концентрацій і розмірів наночастинок діоксиду церію для їх практичного застосування на різних етапах запалення. Виявлена активація вродженого імунітету після дії червоного світла ($\lambda = 660$ нм); зелене світло ($\lambda = 530$ нм) сприяло нормалізації показників імунітету, синє світло ($\lambda = 470$ нм) призводило до завершального етапу запалення. У культурі клітин виявили виражену стимулювальну дію після впливу екзосом стовбурових клітин на проліферативну активність. Виявили оптимальну концентрацію та розміри наночастинок церію (2 нм, 0,01 М), які не надають цитотоксичної дії.

Ключові слова: імунітет; фотоопромінювання; етапи запалення; культура клітин; екзосоми; стовбурові клітини; проліферативна активність; наночастинок діоксиду церію; біоіндикатор *D. viridis*; цитотоксичність

Вступ. Світло істотно впливає на численні біологічні процеси. Дія фотоопромінювання на біооб'єкти різноманітна та пов'язана з відповідними молекулами, зміною їхньої конформації та фізіологічною активністю. Відомо, що найважливішою для всіх живих об'єктів є фотохімічна реакція утворення органічних речовин у процесі фотосинтезу, коли відбувається перетворення сонячного світла на енергію хімічних зв'язків. При зміні довжини хвилі відбувається вибіркова зміна та модифікація біомолекул. Феномен дії світла на живі біооб'єкти застосовують в медичній практиці. Запускаючи фотохімічні реакції у клітині, світло може сприяти активації мікроциркуляції і впливати на різні

метаболичні шляхи. Сьогодні є проблема корекції імунометаболичних показників в лікуванні хронічних запальних процесів. Для вирішення цієї проблеми використовують багато різних підходів [25, 26, 27]. Є практика застосування лікувальних фізичних, біологічних та хімічних методів [1, 6]. Як фізичні методи лікування хронічних запальних процесів застосовують фотоопромінювання різного діапазону спектру, стовбурові гемопоетичні клітини і фактори росту застосовують як біологічні методи корекції гомеостазу, для активації мікроциркуляції, клітинної міграції застосовують наночастинки, які мають антиоксидантні властивості [12, 22].

У багатьох клінічних роботах виявлено позитивний ефект впливу фотоопромінювання на метаболичні порушення при запальних процесах [24, 6], проте немає єдиної думки про механізми і рівень ефективності фотоопромінювання при лікуванні локальних та системних запальних процесів різними довжинами хвиль видимого діапазону, оскільки ефекти світлового випромінювання багато в чому можуть залежати від довжини хвилі, частоти впливу, експозиції, потужності та щільності енергії [16, 20, 19, 21, 20]. Практичні лікарі та вчені ведуть багаторічні дискусії про ефекти та механізми фотодії на організми. Немає єдиної думки у фахівців щодо механізмів дії цього фізичного фактора. Тому є необхідність вивчення і уточнення механізмів впливу різних довжин хвиль видимого діапазону спектру на запальні процеси.

У Харківському національному університеті ім. В.Н. Каразіна в лабораторії квантової біології та квантової медицини було розроблено ряд приладів для фотоопромінювання, у тому числі «Барва-Флекс/24ФМ» (випромінювання у червоній ($\lambda = 660$ нм), зеленій області спектру ($\lambda = 530$ нм)) та синій області спектру ($\lambda = 470$ нм)), який успішно застосовують для лікування уповільнених запальних процесів у хірургічних клініках України.

Поряд із фотоопромінюванням ефективним підходом для корекції метаболичних порушень та нестачі грануляційних процесів при хронічних запальних реакціях є біологічні методи, а саме застосування стовбурових клітин (СК) різного походження. Відомо, що СК беруть участь у репарації, підтримують тканинний гомеостаз, здійснюють регуляцію диференціювання тканеспецифічних прогенераторних СК, стимулюють утворення судин [17, 2].

Багато років успішно застосовують стовбурові клітини та їх метаболіти як біологічні фактори, які є ефективним засобом для корекції імунометаболичних порушень та стимуляції регенеративних процесів. Екзометаболіти стовбурових клітин у вигляді екзосом застосовують для транспортування активних компонентів цих клітин в інші організми, і тому привертають увагу науковців для розробки технологій їх застосування в біології та медицині. Цінність екзосом залежить від вмісту білків, ліпідів і метаболітів, а також набору нуклеїнових кислот, що складається з мікроРНК, фрагментів тРНК, мРНК, мікроРНК-транскриптів і РНК-білкових комплексів. Екзосоми також можуть містити

ядерну та мітохондріальну ДНК, які необхідні для передачі клітинних сигналів і регуляції біологічних функцій. У культурі лейкоцитів у пацієнтів з хронічним запаленням виявили, що властивість екзосом мезенхімальних стовбурових клітин впливає на проліферативну активність *in vitro*.

Щодо дії хімічних факторів, які застосовують як активатори міграції адаптерних пептидів, то відомі біологічні ефекти наночастинок, які мають цілий ряд позитивних впливів на метаболізм систем організму. Відомо, що наночастинки можуть виконувати транспортну функцію для різних фармацевтичних препаратів, вони також здатні проникати через біомембрани та змінювати функції біомолекул.

Як хімічний засіб використовують різні наночастинки (графіт, мідь та інші), в тому числі наночастинки діоксиду церію. При переході в нанокристалічний стан діоксид церію змінює свої фізико-хімічні властивості так, що стає здатним виявляти антиоксидантні та інші властивості. Характеристики наночасток діоксиду церію залишаються недостатньо вивченими. Оскільки відомо, що, потрапляючи в організм, наночастинки іноді здатні пошкоджувати біомембрани, то дуже важливою є оцінка ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних розмірів та різної концентрації [23].

Відомо, що багатоетапний запальний процес в осередку ураження складається з тісно пов'язаних між собою етапів, які послідовно розвиваються: інфільтрації, альтерації та ексудації, регенерації та завершення запального процесу, які характеризуються різним типом імунної відповіді.

У клініці ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМН України» накопичений багаторічний досвід застосування комбінованого лікування у вигляді фотоопромінювання та використання стовбурових клітин (СК) та їх метаболітів для лікування гнійних трофічних виразок нижніх кінцівок у хворих з хронічною патологією судин [7, 8, 9]. Комбіноване лікування містило фотоопромінювання різними довжинами хвиль на різних етапах запального процесу, а також аплікації екзосом СК на ранову поверхню гомілки.

Внесення аплікацій екзосом на ранову поверхню та застосування аплікацій наночастинок на ранове покриття на завершальних етапах запалення забезпечувало необхідну регуляцію імунорезистентності та прискорення загоєння ран.

Дослідження механізмів впливу фізичних та біологічних факторів на імунорезистентність в умовах індукції експериментального запалення і оцінка ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію для комплексного лікування етапів запального процесу раніше не проводилось.

Метою нашої роботи було вивчення біологічних ефектів різних довжин хвиль фотоопромінювання, екзосом з метаболітами стовбурових клітин, ступень цитотоксичності різних концентрацій і розмірів наночастинок діоксиду церію на експериментальних моделях для їх практичного застосування на етапах запалення.

Матеріали та методи досліджень

У роботі використовували 3 моделі:

модель I – моделювання тривалого запального процесу на тваринах з індукованим ліпополісахаридом (ЛПС) перитонітом. Дану модель використовували для оцінки ефектів фотоопромінювання тварин різними довжинами хвиль (660 нм, 530 нм, 470 нм) на різних етапах запального процесу (інфільтрації, альтерації, ексудації та регенерації, проліферації).

Було проведено багатоетапний експеримент на великому масиві лабораторних тварин (щури-самці породи Вістар), які були розподілені 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 внутрішньоочеревинного введення 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 (з аналогічною чисельністю, як в першій групі) 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 щодня піддавали фотовпливу червоною областю видимого спектру ($\lambda = 660$ нм); тварини групи 4 піддавалися щоденному фотоопромінюванню зеленою областю видимого спектру ($\lambda = 530$ нм), тварин групи 5 опромінювали синім світлом ($\lambda = 470$ нм).

У роботі було проведено попередню оцінку змін імунних маркерів до і після фотоопромінювання різними довжинами хвиль кожного етапу запального процесу: 1-й етап – інфільтрація та альтерація; 2-й етап – ексудація; 3-й – регенерація та проліферація.

Вивчали активність нейтрофілів в кисень-незалежному фагоцитозі методом світлової мікроскопії. Хемотаксис і адгезію оцінювали за показниками фагоцитарного індексу (ФІ), фагоцитарного числа (ФЧ) і індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ). Фагоцитарний індекс характеризував кількість нейтрофілів, що беруть участь в процесі фагоцитозу, виражених у відсотках від загальної кількості нейтрофілів крові. Фагоцитарне число (ФЧ) відображало середню кількість клітин *Saccharomyces cerevisiae*, поглинутих одним нейтрофілом, яке виражали в умовних одиницях. Ендоцитоз оцінювали за показником індексу завершеності фагоцитозу, який відображав перетравлюючу здатність нейтрофілів, і розраховували за співвідношенням фагоцитарного числа через 30 хвилин до фагоцитарного числа через 120 хвилин [14].

Ступінь лімфоцитотоксичності визначали методом Терасакі за цитотоксичним ефектом компонентів аутосироватки на аутолімфоцити у присутності екзогенного комплексу. Про сироваткову лімфоцитотоксичність судили за ступенем деструкції клітинних мембран лімфоцитів після їх інкубації з аутосироваткою

у присутності білків комплементу. Реакцію здійснювали з використанням виділених в градієнті щільності $1,077 \text{ г/см}^3$ лімфоцитів із додаванням до інкубованої суспензії 50 мкл комплементу морської свинки. Підрахунок зруйнованих клітин проводили за методом світлової мікроскопії (Olympus BX53) при збільшенні $\times 400$ [29].

Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), які являють собою пов'язані між собою антиген і антитіла, оцінювали спектрофотометрично (СФ-46) після інкубації зразків сироватки в боратному буфері і поліетиленгліколі за кімнатної температури. Оптичну щільність утвореного преципітату вимірювали за довжини хвилі $\lambda = 450 \text{ нм}$ проти боратного буфера [4].

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

Проліферативну активність лейкоцитів визначали у культурі *in vitro* з після дії екзотом СК. У культуру А додавали 100 мкл стерильного 0,9% розчину NaCl, в культуру В вносили 100 мкл мітогену фітогемаглютиніну (ФГА), в культуру С вносили 100 мкл культурального середовища, що містили екзосоми з екзометаболітами мезенхімальних стовбурових клітин. Після 72-годинної інкубації при температурі 37°C вміст флаконів центрифугували при 700 g. Фіксували клітинний препарат розчином – 3 частини та 96^0 етанолового спирту та 1 частини крижаної оцтової кислоти. Після 10-хвилинної експозиції пробірки багаторазово відмивали від клітинного дебрісу, з осаду готували препарат, дозуючи осад на скло. Препарати фарбували за Романовським-Гімзою протягом 30 хв. Підраховували кількість малих та великих лімфоцитів з використанням світлової мікроскопії (збільшення 10×100) (мікроскоп Olympus BX53) [11].

III модель – досліджували можливу цитотоксичну активність наночастинок діоксиду церію різної концентрації та різних розмірів з використанням клітинного біоіндикатора *D. viridis*. При дії негативних факторів різного ступеня цитотоксичності оцінювали морфо-функціональні порушення біоіндикаторної тест-системи щодо зміни форми клітин, накопичення включень, втрати джгутіка, зміни характеру та напрямки руху, утворення агрегатів, виділення екзо-метаболітів [15].

Оцінку можливої цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різних розмірів та різної концентрації (2 нм – 0,1 М, 3–4 нм – 0,2 М, 6 нм – 0,1 М) визначали у 20-добовій синхронізованій культурі *D. viridis* у концентрації 15 млн клітин на 1 мл. Мікродорості культивували [12] за температури $25\text{--}27^\circ\text{C}$ у стандартних умовах [3]. Для оцінки можливої цитотоксичності досліджуваної речовини в лунки планшета вносили в рівних об'ємах (по 50 мкл) завись одноклітинної водорості *D. viridis* і зразки. Підрахунок змінених клітин проводили на склі під мікроскопом Olympus BX53 при збільшенні $\times 400$.

Інтегральні показники цитотоксичності визначали як коефіцієнт спонтанної цитотоксичності КСП (для контрольної культури) та коефіцієнт індукованої цитотоксичності Кц (у досліджуваних зразках).

Коефіцієнт інтегральної цитотоксичності розраховували за формулою (I):

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

Коефіцієнт цитотоксичності, індукованої впливом наночастинок церію та сироватки, визначали за формулою (II):

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

Результати дослідження та їх обговорення

1. Оцінка змін факторів уродженого імунітету в експериментальних тварин після опромінювання різними довжинами хвиль.

У інтактних тварин контрольної групи досліджувані показники імунорезистентності були в межах референтних значень на всіх етапах експерименту. Бар'єрна функція фагоцитів у 1-й групі відповідала фізіологічній нормі, яку оцінювали за показниками хемотаксису, адгезії, поглинальної здатності: ФІ – $(83,0 \pm 2,1)\%$; ФЧ – $(3,71 \pm 0,2)$, ІЗФ – $(1,27 \pm 0,2)$. Гуморальні фактори в цій групі не перевищували референтних значень, і рівень лімфоцитотоксичності в сироватці тварин становив $(27,5 \pm 3,5)\%$, а вміст ЦІК був на рівні норми і становив $(39,2 \pm 6,8)$ Од. Е.

У тварин 2-ї групи в порівнянні з індукованим перитонітом після введення ЛПС на першому етапі запального процесу виявили достовірні порушення хемотаксису та адгезії фагоцитуючих нейтрофілів: ФІ був знижений – $(63,0 \pm 3,3)\%$ порівняно з інтактними тваринами – $(83,0 \pm 2,1)\%$. Поглинальна здатність нейтрофілів (ФІ $(2,3 \pm 0,1)$) у цій групі знизилася при $(3,7 \pm 0,2)$ у групі інтактних тварин, і ІЗФ був дуже низьким – $(0,83 \pm 0,01)$ при $(1,27 \pm 0,2)$ у 1-й групі, що вказує на нестачу перетравлювальної функції фагоцитів – ендодитозу. У цій же групі на другому етапі запалення (альтерації та ексудації) значення фагоцитарного індексу залишалось низьким $(62,0 \pm 1,3)\%$. Поглинальна здатність фагоцитів (ФЧ) на цьому етапі запальної реакції залишалася зниженою $(2,35 \pm 0,32)$. Перетравлювальна здатність фагоцитів також не змінювалася і залишалася низькою до кінця фази регенерації. Тільки на стадії завершення запального процесу ІЗФ наближався до норми $(3,56 \pm 0,24)$, але залишався нижчим, ніж у інтактних тварин 1-ї групи – $(3,71 \pm 0,2)$. Ступінь лімфоцитотоксичності на стадії альтерації та ексудації запального процесу був максимальним – $(73,5 \pm 4,5)\%$, а вміст ЦІК був дещо вищим $(77,5 \pm 3,7)$ Од.Е, ніж в інтактній групі – $(69,2 \pm 6,8)$ Од. Е. У цих тварин з ЛПС-індукованим перитонітом на стадії регенерації відзначали незначне підвищення хемотаксису, адгезивних

властивостей та ендоцитозу нейтрофілів, що виявлялося підвищенням значення ФІ ($69,5 \pm 2,4\%$), ФЧ ($3,01 \pm 0,12$) та ІЗФ ($0,93 \pm 0,04$).

Таким чином, у тварин з ЛПС-індукованим запальним процесом на всіх його етапах виявили стійке зниження ендоцитозу антигенів за рахунок нестачі гранзимних ферментів лізосом нейтрофілів у кисненезалежному фагоцитозі. Щоденне фотоопроміювання експериментальних тварин червоним світлом ($\lambda = 660$ нм) активувало всі етапи запального процесу, починаючи з першої доби.

У групі 3 після багаторазового опроміювання червоним світлом спостерігали закономірну активацію фагоцитозу, що виражалося у підвищенні ФІ ($89,0 \pm 3,4\%$), ФЧ ($3,9 \pm 0,13$) та ІЗФ ($1,0 \pm 0,5$) (рис.2). Спостерігали підвищення вмісту ЦК ($166,8 \pm 22,8$) ум. од. та ступеня лімфоцитотоксичності (ЛЦТ), що залишався на високому рівні та становив ($70,2 \pm 5,1\%$) (рис.1).

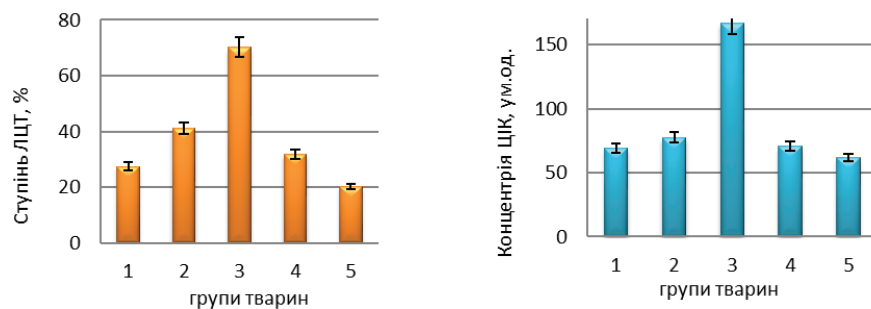


Рис. 1. Гуморальні фактори – ступінь лімфоцитотоксичності (ЛЦТ,%) та концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦК, Од.Є) у групах 1, 2, 3, 4, 5: група 1 – інтактні тварини; група 2 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом; група 3 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом після дії червоного світла $\lambda = 660$ нм; 4 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом після дії зеленого світла $\lambda = 530$ нм; 5 – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом після дії синього світла $\lambda = 470$ нм.

Таким чином, у тварин групи 3 вже на першому етапі запалення виявили виражену індукцію фагоцитозу, збільшення антитілоутворення, що призводило до підвищення вмісту ЦК та підтримання високого рівня лімфоцитотоксичності. Отже, опроміювання червоним світлом видимого діапазону ($\lambda = 660$ нм) викликало достатній ступень взаємодії антитіл з антигенами та утворення ЦК, стимулювало кисненезалежний фагоцитоз, що виявлялося у значній активації хемотаксису, адгезивних властивостей, поглинальної здатності нейтрофілів та сприяло високому ступеню лімфоцитотоксичності. Активація вродженого імунітету після дії червоного опроміювання сприяла скороченню запального процесу на 9 діб.

У 4-й групі тварин виявили позитивну дію після багаторазового фотоопроміювання зеленим світлом ($\lambda = 530$ нм) на досліджувані показники імунно-

реактивності тільки на 14 добу на етапі (альтерації та ексудації) запалення: спостерігали підвищення поглинальної здатності фагоцитів ФЧ ($3,8 \pm 0,2$) при ($3,01 \pm 0,12$) (рис.1) у другій групі порівняння. Спостерігали тенденцію до зниження ЛЦТ ($31,0 \pm 4,2$) та концентрації ЦК ($66,8 \pm 7,3$), що сприяло розвитку регенеративних процесів та скорочення термінів другого етапу запалення на 6 діб (рис.1).

Пролонговане фотоопроміювання тварин 5-ї групи синім світлом ($\lambda = 470$ нм) мало менший ефект на досліджувані імунологічні параметри на ранніх етапах запалення. А на завершальному етапі запального процесу на 18 добу виявили зниження хемотаксису, адгезії фагоцитів (ФІ – $72,0 \pm 4,6$), ніж цей показник в інших групах, а ендоцитоз нейтрофілів – навпаки, був на такому рівні, як в групі інтактних тварин (ІЗФ – $1,2 \pm 0,11$) (рис.2). Показники ЛЦТ ($20,3 \pm 3,1$) та ЦК ($70,5 \pm 9,9$) знижувалися. Строк запального процесу скоротився на 5 днів.

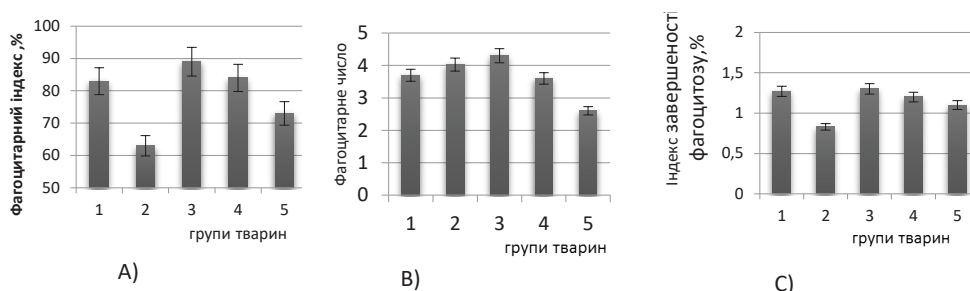


Рис. 2. Значні зміни фагоцитарної активності нейтрофілів на різних етапах запалення у групах тварин після фотоопромінення різними довжинами хвиль ($\lambda=660$ нм, $\lambda=530$ нм, $\lambda=470$ нм). А) – зміни фагоцитарного індексу; В) – зміни фагоцитарного числа; С) – зміни індексу завершеності фагоцитозу

Таким чином, введення експериментальним тваринам групи 2 ліпополісахариду супроводжувалося розвитком вираженого запального процесу. У групі порівняння 2 виявили зміни гуморальної та клітинної ланки імунітету порівняно з групою інтактних тварин. Після фотоопроміювання червоним світлом ($\lambda = 660$ нм) у групі 3 спостерігається підвищення маркерів фагоцитозу, посилення гуморальних реакцій, що супроводжується скороченням першої стадії запального процесу. Опроміювання зеленим світлом ($\lambda = 530$ нм) у групі 4 сприяє збільшенню поглинальної здатності нейтрофілів, зниженню циркулюючих імунних комплексів (ЦК) та рівня лімфоцитотоксичності (ЛЦТ), що характеризує завершення альтерації та стимуляцію регенеративних процесів. Застосування синього світла ($\lambda = 470$ нм) у групі 5 інгібує залишкові запальні процеси та знижує ступінь ЛЦТ та концентрацію ЦК.

2. Оцінка дії екзосом СК на проліферативну активність лімфоцитів *in vitro*

Індукцію проліферативного потенціалу лімфоцитів пацієнтів з хронічним запаленням (трофічні виразки гомілки) здійснювали при культивуванні їх клітин *in vitro* з використанням: мітогену – фітогемаглютиніна та екзосом, що містять екзометаболіти стовбурових клітин. Виявили достовірні відмінності у реакції культивованих клітин на ФГА і екзосоми. При культивуванні лімфоцитів периферичної крові пацієнтів з хронічним запальним процесом без застосування індукторів мітозу виявили низьку спонтанну проліферативну активність клітин в умовах *in vitro*, що виражалося значним зниженням числа великих лімфоцитів (у середньому $7,6 \pm 0,8\%$). Присутність мітогену (ФГА) у культурі лейкоцитів пацієнтів із запальним процесом посилювала проліферативну відповідь у середньому до $(15,0 \pm 2,0)\%$ (рис. 3).

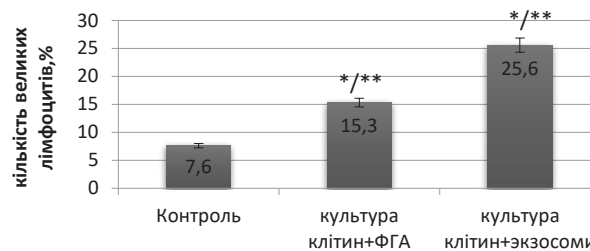


Рис. 3. Проліферативна активність лімфоцитів периферичної крові у культурі *in vitro*: контроль – серeda 199; культура клітин + ФГА; культура клітин + екзосоми, що містять мезенхімальні стовбурові клітини пацієнтів;

* – відмінності достовірні порівняно з контролем; ** – відмінності достовірні між культурами з ФГА та з екзосомами ($p \leq 0,05$)

Індукована екзосомами з екзометаболітами СК проліферативна відповідь лімфоцитів пацієнтів із запальним процесом була достовірно вищою і становила $(25,6 \pm 3,5)\%$ (рис. 3). Виявили, що кількість великих лімфоцитів, що пройшли S-період клітинного циклу, була достовірно вищою, ніж у культурі без мітогену.

Отже, виявили знижену спонтанну функціональну активність лімфоцитів пацієнтів із запальними процесами. Фактори мікрооточення, що перебувають в екзосомах, значно стимулювали синтетичну активність лімфоцитів у культурі, що визначає їхню підготовку до мітозу. У зв'язку з цим, виявлений стимулювальний ефект екзосом СК, які індукують проліферативну активність *in vitro* у культурі клітин пацієнтів із хронічним запаленням, можна застосовувати для активації проліферації та репарації. Напевно, фактори росту, які містять екзосоми, проявляють антагоністичну дію проти інгібіторів проліферативного потенціалу лімфоцитів пацієнтів, які мали довготривалий запальний процес.

3. Дослідження потенціального ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію різного розміру та концентрації з використанням клітинної тест-системи *D. viridis*

Оцінка ступеня цитотоксичності наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками розмірів та концентрації є обов'язковим для розробки подальших рекомендацій їх застосування у медичній практиці при хронічних запальних процесах як цитопротекторів. Тест-система, що включає інтактні одноклітинні водорості *D. viridis*, при інкубації з наночастинами діоксиду церію різних розмірів та концентрацій змінювала свої структурно-функціональні характеристики залежно від природи та кількості токсичних факторів у мікросередовищі [11]. У всіх контрольних зразках клітини біоіндикатора *D. viridis* мали нативну овальну форму та джгутик; їх рухливість становила $(95,0 \pm 1,1)\%$, і клітини зберігали звичайний прямолінійний рух; не утворювались екзометаболіти; патологічних агрегатів у культурі не було. Тому коефіцієнт спонтанної цитотоксичності у контрольній культурі становив – $K_{сп} = 2,0 \pm 0,02$ ум. од.

Інкубація нативної контрольної культури *D. viridis* з додаванням наночастинок діоксиду церію різного розміру і різної концентрації призводила до структурно-функціональних змін клітин водорості в культурі.

Після внесення до тест-системи *D. viridis* наночастинок діоксиду церію малого розміру – 2 нм у концентрації 0,1 М, відзначали незначні зміни швидкості руху деяких клітин у бік уповільнення. Достовірної зміни кількості клітин із зміненою морфологією не виявлено. Культура *D. viridis* не утворювала агрегатів. Коефіцієнт цитотоксичності (Кц) у даному зразку становив лише $(2,8 \pm 0,09)$ ум. од., тобто не відрізнявся від контрольного варіанта.

Після інкубації культури *D. viridis* та діоксиду церію (концентрації 0,2 М) клітини набули неправильної овальної та грушоподібної форми. Розмір наночастинок діоксиду церію становив 3–4 нм і вони проникали в клітини. Вплив діоксиду церію в цій концентрації (0,2 М) призводив до того, що клітини частково втрачали джгутики. Коефіцієнт цитотоксичності (Кц) для цього зразка був підвищеним і становив $(3,6 \pm 0,29)$ ум. од.

Після інкубації тест-системи *D. viridis* з діоксидом церію в концентрації 0,1 М розміром 6 нм всі клітини тест-системи через 30 хвилин набували деформовану округлу форму. У клітинах було багато наночастинок церію, при цьому вони втрачали джгутики і утворювали великі агрегати навколо наночастинок. А коефіцієнт цитотоксичності був дуже підвищеним і становив $(8,5 \pm 0,06)$ ум. од. Таким чином, після інкубації тест-системи *D. viridis* з діоксидом церію максимального розміру 6 нм у концентрації 0,1 М спостерігали виражені цитотоксичні ефекти з боку біоіндикатора.

Таким чином, різні довжини хвиль вибірково діють на модифікацію біомолекул, на чому можуть бути засновані їх різні ефекти на стадії запального процесу. Дослідження змін механізмів імунорезистентності після дії різних довжин хвиль видимого діапазону на етапи запального процесу може сприяти

розробці показань для їх застосування. Виявлена активація проліферації клітин у культурі після впливу екзосом СК може бути вивчена та використана як індуктор репарації при запаленні. Наночастинки діоксиду церію малих розмірів у низькій концентрації, які не мають цитотоксичності, можуть бути використані у вигляді цитопротекторів, антиоксидантів та активаторів мікроциркуляції на стадії альтерації запального процесу. Таким чином, проведені дослідження дозволяють обґрунтувати деякі механізми після дії фотоопромінювання різних довжин хвиль на етапи запалення; оцінити дію екзосом стовбурових клітин як активаторів проліферативного потенціалу в культурі клітин і з'ясувати ступінь цитотоксичності наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками для розробки показань до їх спільного застосування.

Що стосується практичного використання досліджуваних методів лікування хронічних локальних та системних запальних реакцій, то у клініці ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМН України» отримують позитивні результати в лікуванні хронічних трофічних виразок нижніх кінцівок після застосування комбінованої терапії з використанням опромінювання різних довжин хвиль, екзосом стовбурових клітин, а також наночастинок у вигляді аплікацій на ранові покриття трофічних виразок.

Розробка нових лікувально-діагностичних протоколів комплексних підходів з використанням фізичних, біологічних та хімічних факторів є альтернативою для застосування в медичній практиці за наявної антибіотикорезистентності.

Висновки

1. Фотовплив різних довжин хвиль може мати різні ефекти на етапи запалення: від активації до інгібування показників вродженого імунітету на певних етапах запалення, що призводить, у свою чергу, до скорочення термінів лікування. Після опромінювання червоним світлом ($\lambda = 660$ нм) спостерігали підвищення маркерів фагоцитозу, посилення гуморальних реакцій і скорочення першої стадії запального процесу. Зелене світло ($\lambda = 530$ нм) сприяло нормалізації поглинальної здатності нейтрофілів, зниженню циркулюючих імунних комплексів (ЦК) та рівня лімфоцитотоксичності (ЛЦТ), стимуляції регенерації на другому етапі запальної реакції і скороченню етапу запалення. Застосування синього світла ($\lambda = 470$ нм) сприяло скороченню терміну запальної реакції.

2. Виявили стимулювальний ефект екзосом, які містять екзометаболіти мезенхімальних СК, завдяки чому вони індукували проліферативну активність *in vitro* у культурі клітин пацієнтів із хронічним запаленням.

3. Наночастинки діоксиду церію, малого розміру (2 нм) в концентрації 0,1 М не проявляли цитотоксичності, а після інкубації біоіндикатора *D. viridis* з діоксидом церію максимального розміру (6 нм) у той же концентрації 0,1 М спостерігали виражені цитотоксичні ефекти з боку біоіндикатору.

Стаття надійшла до редакції 3.05.2023

Список використаної літератури

1. Божков А.И., Климова Е.М., Бойко В.В., Мензянова Н.Г., Дроздова Л.А. Связь клинических форм мастени с частотой встречаемости HLA-DR-фенотипа и разработка клеточного биосенсора для оценки этой патологии. *Доповіди Національної академії наук України*. 2002. № 3. С. 161–166.
2. Бойко В.В., Иванова Ю.В., Головіна О.А. Антибіотикорезистентність основних збудників інтраабдоминальної інфекції (огляд літератури та власні дослідження). *Хірургія України*. 2016. № 4. С. 108–116.
3. Бойко В.В., Иванова Ю.В., Климова Е.М., Коробов А.М. Лечение ран у больных с критической ишемией нижних конечностей на фоне сахарного диабета. *Харківська хірургічна школа*. 2018. № 1 (88). С. 41–46.
4. Гриневич Ю.А., Алферов Л.Н. Определение иммунных комплексов. *Лабораторное дело*. 1981. № 8. С. 493–6.
5. Девятов В.А., Петров С.В. Микробное обсеменение ран и профилактика гнойных осложнений. *Хирургия*. 1992. № 7–8. С. 70–74.
6. Иванова Ю.В., Мушенко Е.В., Климова Е.М., Коробов А.М. Лечение ран с применением фотодинамической терапии и современных раневых покрытий. Матер. XLVII междунар. научно-практ. Конф. «Применение лазеров в биологии и медицине». Киев. 2017. С. 48–49.
7. Климова Е.М., Быченко Е.А., Коробов А.М., Кордон Т.И., Лобынцева Г.С. Влияние фотооблучения различными длинами волн на этапы воспаления и стимуляция пролиферации экзосомами стволовых клеток в эксперименте. *Клінічна інформатика та телемедицина*. 2021. Т. 17. С. 100–117.
8. Климова Е.М., Коробов А.М., Иванова Ю.В. Изменение иммунореактивности у пациентов с гнойно-септическими ранами нижних конечностей на фоне сахарного диабета II типа после светового воздействия. *Фотобиология и фотомедицина*. 2017. № 1, 2. С. 64–72.
9. Климова Е.М., Коробов А.М., Лавинская Е.В., Дроздова Л.А., Иванова Ю.В., Быченко Е.А. Активация регенеративных процессов и нормализация иммунорезистентности у больных с трофическими язвами после сочетанного влияния светового воздействия и тромбоцитарного фактора роста. Материалы XLVII междунар. научно-практ. Конф. «Применение лазеров в биологии и медицине». Киев. 2017. С. 41–42.
10. Климова Е.М., Лавинская Е.В., Быченко Е.А. Определение степени цитотоксичности наночастиц диоксида церия с помощью клеточной тест-системы. V International scientific and practical conference “World Science Problems, Prospects and innovation”. Toronto. 2021. P. 700–704.
11. Ковальчук Л.В. Иммунологія. Практикум: Навчальний посібник. Геотар-Медіа, 2015. 194 с.
12. Коробов А.М. Новая техника для новейших технологий светотерапии. Материалы XX междунар. научно-практ. Конф. «Применение лазеров в биологии и медицине». 2003. С. 114–117.
13. Масюк Н.П. Морфология, систематика, экология, географическое распространение рода *Dunaliella* Teod. и перспективы его практического использования. Киев: Наук. Думка. 1973. С. 243.
14. Маянский Д.Н., Урсов И.Г. Лекции по клинической патологии: руководство для врачей. 1997. С. 249.
15. Спосіб біосенсорної індикації цитотоксичних факторів біологічної і хімічної природи: пат. 08958 Україна, G01N33/15, C12Q1/04, C12M1/34 на корисну модель; заявл. 28.08.2009; опубл. 10.03.2010 Бюл. № 5.
16. Al-Watban F. A., Al-Watban F.A. Laser therapy converts diabetic wound healing to normal healing. *Photomedicine and Laser Surgery*. 2009. V. 27. № 1. P. 127–135. <https://doi.org/10.1089/pho.2008.2406>.
17. Andaloussi S., Ma ger I., Breakefield X.O. Wood Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2013. V. 12. P. 347–357. <https://doi.org/10.1038/nrd3978>.
18. Bozhkov A.I., Klimova E.M., Nikitchenko Yu.V., Davydov V.V., Zvyagintseva O.V., Kurguzova N.I., Sidorov V.I., Naglov A.V. Stem cells take part in regulation of prooxidant activity and immunity at liver fibrosis. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. 2014. V. 2, № 6–1. P. 5–12. doi: 10.11648/j.ajbls.s.2014020601.12.
19. Conlan M. J., Clin J. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation: a review. *Periodontology*. 1996. V. 23. № 5. P. 492–496. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1996.tb00580.x>.
20. Chen A. C., Arany P. R., Huang Y. Low-Level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS ONE*. 2011. V.6. № 7 P. 256–261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022453>.
21. Houreld N.N., Abrahamse H. Effectiveness of helium-neon laser irradiation on viability and cytotoxicity of diabeticwounded fibroblast cells. *Photomed. and Laser Surg*. 2007. V. 25. № 6. P. 474–481. <https://doi.org/10.1089/pho.2007.1095>.
22. Karu T. Low power laser therapy, biomedical photonics handbook. CRC Press, LLC. 2003. № 48. P. 48–20.

23. 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. *Regulatory mechanisms in biosystems Biosyst. Divers.* 2019. № 27(2). P. 142–147. doi: 10.15421/011919.
24. Klimova E. M., Korobov A. M., Bozhkov A. I., Lesnaya T. A., Lavinskaya E. V., Bychenko E. A., Agarkova A. N. Nonspecific resistance factors and humoral immunity indicators animals blood with experimental peritonitis after visible light irradiation $\lambda=595$. Photodiagnosis and photodynamic therapy. Helsinki. 2012. P. 527.
25. 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. Conference Proceedings. *International Conference on Advanced Optoelectronic and lasers.* 2019. P. 107–112.
26. Nunan R., Harding K. G. Martin P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Nunan. Dis. Model Mech.* 2014. V. 7. P. 1205–1213. <https://doi.org/10.1242/dmm.016782>.
27. Ottawa O. N. Optimal Care of Chronic, Non-Healing, Lower Extremity Wounds. Review of Clinical Evidence and Guidelines. *Canadian Agency for Drugs and Technol in Health.* 2013. P.1120–1125.
28. Richmond N. A., Vivas A. C. Evidence-based management of common chronic lower extremity ulcers. *Dermatol. Ther.* 2013. V. 26. P. 187–196. <https://doi.org/10.1111/dth.12051>.
29. Terasaki P. I., Melelland J. D. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature.* 1964. – P. 204.

О. М. Клімова^{1,2}, К. О. Биченко^{1,2}

¹ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В. Т. Зайцева НАМНУ», діагностична лабораторія з імуноферментним та імунофлуоресцентним аналізом. Україна, 61103, м. Харків, в'їзд Балакірева, 1.

²Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, кафедра молекулярної біології та біотехнології. Пл. Свободи, 4, Харків, 61000, Україна

ДОСЛІДЖЕННЯ НА РІЗНИХ МОДЕЛЯХ БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ КОМПОНЕНТІВ КОМПЛЕКСНОГО ВПЛИВУ (ФОТООПРОМІНЮВАННЯ; ЕКЗОСОМИ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОББУРОВИХ КЛІТИН ТА НАНОЧАСТИНКИ) ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ

Резюме

Вступ. Ведеться пошук нових оптимальних методів для лікування хронічних запальних процесів через зростаючу антибіотикорезистентність. Використовують фізичні, біологічні та хімічні фактори, що на корекцію запального процесу. Як фізичні чинники широко використовують різні джерела фотовпливу. Але лікувальні ефекти застосування фотодії суперечливі та не вивчені механізми впливу різних довжин хвиль на імунну відповідь. Іншим засобом для корекції метаболічних порушень та стимуляції регенеративних процесів є успішне застосування стовбурових клітин різного походження, але не розроблені локальні протоколи для лікування запальних процесів за допомогою стовбурових клітин. Для лікування запальних процесів, стимуляції мікроциркуляції та регенерації і як антиоксидант застосовують різні наночастинки. Але існують суперечливі відомості про біологічну дію цих факторів. І застосування всіх цих факторів супроводжується постійною дискусією про можливі механізми

їх впливу на динаміку локальних та системних запальних процесів і біологічну безпеку наночастинок, у котрих не визначені допустимі дози та оптимальні розміри, які не мають високого ступеня цитотоксичності.

Актуальним є дослідження механізмів зміни імунорезистентності за впливу різних довжин хвиль діапазону видимого світла протягом основних етапів запального процесу та оцінки з'ясування потенційної можливості екзосом, що містять екзометаболіти стовбурових клітин стимулювати проліферативний потенціал імунокомпетентних клітин пацієнтів з хронічним запаленням.

У роботі виконано експериментальні дослідження на 3-х моделях. На моделях індукованого запалення вивчали імунорезистентність на стадіях запального процесу після дії різних довжин хвиль ($\lambda = 660$ нм, 530 нм, 470 нм).

У роботі на першому етапі запалення (інфільтрації) виявили активацію вродженого імунітету після дії червоного світла ($\lambda = 660$ нм) в експериментальних тварин з індукованою запальною реакцією показники були вищими, ніж з групою порівняння у тварин із запаленням без фотовпливу. Зелене світло ($\lambda = 530$ нм) призводило до нормалізації показників клітинного та зниження гуморального імунітету на другому етапі запалення (ексудації). 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 індукованим перитонітом без впливу).

У культурі клітин пацієнтів з хронічними запальними процесами виявили виражену стимульовальну дію після дії екзосом стовбурових клітин на проліферативну активність в порівнянні з мітогеном ФГА. Дослідження цитотоксичності з застосуванням клітинного біоіндикатора *D. viridis* наночастинок діоксиду церію з різними характеристиками дозволило виявити оптимальну концентрацію та розміри наночастинок (2 нм, 0,01М), які не виявляють цитотоксичної дії.

Комплексне застосування фотовпливу екзосом СК та наночастинок дозволять розробити нові лікувальні протоколи для корекції різних порушень гомеостазу на етапах запального процесу.

Мета роботи – вивчити біологічні ефекти різних довжин хвиль фотоопроміювання; екзосом з метаболітами стовбурових клітин та цитотоксичність різних концентрацій наночастинок діоксиду церію на експериментальних моделях для їх практичного поетапного застосування на стадіях запалення

Матеріал і методи. В роботі досліджували показники імунорезистентності після фотоопроміювання та впливу екзосом стовбурових клітин на експериментальних моделях та об'єктах. Досліджували можливу цитотоксичну активність наночастинок діоксиду церію різної концентрації та різних розмірів з використанням клітинного біоіндикатора *D. viridis*.

Результати. Після впливу червоного світла ($\lambda = 660$ нм) виявили на 1-му етапі запальної реакції активацію фагоцитозу, стимуляцію утворення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) і посилення лімфоцитотоксичності (ЛЦТ). Після спільного застосування зеленого світла ($\lambda = 530$ нм) та аплікації екзосом на 2-й фазі запальної реакції виявили максимальний позитивний ефект і імунної відповіді, що проявлялось збільшенням поглинальної здатності нейтрофілів, зниженням ЦІК та ЛЦТ. Застосування синього світла ($\lambda = 470$ нм) на III етапі запальної реакції сприяло завершенню запального процесу.

Встановлено, що екзометаболіти стовбурових клітин виявляють виражену активацію проліферації в культурі лейкоцитів *in vitro*. Екзосоми мають здатність активувати ангіогенез, проліферацію, міграцію та диференціацію ос-

новних типів клітин, що беруть участь у регенерації запальних процесів. При культивуванні лімфоцитів периферичної крові *in vitro* у пацієнтів із хронічним запальним процесом виявили низьку спонтанну проліферативну активність клітин, тоді як з використанням екзосом СК проліферативний ефект був достовірно вищим. Отже, фактори мікрооточення, що знаходяться в екзосомах, стимулювали синтетичну активність лімфоцитів, що культивуються. Наночастинки діоксиду церію розміром 2 нм і в концентрації 0,01 М не мають цитотоксичності (Кц = $2,8 \pm 0,09$) ум. од., а наночастинки збільшених розмірів від 4 до 6 нм у концентрації 0,1 М мають високий рівень цитотоксичності (Кц = $7,2 \pm 0,31$) ум. од.

Висновок.

Проведені нами дослідження на моделях: I – експериментальних тварин із ЛПС-індукованим перитонітом. Виявили кореляцію зі зміною ефектів різних довжин хвиль на показники імунорезистентності; II – культурі лейкоцитів периферичної крові *in vitro*. Застосування екзосом з екзометаболітами мезенхімальних стовбурових клітин індукує проліферативну активність *in vitro* у культурі клітин пацієнтів із хронічним запаленням; III модель – досліджували можливу цитотоксичну активність наночастинок діоксиду церію різної концентрації та різних розмірів з використанням клітинного біоіндикатора *D. Viridis*.

Ключові слова: імунітет; фотоопроміювання; етапи запалення; культура клітин; екзосоми; стовбурові клітини; проліферативна активність; наночастинки діоксиду церію; біоіндикатор *D. viridis*; цитотоксичність

O. M. Klimova^{1,2}, K. O. Bychenko^{1,2}

¹V. T. Zaitsev Institute of General and Urgent Surgery of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Diagnostic laboratory with immunoenzyme and immunofluorescence analysis, Balakirev vyizd, 1, Kharkiv, 61103, Ukraine.

²V. N. Karazin Kharkiv National University, Department of Molecular Biology and Biotechnology, Svobody Sq., 4, Kharkiv, 61000, Ukraine.

RESEARCH ON VARIOUS MODELS OF THE BIOLOGICAL EFFECTS OF COMPONENTS OF A COMPLEX EFFECT (PHOTOIRRADIATION; EXOSOMES OF MESENCHYMAL STEM CELLS AND NANOPARTICLES) FOR THE CORRECTION OF THE INFLAMMATORY PROCESS

Abstract

Introduction. The search for new optimal methods for the treatment of chronic inflammatory processes is underway due to the growing antibiotic resistance. Physical, biological and chemical factors are used to correct the inflammatory process. Various sources of photoinfluence are widely used as physical factors. But the therapeutic effects of phototherapy are controversial, and the mechanisms of influence of different wavelengths on the immune response have not been studied. Another means for correcting metabolic disorders and stimulating regenerative processes is the successful use of stem cells of various origins, but local protocols for

the treatment of inflammatory processes using stem cells have not been developed. Various nanoparticles are used for the treatment of inflammatory processes, stimulation of microcirculation and regeneration, and as an antioxidant. But there is conflicting information about the biological effects of these factors. And the use of all these factors is accompanied by a constant discussion about the possible mechanisms of their influence on the dynamics of local and systemic inflammatory processes and the biological safety of nanoparticles, in which the permissible doses and optimal sizes, which do not have a high degree of cytotoxicity, have not been determined.

It is relevant to study the mechanisms of changes in immunoresistance under the influence of different wavelengths of the visible light range during the main stages of the inflammatory process and to assess the potential for elucidating the potential of exosomes containing exometabolites of stem cells to stimulate the proliferative potential of immunocompetent cells of patients with chronic inflammation.

In the work, experimental studies were performed on 3 models. In models of induced inflammation, immunoresistance was studied at the stages of the inflammatory process after exposure to different wavelengths ($\lambda = 660$ nm, 530 nm, 470 nm).

In the work, the first stage of inflammation (infiltration) revealed the activation of innate immunity after exposure to red light ($\lambda = 660$ nm) in experimental animals with an induced inflammatory reaction. The indicators were higher than with the comparison group in animals with inflammation without photo exposure. Green light ($\lambda = 530$ nm) led to the normalization of cellular indicators and a decrease in humoral immunity in the second stage of inflammation (infiltration). Blue light ($\lambda = 470$ nm) contributed to the reduction of the studied indicators of immunity 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 decreased relative to the comparison group (animals with induced peritonitis without exposure).

In the culture of cells of patients with chronic inflammatory processes, a pronounced stimulating effect was found after the action of exosomes of stem cells on proliferative activity in comparison with the mitogen FGA. The study of cytotoxicity using the cell bioindicator *D. viridis* of cerium dioxide nanoparticles with different characteristics made it possible to identify the optimal concentration and size of nanoparticles (2nm, 0.01M), which do not show a cytotoxic effect.

The complex application of the photoinfluence of SC exosomes and nanoparticles will allow the development of new treatment protocols for the correction of various homeostasis disturbances at the stages of the inflammatory process.

Material and Methods. In the work, indicators of immunoresistance after photoirradiation and exposure to exosomes of stem cells were studied on experimental models and objects. The possible cytotoxic activity of cerium dioxide nanoparticles of different concentrations and sizes was studied using the cellular bioindicator *D. viridis*.

Results. After exposure to red light ($\lambda = 660$ nm), activation of phagocytosis, stimulation of the formation of circulating immune complexes (CIC) and increased lymphocytotoxicity (LCT) were detected at the 1st stage of the inflammatory reaction. After the joint application of green light ($\lambda = 530$ nm) and the application of exosomes in the 2nd phase of the inflammatory reaction, the maximum positive effect and immune response was revealed, which was manifested by an increase in the absorptive capacity of neutrophils, a decrease in CIC and LCT. The use of blue light ($\lambda = 470$ nm) at the III stage of the inflammatory reaction contributed to the completion of the inflammatory process.

It was established that exometabolites of stem cells reveal a pronounced activation of proliferation in leukocyte culture in vitro. Exosomes have the ability to activate angiogenesis, proliferation, migration and differentiation of the main types of cells involved in the regeneration of inflammatory processes. When cultivating peripheral blood lymphocytes in vitro in patients with a chronic inflammatory process, a low spontaneous proliferative activity of cells was found, while with the use of MSC exosomes, the proliferative effect was significantly higher. Therefore, factors of microenvironment found in exosomes stimulated the synthetic activity of cultured lymphocytes.

Nanoparticles of cerium dioxide with a size of 2 nm and a concentration of 0.01M have no cytotoxicity ($Is = 2.8 \pm 0.09$), and an increase in size to 4 to 6 nm in a concentration of 0.1 M has a high level of cytotoxicity ($Is = 7.2 \pm 0.31$).

Conclusion. We conducted the research on the following models: I – experimental animals with LPS-induced peritonitis. They found a correlation with the change in the effects of different wavelengths on indicators of immunoresistance; II – culture of peripheral blood leukocytes in vitro. Application of exosomes with exometabolites of mesenchymal stem cells induces proliferative activity in vitro in cell culture of patients with chronic inflammation; III model – investigated the possible cytotoxic activity of cerium dioxide nanoparticles of different concentrations and different sizes using the cellular bioindicator *D. viridis*.

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

References.

1. Bozhkov A.I., Klimova E.M., Boyko V.V., Menzyanova N.G., Drozdova L.A. (2002) Relationship of clinical forms of myasthenia gravis with the frequency of occurrence of the HLA-DR phenotype and the development of a cellular biosensor for its assessment pathologies. *Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine*. № 3. P. 161–166.
2. Boyko V.V., Ivanova Yu. V., Golovina O.A. (2016) Antibiotic resistance of the main pathogens of intra-abdominal infection (literature review and own research). *Surgery of Ukraine*. № 4. P. 108–116.
3. Boyko V.V., Ivanova Yu.V., Klimova E.M., Korobov A.M. and others. Treatment of wounds in patients with critical ischemia of the lower extremities on the background of diabetes mellitus. Kharkiv Surgical School. 2018. № 1 (88). P. 41–46.
4. Hrynevych Yu. A., Alferov L.N. (1981) Determination of immune complexes. *Laboratory work*. № 8. P. 493–6.
5. Devyatov V.A., Petrov S.V. (1992) Microbial seeding of wounds and prevention of purulent complications. *Surgery*. № 7–8. P. 70–74.
6. Ivanova Yu. V., Mushenko E.V., Klimova E.M., Korobov A.M. et al. (2017) Wound treatment using photodynamic therapy and modern wound dressings. Mater. XLVII international scientific and practical Conf. “Application of lasers in biology and medicine”. Kyiv. P. 48–49.
7. Klimova E. M., Bychenko E.A., Korobov A. M., Kordon, T.Y., Lobyntseva G. S. (2021) Effect of photoirradiation with different wavelengths on stages of inflammation and stimulation of proliferation by exosomes of stem cells in the experiment. *Clinical informatics and telemedicine*. Vol. 17. P. 100–117.
8. Klimova E.M., Korobov A.M., Ivanova Yu.V. et al. (2017) Changes in immunoreactivity in patients with purulent-septic wounds of the lower extremities on the background of type II diabetes mellitus after light exposure. *Photobiology and photomedicine*. № 1, 2. P. 64–72.
9. Klimova E. M., Korobov A. M., Lavinskaya E. V., Drozdova L.A. (2017) Activation of regenerative processes and normalization of immunoresistance in patients with trophic ulcers after the combined effect of light exposure and platelet growth factor. Proceedings of XLVII int. scientific and practical. Conf. “Application of lasers in biology and medicine”. Kyiv. P. 41–42.

10. Klimova E., Lavinskaya E., Bychenko E. (2021) Determination of the degree of cytotoxicity of cerium dioxide nanoparticles using a cellular test system. V International scientific and practical conference "World Science Problems, Prospects and innovation", Toronto. P. 700–704
11. Kovalchuk L.V. (2015) Immunology. Practicum: Heading guide. Geotar-Media. P. 194.
12. Korobov A.M. (2003). New technique for the latest technologies of light therapy. Proceedings of the XX International Scientific and Practical. Conference. "Application of lasers in medicine and biology". Yalta. P. 114–117.
13. Masyuk N.P. (1973) *Morphology, taxonomy, ecology, geographical distribution of the genus Dunaliella Teod. and prospects for its practical use*. Kyiv: Nauk. Dumka. P. 243.
14. Mayansky D.N, Ursov I. G. (1997) Lectures on Clinical Pathology: A Guide for Physicians. Novosibirsk. P. 249.
15. Method for biosensoric indication of cytotoxic factors of biological and chemical nature: Pat. G01N33/15, C12Q1/04, C12M1/34. № 08958 Ukraine; dec. 08/28/2009; publ. 10.03.2010 Bull. № 5.
16. Al-Watban F.A.H. (2009) Laser therapy converts diabetic wound healing to normal healing. *Photomedicine and Laser Surgery*. Vol. 27. № 1. P. 127–135. <https://doi.org/10.1089/pho.2008.2406>.
17. Andaloussi S., Mauger I., Breakefield X.O., Wood M.J.A. (2013) Extracellular vesicles: Biology and emerging therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* Vol. 12. P. 347–357. <https://doi.org/10.1038/nrd3978>.
18. Bozhkov A.I., Klimova E.M., Nikitchenko Yu.V., Davydov V.V., Zvyagintseva O.V., Kurguzova N.I., Sidorov V.I., Naglov A.V. (2014) Stem cells take part in regulation of prooxidant activity and immunity at liver fibrosis. *American Journal of Biomedical and Life Sciences*. Vol. 2. № 6–1. P. 5–12. doi: 10.11648/j.ajbls.s.2014020601.12.
19. Conlan M.J. (1996) Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation: a review. *J Clin. Periodontology*. Vol. 23. № 5. P. 492–496. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1996.tb00580.x>.
20. Chen A.C., Arany P.R., Huang Y. (2011) Low-Level laser therapy activates NF-kB via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One*. Vol. 6. № 7. P. 256–261. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022453>.
21. Houeild N.N., Abrahamse H. (2007) Effectiveness of helium-neon laser irradiation on viability and cytotoxicity of diabeticwounded fibroblast cells. *Photomed. and Laser Surg.* Vol. 25. № 6. P. 474–481. <https://doi.org/10.1089/pho.2007.1095>.
22. Karu T. (2003) Low power laser therapy, biomedical photonics handbook. *CRC Press, LLC*. № 48. P. 48–1–48–20.
23. Klimova E.M., Bozhkov A.I., Bychenko E.A., Lavinskaya E.V., Zholobak N.M., Korobov A.M. (2019) Characteristics of the response of the Microalga (*Dunaliella viridis*) for cerium compounds in culture. Regulatory mechanisms in biosystems *Biosyst. Divers.* № 27(2). P. 142–147 doi: 10.15421/011919.
24. Klimova E.M., Korobov A.M., Bozhkov A.I., Lesnaya T.A., Lavinskaya E.V., Bychenko E.A., Agarkova A.N. (2012) Nonspecific resistance factors and humoral immunity indicators animals blood with experimental peritonitis after visible light irradiation $\lambda=595$. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. Helsinki, Finland. P. 527.
25. Klimova E.M., Korobov A.M., Bychenko E.A., Drozdova L.A., Lavinskaya E.V., Kordon T.I., Ivanova Yu.V. (2019) Mechanisms of immunocorrective action of complex treatment using photodynamic, cell and tissue therapy in patients with purulent wounds of the lower extremities. *Conference Proceedings. International Conference on Advanced Optoelectronic and lasers. Sozopol*. P. 107–112.
26. Nunan R., Harding K.G., Martin P. (2014) Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. *Dis. Model Mech.* Vol. 7. P. 1205–1213. <https://doi.org/10.1242/dmm.016782>.
27. Ottawa O.N. (2013) Optimal Care of Chronic, Non-Healing, Lower Extremity Wounds. A Review of Clinical Evidence and Guidelines. Canadian Agency for Drugs and Technol. in Health. Dec 17. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24741724/>
28. Richmond N. A., Maderal A.D., Vivas A.C. (2013) Evidence-based management of common chronic lower extremity ulcers. *Dermatol. Ther.* Vol. 26. P. 187–196. <https://doi.org/10.1111/dth.12051>.
29. Terasaki P.I., Melelland J.D. (1964) Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature*. P. 204.