



О. М. Клімова<sup>1</sup>,  
Ю. В. Іванова<sup>1</sup>,  
К. А. Биченко<sup>1</sup>,  
О. С. Мережко<sup>1</sup>,  
В. О. Прасол<sup>1</sup>,  
Г. С. Лобинцева<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ДУ «Інститут загальної та невідкладної хірургії ім. В.Т. Зайцева НАМНУ», м. Харків

<sup>2</sup> Інститут клітинної терапії

© Колектив авторів

## МЕХАНІЗМИ ІМУНОКОРИГУЮЮЧОЇ ДІЇ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ ТА ЕКЗОСОМ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН У ХВОРИХ З ХРОНІЧНИМИ РАНАМИ НИЖНІХ КІНЦІВОК РІЗНОГО ГЕНЕЗУ

**Резюме.** *Вступ.* Лікування хронічних ран нижніх кінцівок на сьогоднішній день пов'язано з тривалим застосуванням антибіотикотерапії, яка частіше ускладнює перебіг ранового процесу. У зв'язку з цим ведеться пошук нових методів лікування. У якості фізичного методу використовували низькоінтенсивний світловий вплив різних довжин хвиль фотодинамічної терапії (ФДТ) з застосуванням фотосенсібілізатору Дімегіну, а в якості біологічного методу – мультипотентні мезенхімально-стромальні клітини та їх екзометаболіти у вигляді екзосом.

*Метою дослідження* було вивчення змін бар'єрної функції кисненезалежного і киснезалежного фагоцитозу й вмісту сироваткового фактора росту судин (VEGF) у хворих з хронічними ранами нижніх кінцівок до і після застосування комплексного світлового впливу і екзосом.

*Матеріали та методи.* Активність фагоцитозу нейтрофілів досліджували за допомогою оцінки хемотаксису, адгезії й ендоцитозу та шляхом визначення активних форм кисню (ROS) у кисневозалежному фагоцитозі із використанням світлової та конфокальної мікроскопії. Концентрацію VEGF визначали методом ІФА.

*Результати.* Після використання ФДТ та Дімегіну із застосуванням червоного світла ( $\lambda=660\text{nm}$ ) спостерігали активацію кисненезалежного і киснезалежного фагоцитозу, а також збільшення синтезу вмісту фактора росту судин VEGF у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок. Після застосування зеленого світла ( $\lambda=530\text{nm}$ ) і аплікацій суспензії екзосом спостерігали нормалізацію імунних та метаболічних процесів, що призводило до прискорення регенерації.

*Висновки.* Після проведення комплексної низькоінтенсивної світлової терапії й екзосом вдалося повністю очистити рани від некрозу і досягти загоєння в короткі терміни.

**Ключові слова:** *фотодинамічна терапія, екзосоми, рани, фагоцитоз, VEGF.*

### Вступ

У терерышній час, незважаючи на досягнення сучасної медицини, проблема лікування хронічних ран, що характеризуються уповільненим запаленням, залишається актуальною. Їх лікування вимагає тривалого застосування великої кількості лікарських засобів, в основному антибіотиків, що часто виявляється не ефективним. Спільною особливістю гнійних ран, патофізіологічно складних і різноманітних, є тривале протікання запалення на тлі бактеріального інфікування з незавершеними стадіями запалення (інфільтрації, альтерації, ексудації і проліферації). Це призводить до значного пошкодження тканини через надмірне виділення медіаторів, накопичення клітинного дебрису та інших продуктів розпаду, наявності

некротичної тканини, порушення мікроциркуляції, ЩО перешкоджає загоєнню.

До пригнічення регенеративних процесів і гальмування загоєння рани призводить порушення імунного гомеостазу [1]. Хронічний процес в рані 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 ефекторних механізмів імунологічного гомеостазу, і забезпечують підтримку імуногенетичного контролю внутрішнього середовища організму за рахунок наявності специфічних поверхневих рецепторів [2].



На тлі цукрового діабету лікування хронічних ран нижніх кінцівок, на жаль, також зводиться до тривалого застосування широкого спектра антибіотиків, але антибіотикорезистентність ускладнює перебіг ранового процесу, а гіперглікемія призводить до незворотних змін метаболізму та імунітету, що істотно ускладнює загоєння ран.

У зв'язку з цим ведеться пошук нових альтернативних підходів до лікування, таких як використання фізичних і біологічних методів корекції метаболізму. В якості фізичних методів в клінічній практиці широко застосовують низькоінтенсивний світловий вплив різних довжин хвиль і фотосенсибілізатори для лікування гнійно-запальних процесів.

Ефективним біологічним методом для лікування метаболічних порушень і деструктивних процесів в тканинах є застосування клітинної терапії з використанням стовбурових клітин, попередників гемопоезу різного походження, в тому числі мезенхімальних клітин плаценти (МКП) [3]. Завдяки феномену везикулярного транспорту, стовбурові клітини, що продукують біологічно активні речовини ( $\gamma$ -інтерферон, цитокіни, мультибілкові комплекси, що містять ростові фактори, в тому числі фактор росту ендотелію судин (VEGF), тромбоцитарний фактор і мікроРНК), накопичують і виділяють їх в везикулах в позаклітинний простір у вигляді екзосом [4].

Везикулярні мембрани екзосом забезпечені фосфоліпідами, що дозволяє цим структурам проникати в клітини-мішені. Такі комплекси активно секретуються мезенхімальними стовбуровими клітинами, захищають клітини-мішені від апоптозу, стимулюють їх проліферацію і беруть участь в утворенні судин. Також екзосоми активно використовують в якості імунотерапевтичних засобів [5].

Одним з компонентів мультибілкового комплексу екзосом є фактор росту ендотелію судин (VEGF). Цей цитокін координує комплекс клітинних процесів, що включає диференціювання імунних клітин, хемотаксис, фагоцитоз, мітогенез і синтез компонентів міжклітинного матриксу [6]. Ростовий фактор – VEGF продукується багатьма типами клітин, які беруть участь в загоєнні ран: ендотеліальними клітинами, фібробластами, тромбоцитами, нейтрофілами і макрофагами, стимулюючи ангиогенез [7]. Вивчення динаміки зміни VEGF дозволить проводити моніторинг ефективності проведеної комплексної терапії з використанням світлолікування і мультимолекулярного комплексу екзосом.

#### Мета досліджень

Вивчення змін показників кисненезалежного і кисненезалежного фагоцитозу і сироватково-

го вмісту фактора росту судин (VEGF) у хворих з трофічними ранами нижніх кінцівок на тлі цукрового діабету II типу до і після поєданого впливу низькоінтенсивного випромінювання різних довжин хвиль (червоне  $\lambda=660$  нм, зелене  $\lambda=530$  нм) і застосування екзосом, отриманих з культивованих МСК плаценти.

#### Матеріали і методи досліджень

У роботі було обстежено 94 пацієнта з хронічними ранами нижніх кінцівок, з них 39 % були пацієнти з цукровим діабетом II типу у віці від 58 до 80 років, яким проводили 3-кратну поетапну фотодинамічну терапію (ФДТ) із застосуванням низькоінтенсивного світлового впливу різних довжин хвиль (червоне світло,  $\lambda=660$  нм та зелене світло,  $\lambda=530$  нм) з використанням фотосенсибілізатора Дімегіна і з подальшим 3-кратним нанесенням на поверхню рани екзосом у вигляді аплікацій.

Поетапну ФДТ проводили з використанням світлодіодних матриць Коробова А. — Коробова В. «Барва-Флекс/24ФМ», які випромінюють у червоній ( $\lambda=660$  нм) і зеленій ( $\lambda=530$  нм) областях спектра. Інтегральна потужність випромінювання 24 світлодіодів становила 120 мВт, щільність потужності опромінюваної поверхні – 2,5 мВт/см<sup>2</sup>. Витримували 5-хвилинний інтервал на відстані 2 см для досягнення ідентичності дії у пацієнтів.

Отримання суспензії екзосом. Як джерело екзосом використовували культуру мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), які культивували в середовищі альфа-МЕМ з низьким вмістом глюкози. Культивування клітин здійснювали до 80% моношару культури. Зразки культуральної рідини фільтрували і видаляли клітинний дебрис. Потім здійснювали об'єднання отриманих фракцій для збільшення їх концентрації, шляхом центрифугування. Використання даного способу дозволило отримати і концентрувати мікроРНК, що містять екзосоми ММСК для стимуляції регенеративних процесів в рані в короткі терміни.

Дослідження змін факторів вродженого імунітету кисненезалежного і кисненезалежного фагоцитозу і вміст фактора росту судин (VEGF) проводили до і після комплексного лікування.

Визначення кисненезалежного фагоцитозу. Бар'єрну функцію фагоцитуючих нейтрофілів досліджували в кисненезалежному фагоцитозі. Активність фагоцитозу нейтрофільних гранулоцитів досліджували за допомогою оцінки хемотаксису, адгезії і ендоцитозу. Хемотаксис і адгезію фагоцитуючих нейтрофілів оцінювали за фагоцитарним індексом (ФІ), який характеризує кількість нейтрофілів, здатних до взаємодії з мікроорганізмами. Визначали фагоцитарне число (ФЧ), що характеризує середню кількість

поглинених мікробних тіл одним нейтрофілом. Перетравлювальну здатність фагоцитів оцінювали за індексом завершеності фагоцитозу (ІЗФ), який обчислювали на різних термінах інкубації – через 30 хв і через 2 години.

Визначення киснезалежного фагоцитозу. Киснезалежний фагоцитоз оцінювали за зміною активності НАДФ-Н-оксидазної реакції в лізосомах нейтрофілів за спонтанним і стимульованим відновленням барвника до гранул діформазана в НСТ-тесті. Залежно від активності окислювальних ферментів нейтрофілів під впливом супероксиданіону  $O_2^-$  і гідроперекису  $H_2O_2$ , що утворюються в НАДФ-Н-оксидазній реакції, визначали рівень реакції спонтанного і стимульованого зімозаном відновлення барвника нітросинього тетразолію (НСТ) у фагоцитуючих клітинах. Візуально оцінювали кількість клітин, що спонтанно поглинули і відновили барвник до гранул діформазана, що характеризувало перетравлювальну здатність клітин за участю активних форм кисню (АФК, ROS). Облік реакції проводили методом світлової мікроскопії [8].

Визначення інтенсивності утворення ROS методом конфокальної мікроскопії. Візуальну оцінку інтенсивності утворень синглетного кисню проводили методом конфокальної мікроскопії в мітохондріях фагоцитів (Olympus FV10i-LIV). Реагенти фірми-виробника до набору Cellular Reactive Oxygen Species detection Assay Kit orange fluorescence (Abcam, ab186028).

Визначення концентрації фактору росту ендотелію судин (VEGF) в сироватці крові проводили за допомогою твердофазного ІФА (Вектор-Бест, Україна) з використанням специфічних моноклональних антитіл до VEGF. Вимірювання оптичної щільності зразків проводили за довжини хвилі 450 нм на імуноферментному аналізаторі StatFax 3200 (США).

### Результати досліджень та їх обговорення

Після проведеного комплексного поетапного лікування (із застосуванням ФДТ і використанням суспензії екзосом мезенхімальних стовбурових клітин плаценти) поверхні рани у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кін-

цівок спостерігали повноцінне очищення ран, посилення регенеративних процесів, стимуляцію мікроциркуляції і скорочення термінів загоєння ран. Ці процеси були результатом активації бар'єрної функції вродженого імунітету і стимуляції синтезу фактору росту VEGF.

У результаті проведених досліджень встановили, що фагоцитарний індекс (ФІ, % — кількість фагоцитів, що поглинув антиген) до впливу був достовірно вище контролю і становив  $(75,3 \pm 2,3) \%$  при референтному значенні  $(65,0 \pm 1,3) \%$ . Після впливу  $\lambda=660$  нм (червоне світло) показник підвищувався і становив  $(81,5 \pm 1,1) \%$ . Після дії  $\lambda=530$  нм (зелене світло) і застосування екзосом, фагоцитарний індекс склав  $(68,2 \pm 1,3) \%$  (рис. 1А).

Фагоцитарне число (ФЧ), що відображає поглинальну здатність нейтрофілів, до ФДТ було  $(2,99 \pm 1,2)$  ум. од. Після впливу  $\lambda=660$  нм (червоне світло) показник підвищився до  $4,5 \pm 1,1$  ум. од., а після застосування  $\lambda=530$  нм (зелене світло) з подальшим нанесенням на рану суспензії екзосом МСТП поглинальна здатність нейтрофілів знизилася до  $(3,61 \pm 1,3)$  ум. од. при референтному значенні  $(3,2 \pm 1,6)$  ум. од (рис. 1В).

Ендоцитоз мікроорганізмів фагоцитуючими нейтрофілами, про який судили за індексом завершеності фагоцитозу (ІЗФ), був знижений до впливу, і становив  $(0,75 \pm 0,01)$  ум. од. при референтному значенні  $(1,15 \pm 0,02)$  ум. од. (рис. 1С). Після застосування  $\lambda=660$  нм (червоне світло) перетравлювальна здатність гранулоцитарних нейтрофілів, про що судили за індексом завершеності фагоцитозу, підвищувалася до  $(0,8 \pm 0,03)$  ум. од. Однак, після застосування  $\lambda=530$  нм (зелене світло) і екзосом перетравлювальна здатність нейтрофілів позитивно зростала до  $(0,9 \pm 0,2)$  ум. од. при референтному значенні  $(1,15 \pm 0,02)$  ум. од. Стимулююча дія екзосом мезенхімального походження проявлялась в імуномодельюючому впливі на професійні фагоцити і в стимуляції високої регенеративної здатності в процесах епітелізації екзогенними ростовими факторами і цитокінами.

Киснезалежний фагоцитоз вивчали за ферментативною активністю фагоцитуючих клі-

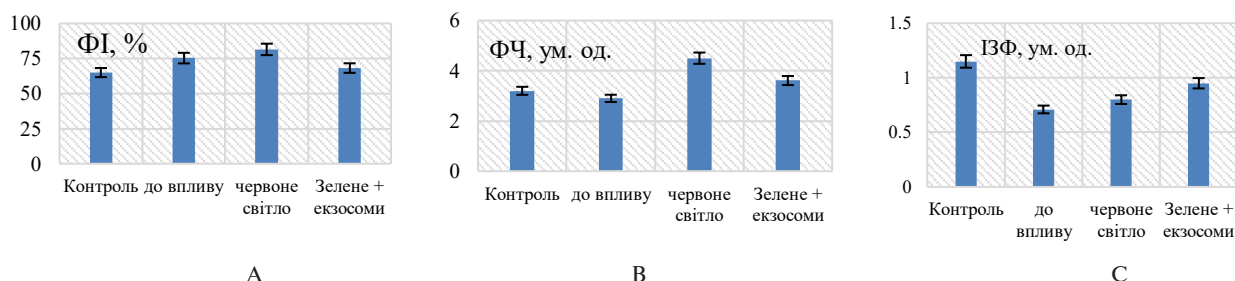


Рис. 1. Зміна показників фагоцитарної активності нейтрофілів у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок



тин в НСТ-тесті. Виявили порушення окисно-відновного резерву у всіх обстежуваних пацієнтів на всіх стадіях запального процесу. Виявили активацію утворення активних форм кисню, про що судили по збільшенню кількості діформазан-позитивних клітин в спонтанному НСТ-тесті. Відзначали підвищення в 3,5 разу спонтанної окисної реакції у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок до впливу, тоді як після впливу червоним світлом спонтанна реакція перевищувала референтні значення в 4 рази. Виражена спонтанна окислювальна реакція у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок свідчить про недостатність НАДФ-Н-оксидазної системи фагоцитів. Після дії  $\lambda=530\text{nm}$  (зелене світло) з подальшим нанесенням суспензії екзосом окислювальна реакція підвищувалася в 2,5 рази щодо референтних значень (рис. 2А).

Візуально оцінювали кількість клітин, які спонтанно поглинули і відновили барвник НСТ до гранул діформазана в стимульованому зімозаном НСТ-тесті, який характеризує функціональний окислювальний резерв нейтрофілів. Після впливу червоним світлом виявили підвищення стимульованого зімозаном НСТ-тесту (СТ) у всіх обстежених пацієнтів. Після застосування зеленого світла і суспензії екзосом показник знизився до  $(67,4 \pm 2,3) \%$  і в цей період у пацієнтів відзначали процес швидкого очищення ран на тлі стимульованої зімозаном функції окислювальних ферментів (рис. 2В).

У пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок до впливу виявили низький рівень індексу стимуляції, який свідчить про недостатність НАДФ-Н-оксидазної системи і зниження кисневого резерву фагоцитів (рис. 2С). Після застосування комплексного світлового впливу і суспензії екзосом мезенхімальних клітин внутрішньоклітинний кисневий резерв був вище, про що судили за збільшенням індексу стимуляції. Корекція киснезалежного фагоцитозу після комплексного впливу відображає позитивну клінічну динаміку відновлення бар'єрної

функції фагоцитуючих нейтрофілів, за рахунок відновлення загального окисного резерву.

Для візуалізації процесингу антигенів нейтрофілами у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок киснезалежний фагоцитоз оцінювали *ex vivo* із використанням конфокальної мікроскопії за допомогою визначення активних форм кисню (ROS — Reactive oxygen species) на мембранах мітохондрій фагоцитуючих нейтрофілів.

У пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок візуально видно відсутність стимуляції утворення ROS в спонтанному НСТ-тесті (рис. 3А). Після антигенної стимуляції зімозаном виявили збільшення вмісту ROS на 46 %, що свідчило про виражений окислювальний процес в мітохондріях нейтрофілів (рис. 3В).

Таким чином, вплив  $\lambda=660\text{nm}$  (червоне світло) на стадії інфільтрації призводив до стимуляції показників киснезалежного і киснезалежного фагоцитозу.

У всіх обстежених пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок на різних стадіях запалення виявили різноспрямовані зміни вмісту VEGF. До світлової дії даний ростовий фактор у частини пацієнтів був дещо підвищений щодо контролю на 10%, але у пацієнтів з цукровим діабетом вміст VEGF був знижений в 1,5 разу в порівнянні з контролем  $(480,3 \pm 210,2) \text{pg/ml}$  (рис. 4).

На першій стадії запалення — альтерації — застосовували опромінення червоним світлом ( $\lambda=660\text{nm}$ ), який посилює запальну реакцію. Після чого вміст VEGF збільшився в 2 рази. З метою поліпшення очищення рани застосовували низькоінтенсивне опромінення зеленим світлом ( $\lambda=530\text{nm}$ ), після чого вміст VEGF знизився у 2,5 рази. Для очищення рани і грануляції було достатньо одноразового застосування цієї довжини хвилі.

В якості комплексного підходу до вирішення цих завдань в роботі спільно застосовували ФДТ різними довжинами хвиль ( $\lambda=530\text{nm}$ ,  $\lambda=660\text{nm}$ ) і багатократні аплікації мультимолекулярних комплексів мезенхімальних клітин

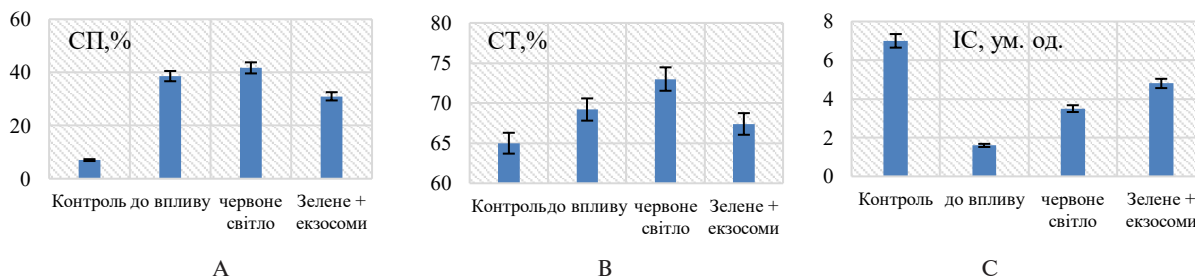


Рис. 2 Зміна показників активності ферментів фагоцитуючих клітин в НСТ-тесті до і після світлової дії у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок. СП, % — відсоток позитивних клітин, що спонтанно поглинули барвник НСТ, СТ, % — відсоток позитивних клітин, що поглинули барвник НСТ після стимуляції зімозаном, ІС — зміна індексу стимуляції

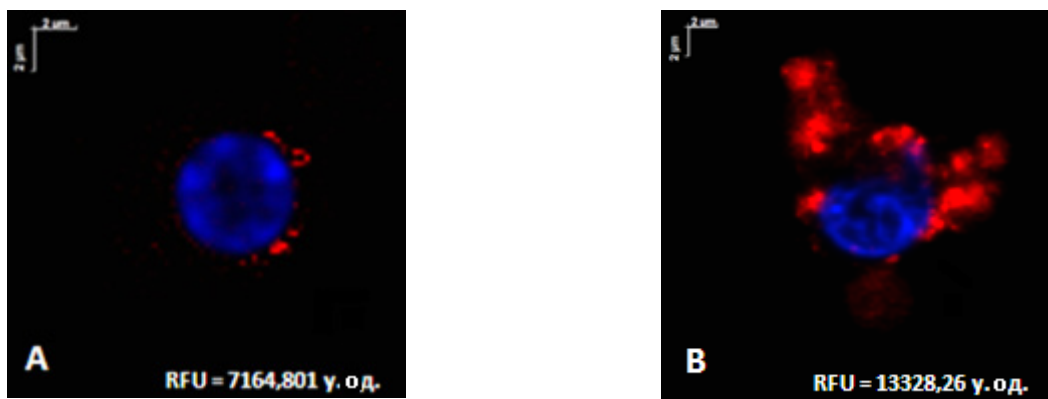


Рис. 3 Локалізація ROS в нейтрофілах у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок. Флуоресценція барвника DRAQ5, що зв'язується з ДНК (синій колір, забарвлення ядер) і ROS (червоний колір, на мембранах клітинних структур нейтрофілів). А — помірне червоне світіння ROS при спонтанному нестимульованому фагоцитозі (СП); В — інтенсивне світіння ROS при стимуляції фагоцитозу зімозаном (СТ) — значна активація утворення ROS після стимуляції НАДФ-Н-оксидазних реакцій, збільшення концентрації ROS на мембранах цитоплазматичних структур нейтрофілів. Лазерна скануюча конфокальна мікроскопія, х60 (Olympus FV10i-LIV, Японія). RFU (relative fluorescence units) — відносний рівень флуоресценції

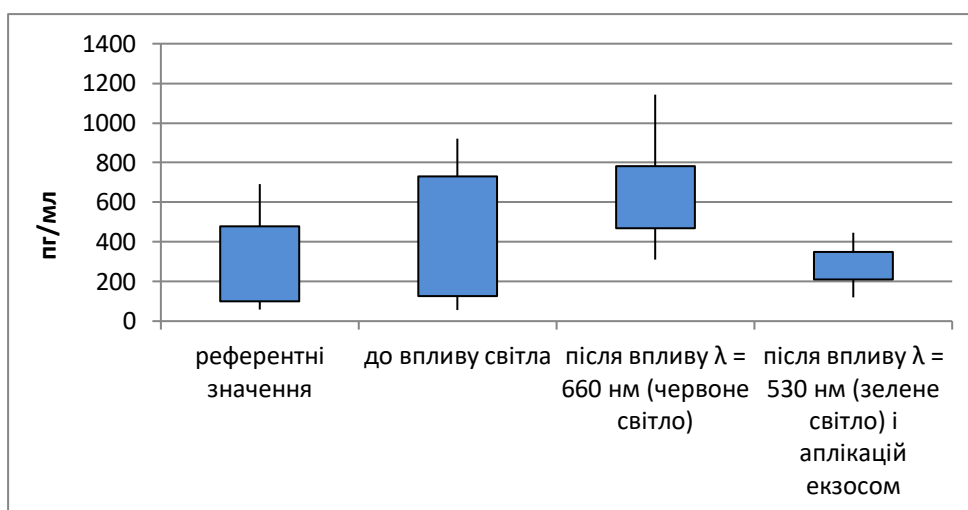


Рис. 4. Вміст фактора росту ендотелію судин (VEGF) у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок до і після світлової дії різних довжин хвиль і застосування мультипотентних мезенхімальних стовбурових клітин плаценти (МСКП) — екзосом

— екзосом на поверхню рани і виявили значне прискорення загоєння ран. Первинний ефект після застосування низькоінтенсивної ФДТ ( $\lambda=660$  нм) запускає каскад реакцій запалення і відбувається активація ряду ефекторних механізмів: вторинної запальної альтерації тканин, судинної реакції, а також стимуляції хемотаксису і ендоцитозу фагоцитами. У експериментальних роботах раніше нами було показано, що дія червоного світла ( $\lambda=660$  нм) сприяла посиленню інфільтрації фагоцитуючих клітин у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом [9]. Вільнорадикальні процеси при ФДТ призводили до інтенсивного утворення синглетного кисню, який є сильним окислювачем, що ушкоджував бактеріальні клітини, прискорював процеси автофагії і апоптозу дефектних клітин. Після ФДТ з застосуванням червоного світла ( $\lambda=660$  нм) спостерігали стимуляцію інфільтрації рани за рахунок активації киснене-

залежного і киснезалежного фагоцитозу, збільшення вмісту VEGF у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок, в тому числі у пацієнтів з цукровим діабетом, що виражалося у підвищенні ФІ на 8% і підвищенні ФЧ — в 2 рази, на тлі деякого підвищення перетравлювальної здатності фагоцитів.

Після повного очищення ран на наступному етапі ФДТ з використанням зеленого світла ( $\lambda=530$  нм) і застосування аплікації суспензії екзосом на рану, спостерігали стимуляцію регенеративних процесів та епітелізацію на тлі нормалізації показників усіх стадій кисненезалежного фагоцитозу (хемотаксису, адгезії і ендоцитозу) і активації НАДФ-Н ферментативних реакцій киснезалежного фагоцитозу.

У наших дослідженнях раніше було показано, що низький рівень VEGF у пацієнтів з аневризмом аорти був високим фактором ризику тяжкого перебігу захворювання або летального



результату на тлі пригніченого фагоцитозу [10]. У пацієнтів з хронічними ранами, що не загоюються, рівень фактору росту ендотелію судин (VEGF) мав тенденцію до зниження і сповільнював процеси відновлення, що в більшій мірі спостерігали у пацієнтів з цукровим діабетом.

У результаті низькоінтенсивної світлової дії  $\lambda=660$  нм вміст VEGF збільшувався в 2 рази, тим самим збільшуючи запальну відповідь. А після впливу  $\lambda=530$  нм і аплікацій екзосом рівень VEGF не змінювався і був в межах референтних значень, що сприяло загоєнню хронічних ран.

З метою усунення метаболічних порушень застосували біологічний метод корекції який полягав у застосуванні активних метаболітів мезенхімальних клітин – екзосом. Раніше в дослідженнях було показано, що екзосомальні стовбурових гемопоетичних клітин мають виражений імунотропний і імюнокорегуючий ефект у хірургічних хворих [11].

У цій роботі було виявлено, що екзосоми, крім їх позитивної метаболічної дії за рахунок наявності екзосомальних метаболітів, заточених в мембрану, і діють як фактори мікрооточення для цільових клітин і чинять виражений загоювальний ефект, мали здатність індукувати ангіогенез, проліферацію, міграцію і диференціацію основних типів клітин, не лише на локальному рівні, а й організму в цілому. Підтвердженням

цьому було підвищення і наступна стійка нормалізація рівня VEGF у всіх пацієнтів.

Таким чином, після проведення комплексної низькоінтенсивної світлової терапії та застосування екзосомальних стовбурових клітин вдалося домогтися прискорення загоєння ран і тривалої нормалізації метаболічних порушень.

### Висновки

1. Фотодинамічна терапія із застосуванням  $\lambda=630$  нм (червоне світло) сприяла утворенню АФК, що в свою чергу посилювало процесинг антигенів за участю АФК гранулоцитарних нейтрофілів в кисненезалежному фагоцитозі у пацієнтів з хронічними ранами нижніх кінцівок.

2. Застосування ФДТ з використанням суспензії екзосом, отриманих з мезенхімальних стовбурових клітин плаценти, сприяло нормалізації загальних метаболічних порушень диференціювання професійних фагоцитів і синтезу фактора росту VEGF, а також нормалізації хемотаксису, адгезії і ендцитозу гранулоцитарними нейтрофілами в кисненезалежному фагоцитозі.

3. Проведене комплексне лікування, що включає ФДТ і аплікації екзосом, сприяло 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.

### ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Вялов СЛ. Современные представления о регуляции процесса заживления ран (обзор литературы). *Анналы пласт. реконструктив. и эстет. хирургии*. 1999. 1. 49-56.
2. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González B, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *International journal of molecular sciences*. 2011; 12 (5): 3117–32. doi: 10.3390/ijms12053117.
3. Otero-Vicas M, Falanga V. Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wounds: The Spectrum from Basic to Advanced Therapy. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2016; 5(4):149-63. doi:10.1089/wound.2015.0627.
4. Xu Z, Zeng S, Gong Z. Exosome-based immunotherapy: a promising approach for cancer treatment. *Mol Cancer*. 2020;19:160. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01278-3>.
5. Zhang J, Chen Ch, Hu B, Niu X, Liu X, Zhang G, Zhang Ch, Li Q, Wang Y. Exosomes derived from human endothelial progenitor cells accelerate cutaneous wound healing by promoting angiogenesis through Erk1/2 signaling. *Int J Biol Sciences*. 2016; 12(12): 1472–87. doi: 10.7150/ijbs.15514
6. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem*. 2013;153(1):13-9. doi: 10.1093/jb/mvs136.
7. Stojadinovic OKA, Golinko M, Tomic-Canic M, Brem H. A novel, non-angiogenic mechanism of VEGF: stimulation of keratinocyte and fibroblast migration. *Wound Repair and Regeneration*. 2007;15:A30.
8. Маянский АН, Маянский ДН. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука, Сибирское отделение. 1983; 254.
9. Клімова ОМ, Коробов АМ, Биченко КО, Лавінська ОВ, Кордон ТІ, Дроздова ЛА. Вплив низькоінтенсивного випромінювання оптичного діапазону спектра ( $\lambda = 660$  нм) на показники імунорезистентності у тварин з експериментальним перитонітом // *Вісник Київського національного університету ім. Т. Шевченка. Біологія*. 2020; 82(3):35-42.
10. Клімова ОМ, Бучнева ОВ, Мережко ОС, Калашникова ЮВ. Прогноз результату хірургічного лікування хворих з аневризмою аорти за зміною концентрації фактора росту ендотелію судин (VEGF) та імунологічних факторів. *Харківська хірургічна школа*. 2020;1(100):127 – 33. <https://doi.org/10.37699/2308-7005.1.2020.21>.
11. Климова ЕМ, Вотякова ИА, Божков АИ, Колоколова ОБ, Дроздова ЛА. Влияние гемопоэтических клеток фетального происхождения на иммунологические и биохимические показатели иммунорезистентности у больных сахарным диабетом I типа. Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики, профилактики и лечения профессионально обусловленных заболеваний», Сочи, 14 – 15 октября 2013г. Сочи. 2013:163 – 4.

## REFERENCES

1. Vyalov SL. Sovremennyye predstavleniya o regulyatsii processa zzhivleniya ran (obzor literatury) Annaly plast. rekonstruktiv. i estet. hirurgii. 1999; 1: 49-56. [In Russ.]
2. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González B, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. International journal of molecular sciences. 2011; 12 (5): 3117–32. doi: 10.3390/ijms12053117.
3. Otero-Vicas M, Falanga V. Mesenchymal Stem Cells in Chronic Wounds: The Spectrum from Basic to Advanced Therapy. Adv Wound Care (New Rochelle). 2016; 5(4):149-63. doi:10.1089/wound.2015.0627.
4. Xu Z, Zeng S, Gong Z. Exosome-based immunotherapy: a promising approach for cancer treatment. Mol Cancer. 2020;19:160. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01278-3>.
5. Zhang J, Chen Ch, Hu B, Niu X, Zhang G, Zhang Ch, Li Q, Wang Y. Exosomes derived from human endothelial progenitor cells accelerate cutaneous wound healing by promoting angiogenesis through Erk1/2 signaling. Int J Biol Sciences. 2016; 12(12): 1472–87. doi: 10.7150/ijbs.15514
6. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. J Biochem. 2013;153(1):13-9. doi: 10.1093/jb/mvs136.
7. Stojadinovic OKA, Golinko M, Tomic-Canic M, Brem H. A novel, non-angiogenic mechanism of VEGF: stimulation of keratinocyte and fibroblast migration. Wound Repair and Regeneration. 2007;15:A30.
8. Mayanskij AN, Mayanskij DN. Oчерki o nejtrofилe i mak-rofage. Novosibirsk: Nauka, Sibirskoe otdelenie. 1983; 254. [In Russ.]
9. Klimova OM, Korobov AM, Bychenko KO, Lavinska OV, Kordon TI, Drozdova LA. Vplyv nyzkointensyvnoho vyprominiuvannia optychnoho diapazonu spektra ( $\lambda = 660$  nm) na pokaznyky imunorezystentnosti u tvaryn z eksperymentalnym perytonitom // Visnyk Kyivskoho natsionalnoho unyvesytetu im.T.Shevchenka. Biolohiia. 2020;82(3):35-42. [In Ukr.]
10. Klimova OM, Buchneva OV, Merezhko OS, Kalashnykova YuV. Prohnoz rezultatu khirurhichnoho likuvannia khvorykh z anevryzmoyu aorty za zminoyu kontsentratsii faktora rostu endoteliiu sudyn (VEGF) ta imunolohichnykh faktoriv. Kharkivska khirurhichna shkola. 2020;1(100):127 – 33. <https://doi.org/10.37699/2308-7005.1.2020.21>. [In Russ.]
11. Klimova EM, Votyakova IA, Bozhkov AI, Kolokolova OB, Drozdova LA. Vliyanie gemopoeticheskikh kletok fetal'nogo proiskhozhdeniya na immunologicheskie i biokhimicheskie pokazateli imunorezistentnosti u bol'nykh sahnarym diabetom I tipa, Materialy Vserossiyskaya nauchno-prakticheskaya konferenciya «Aktual'nye problemy diagnostiki, profilaktiki i lecheniya professional'no obuslovlennykh zabolevanij», Sochi, 14 – 15 oktyabrya 2013. – Sochi. 2013:163 – 4. [In Russ.]

МЕХАНІЗМИ  
ІММУНОКОРРИ-  
ГІРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ  
ФОТОДИНАМІЧЕСКОЙ  
ТЕРАПІИ І ЕКЗОСОМ  
МЕЗЕНХІМАЛЬНЫХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК  
У БОЛЬНЫХ  
С ХРОНИЧЕСКИМИ  
РАНАМИ НИЖНИХ  
КОНЕЧНОСТЕЙ  
РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

*Е. М. Климова,  
Ю. В. Иванова,  
К. А. Быченко,  
О. С. Мережко,  
В. А. Прасол,  
Г. С. Лобынцева*

**Резюме.** *Введение.* Лечение хронических ран нижних конечностей на сегодняшний день связано с длительным применением антибиотикотерапии, которая часто усугубляет течение раневого процесса. В связи с этим ведется поиск новых методов лечения. В качестве физического метода использовали низкоинтенсивное световое воздействие различных длин волн фотодинамической терапии (ФДТ) с использованием фотосенсибилизатора Димегин, а в качестве биологического метода – мультипотентные мезенхимально-стромальные клетки и их экзометаболиты в виде экзосом.

*Целью исследования* было изучение изменений барьерной функции кислородонезависимого и кислородозависимого фагоцитоза и сывороточного содержания фактора роста сосудов (VEGF) у больных с хроническими ранами нижних конечностей до и после применения комплексного светового воздействия и экзосом.

*Материалы и методы.* Активность фагоцитоза нейтрофилов исследовали с помощью оценки хемотаксиса, адгезии и эндцитоза и путем определения активных форм кислорода (ROS) с применением световой и конфокальной микроскопии. Концентрацию VEGF определяли методом ИФА.

*Результаты.* после использования ФДТ и Димегина с применением красного света ( $\lambda=660$  нм) наблюдали активацию кислородонезависимого и кислородозависимого фагоцитоза, а также увеличение содержания фактора роста сосудов VEGF у пациентов с хроническими ранами нижних конечностей. После применения зеленого света ( $\lambda=530$  нм) и аппликаций суспензии экзосом наблюдали нормализацию иммунных и метаболических процессов, что приводило к ускорению регенерации.

*Выводы.* После проведения комплексной низкоинтенсивной световой терапии и экзосом удалось полностью очистить раны от некроза и достичь заживления в короткие сроки.

**Ключевые слова:** *фотодинамическая терапия, экзосомы, раны, фагоцитоз, VEGF.*



MECHANISMS OF  
IMMUNOCORRECTIVE  
ACTION OF  
PHOTODYNAMIC  
THERAPY AND EXOSOMES  
OF MESENCHYMAL STEM  
CELLS IN PATIENTS WITH  
CHRONIC WOUNDS  
OF THE LOWER  
EXTREMITIES  
OF DIFFERENT GENESIS

*O. M. Klimova,  
Yu. V. Ivanova,  
K. A. Bychenko,  
O. S. Merezko,  
V. O. Prasol,  
G. S. Lobintseva*

**Summary. Introduction.** The treatment of the lower extremities today requires long-term use of antibiotic therapy, which aggravates the course of the wound process. In this regard, the search for new methods of treatment is underway. Low-intensity light exposure of various wavelengths of photodynamic therapy with photosensitizer Dimegin was used as a physical method, and multipotent mesenchymal-stromal cells and their exometabolites in exosomes form were used as a biological method.

*The aim* was to study the change of barrier function of oxygen-independent and oxygen-dependent phagocytosis and serum levels of vascular growth factor (VEGF) in patients with chronic wounds of the lower extremities before and after the application of complex light exposure and exosomes.

*Materials and methods.* Phagocytosis activity of neutrophils was investigated by assessing chemotaxis, adhesion and endocytosis and by determining reactive oxygen species (ROS) in oxygen-dependent phagocytosis using light and confocal microscopy. VEGF concentration was determined by ELISA.

*Results:* after photodynamic therapy using with red light ( $\lambda=660\text{nm}$ ), activation of oxygen-independent and oxygen-dependent phagocytosis was observed, as well as an increase in the synthesis of vascular growth factor in patients with chronic wounds of the lower extremities. After the application of green light ( $\lambda=530\text{nm}$ ) and the application of exosomes, the normalization of immune processes was observed, which led to the acceleration of regenerative processes in the wound.

*Conclusions.* Thus, after carrying out complex low-intensity light therapy and exosomes, it was possible to completely clear the wounds from necrosis in a short time.

**Key words:** *photodynamic therapy, exosomes, wounds, phagocytosis, VEGF.*