

вигляд якого характеризується гіпокальціємією, гіпофосфатемією, зниженням концентрації 25OHD в сировотці крові і вираженою демінералізацією костної тканини. Синтезовані піразолсодержащіє бисфосфонати з різною ефективністю інгібували процес демінералізації (резорбції) костної тканини і улучшали мінеральний обмін у крыс з алиментарною формою остеопороза. Дієствие вибраних соединений приводило к росту концентрації кальція, неорганического фосфата і зниженню активності щелочної фосфатази і її ізоензимов в сировотці крові. Також підвищувалась зольність, содержание кальція і фосфора в золе большеберцовой кости, улучшались її остеометрические показателі (длина і товщина проксимального епіметафіза). Но более ефективним в корекції порушень мінерального обміну при остеопорозі оказалось сочетание піразолсодержащих бисфосфонатов і вітаміна D₃, который нормалізує рівень 25OHD в сировотці крові і забезпечує синтез біологічески активних, гідроксилізованих производних форм холекальциферола. Согласно результатам работы, самым перспективним для дальнейших исследований является изучение совместного действия вітаміна D₃ с бисфосфонатом ISP-30, как веществом с наиболее высокой біологической эффективностью в регулировании процесса ремоделирования костной ткани, ингибировании резорбции і интенсификации остеогенеза.

Ключевые слова: піразолсодержащіє бисфосфонати, алиментарный остеопороз, мінеральний обмін, вітамін D₃, 25OHD.

M. Veliky, Dr Sci., D. Labudzynski, PhD, O. Lisakovska, PhD, E. Pasichna, Sen. Engin.
Palladin Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine,
S. Ivonin, Dr Sci.
Institute of Organic Chemistry of the NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

COACTION EFFECT OF NEW PYRAZOLE-CONTAINING BISPHOSPHONATES AND VITAMIN D₃ IN EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS

Bisphosphonates remain one of the most effective drugs to treat diseases of the musculoskeletal system. Among a wide range of possible options, the methods of bioinformatic analysis were developed, selected and synthesized analogs of bisphosphonates, the radical of which were selected pyrazole derivatives. The development of new advanced bisphosphonate analogues has broad prospects for medical application. The study is devoted to the investigation of the combined action of synthesized nitrogen-containing bisphosphonates (pyrazole-containing analogues) and vitamin D₃ in the correction of mineral metabolism disturbances in osteoporosis. The work was performed on a rat model of alimentary osteoporosis, which was characterized by the development of hypocalcemia, hypophosphatemia, decreased serum 25OHD concentration and severe bone tissue demineralization. New pyrazole-containing bisphosphonates inhibited the process of bone demineralization (resorption) and improved mineral metabolism in rats with alimentary osteoporosis with varying efficiency. The action of the investigated substances resulted in an increase in the concentration of calcium, inorganic phosphate and a decrease in the activity of alkaline phosphatase and its isoenzymes in the serum. The ash content, calcium and phosphorus level in the ash of the tibia was increased as well, along with improving osteometric characteristics of the tibia (length and thickness of the proximal epimetaphysis). The combination of pyrazole-containing bisphosphonates and vitamin D₃, which normalizes the concentration of 25OHD in the serum and provides the synthesis of biologically active, hydroxylated form of cholecalciferol, has been more effective in the correction of mineral metabolism impairments in rats with alimentary osteoporosis. According to the experimental results, the combination of vitamin D₃ with bisphosphonate ISP-30, as a substance with the highest biological efficiency in regulating bone remodeling, enhancing osteogenesis and inhibition of resorption, is the most promising for further research.

Keywords: pyrazole-containing bisphosphonates, alimentary osteoporosis, mineral metabolism, vitamin D₃, 25OHD.

УДК 535.212-57.083

DOI 10.17721/1728_2748.2020.82.35-41

^{1,2} О. Клімова, д-р біол. наук, ² А. Коробов, канд. фіз.-мат. наук, ^{1,2} К. Биченко, мол. наук. співроб.,
^{1,2} О. Лавінська, канд. біол. наук, ¹ Т. Кордон, канд. біол. наук, ¹ Л. Дроздова, канд. біол. наук
¹ ДУ "Інститут загальної та невідкладної хірургії імені В. Т. Зайцева НАМНУ", Харків, Україна
² Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, Харків, Україна

ВПЛИВ НИЗЬКОІНТЕНСИВНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ ОПТИЧНОГО ДІАПАЗОНУ СПЕКТРА (λ=630–660 НМ) НА ПОКАЗНИКИ ІМУНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ТВАРИН 3 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ПЕРИТОНИТОМ

Лікування запальних і септичних станів представляє серйозну проблему через існуючу стійкість до антибіотиків. Необхідні нові методи лікування з використанням біологічних і фізичних факторів, що впливають на перебіг запальних реакцій під час хронічних процесів. Важливим є досягнення розуміння механізмів взаємодії світлових фотонів із клітинними акцепторами, які забезпечують реактивність і резистентність.

Мета – оцінити вплив низькоінтенсивного світла червоного спектра (λ = 630–660 нм) на перебіг запального процесу у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом. Було виділено 3 групи: А – інтактні тварини; Б – тварини з перитонітом, викликаним внутрішньочеревинним уведенням ЛПС; В – тварини з ЛПС-індукованим перитонітом після багаторазового впливу червоного світла. Експерименти проводили світлодіодними матрицями Коробов А. В. – Коробов В. В. "Барва-Флекс/24ФМ", які випромінюють у червоній області спектра. Використовували методи світлової мікроскопії (оцінювання бар'єрної функції нейтрофілів у киснегенезисному фагоцитозі, визначення ступеня лімфоцитотоксичності) та спектрофотометрії (визначення концентрації циркулюючих імунних комплексів).

У тварин після індукції перитоніту (група В) спостерігали пригнічення фагоцитозу, яке проявлялося у зниженні адгезії й ендоцитозу антигенів нейтрофілами порівняно з контролем. Використання світлової дії червоного спектра (група С) активувало фагоцитарні клітини і зменшувало ступінь лімфоцитотоксичності і концентрацію циркулюючих імунних комплексів на різних стадіях запального процесу. Отже, дія червоного світла сприяла нормалізації імунорезистентності у тварин, тим самим знижуючи антигенне навантаження за рахунок активації інфільтраційної й ексудативної стадії запального процесу й індуції регенеративних процесів після повторного опромінення в кінці експерименту.

Ключові слова: запалення, низькоінтенсивне випромінювання, фагоцитоз, цитотоксичність.

Вступ. Нині в багатьох медичних установах із терапевтичною метою застосовують видиме низькоінтенсивне червоне світло [1–3]. Дослідження щодо його впливу свідчать про здатність цього типу випромінювання змінювати функціональний стан тканин та органів, а також впливати на перебіг запальних процесів у організмі [4]. Біологічним компонентом світлової терапії є його здатність впливати на функціональну активність різних імунокомпетентних клітин в осередках запального про-

цесу [5]. За потрапляння світла в клітини-рецептори відбувається складна внутрішньоклітинна реакція, що приводить до активації клітин імунної системи, які різною мірою реагують на різних стадіях запальної реакції [6].

Низькоінтенсивна світлова терапія (НІСТ) відома вже близько половини сторіччя, проте досі не отримала широкого поширення через недостатню з'ясованість молекулярних і клітинних механізмів дії. Відомо, що НІСТ із використанням світлодіодів і лазерів, дає екві-

валентні результати, зокрема, для лікування болю та запальних процесів, а також у стимуляції регенерації тканин мішеней [7]. У серії робіт Н. О. Сибірної й інших авторів продемонстровано вплив низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання на функціональну активність імункомпетентних клітин щурів за експериментального цукрового діабету [8–11]. Для розуміння механізмів взаємодії фотонів світла із клітинами, що забезпечують реактивність і резистентність організму, актуальним є вивчення світлового впливу з урахуванням стадійності запального процесу – фаз альтерації, інфільтрації, проліферації, які характеризуються певним станом тканини і клітин у зоні запалення [6].

Першими імунними клітинами в захисті організму від зовнішніх і внутрішніх патогенних факторів є фагоцитуючі клітини, які спрямовані на знищення флогогенного фактора в організмі й активуються на всіх стадіях запального процесу [6, 12]. Первинна стадія запалення – альтерація, яка обумовлена дією шкідливого чинника на тканину зі зміною в ній обміну речовин, структури та функцій. Альтерація ініціює системи гемостазу, що призводить до розвитку ексудативно-судинної реакції. Вплив мікробного антигену сприяє активації фагоцитуючих нейтрофілів, які володіють потужним цитотоксичним потенціалом, винятковою реактивністю і високою мобілізаційною готовністю на другій стадії інфільтрації, і які є першою лінією протиінфекційного захисту при запальних процесах, відіграючи провідну роль у запуску запалення [13]. Порушення фагоцитарних функцій при запальних процесах призводить до ослаблення всієї системи захисних механізмів [14]. Процес ексудації має двояке біологічне значення: адаптивне, яке полягає у фіксації у вогнищі запалення флогогену і створенні умов його інактивації й елімінації, і патогенне, тобто можливе розповсюдження запального процесу на сусідні тканини й утворення вогнищ деструкції. Важливим завершальним механізмом розвитку запальної реакції є заключна стадія – проліферація, за якої збільшується кількість стромальних і паренхіматозних клітин з утворенням міжклітинної речовини у вогнищі запалення, тим самим спрямовуючи ці процеси на регенерацію тканини [15]. Тривалість і виразність усіх фаз запального процесу багато в чому залежить від характеру пошкодження, етіологічних чинників, виразності окремих стадій запалення і розвитку імунodefіцитного стану організму. На сьогоднішній день механізми світлового впливу на різні стадії запалення до кінця не вивчені і викликають інтерес; малочисельними є дослідження дії низькоінтенсивного світлового впливу на різні стадії запальної реакції на моделях експериментальних тварин.

Метою роботи було оцінювання низькоінтенсивного світлового впливу ($\lambda = 630\text{--}660$ нм у червоному діапазоні спектра) на перебіг запальної реакції і процеси регенерації в експериментальних тварин з ЛПС-індукованим перитонітом.

Матеріали та методи. Експерименти проводили на 3-місячних щурах-самцях масою 190–220 г ($n = 180$), яких утримували у стандартних умовах віварію. Дослідження проводили відповідно до положення Європейської конвенції "Про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986 г.). Усіх тварин було розділено на групи ($n = 60$ у кожній групі): група А – інтактні тварини (ІТ); група В – тварини з індукованим ліпополісахаридом (ЛПС) перитонітом (ЛПС-ІП), група С – тварини з індукованим ЛПС-перитонітом

після світлової дії (червоне світло $\lambda = 630\text{--}660$ нм) (ЛПС-ІП-світло). Гостре запалення викликали за допомогою внутрішньочеревинного введення ліпополісахариду (ЛПС), отриманого з *Escherichiacoli* штаму 0111:B4 ("Sigma", США) з розрахунку 100 мкг/кг маси тіла в 1 мл ізотонічного розчину NaCl.

Світлове опромінення червоним світлом ($\lambda = 630\text{--}660$ нм) зони запалення (5 хв на відстані 2 см від стінки очеревини) проводили відразу після виклику запалення, і далі щоденно протягом 23 днів. Для опромінення зони патології використовували світлодіодні матриці Коробова А. – Коробова В. "Барва-Флекс/24ФМ", які випромінюють у червоній ($\lambda = 630\text{--}660$ нм) області спектра. Інтегральна потужність випромінювання 24 світлодіодів становила 120 мВт, щільність потужності на опромінюваній поверхні – 2,5 мВт/см². Витримували 5-хвилинний інтервал для досягнення ідентичності дії у всіх тварин. Відповідно до послідовності й інтервалу тварини виводилися з експерименту: через 6 год після виклику запалення та надалі через 1, 2, 3, 7, 10, 13, 17, 20 і 23 доби.

У роботі вивчали активність нейтрофілів у кисне залежному фагоцитозі методом світлової мікроскопії (Olympus BX53). Про активність фагоцитуючих нейтрофілів судили за хемотаксисом, адгезією і ендцитозом антигену. Хемотаксис і адгезію фагоцитуючих нейтрофілів оцінювали за показниками фагоцитарного індексу (ФІ), що характеризує кількість нейтрофілів, які беруть участь у процесі фагоцитозу, виражених у відсотках від загальної кількості нейтрофілів крові, фагоцитарного числа (ФЧ), що відображає середню кількість клітин *Saccharomyces cerevisiae*, поглинутих одним нейтрофілом, і виражається в умовних одиницях, й індексу завершення фагоцитозу (ІЗФ), який відображає травну здатність нейтрофілів, який розраховували за співвідношенням фагоцитарного числа через 30 хв до фагоцитарного числа через 120 хв [16].

Ступінь лімфоцитотоксичності визначали за методом Терасакіза цитотоксичним ефектом компонентів автосироватки на автолімфоцити за присутності екзогенного комплексу. Про сироваткову лімфоцитотоксичність судили за ступенем деструкції клітинних мембран лімфоцитів після їх інкубації з автосироваткою за присутності білків комплексу. Реакцію здійснювали з використанням виділених у градієнті щільності 1,077 г/см³ фікол-верографінілімфоцитів периферичної крові об'ємом 100 мкл (клітиндо 10⁶) і сироватки крові об'ємом 100 мкл із додаванням до інкубованої суспензії 50 мкл комплексу гвінейської свинки для отримання взаємодіючих компонентів антиген + антитіло + комплекс (АГ + АТ + К). Оцінювання реакції проводили після фарбування препарату через 2 год за співвідношенням клітин із зруйнованою інтенсивно забарвленою мембраною (мертві клітини) і живих нефарбованих клітин. Підрахунок проводили методом світлової мікроскопії (Olympus BX53) при збільшенні $\times 400$ [17].

Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), які представляють собою асоціацію між антигеном, антитілами і комплексом, оцінювали спектрофотометрично (СФ-46) після інкубації зразків сироватки в боратному буфері і поліетиленгліколі за кімнатної температури. Оптичну щільність утвореного преципітату вимірювали за довжини хвилі $\lambda = 450$ нм проти боратного буфера [18].

Отримані результати аналізували статистично із застосуванням t -критерію Стюдента ($p \leq 0,05$). Використовували програму Statistica 6.0. Дані представляли у вигляді середнього значення (M) і стандартної помилки середнього арифметичного (m).

Результати й обговорення. У експериментальних тварин з індукованим перитонітом (група В) у ранні терміни після введення ЛПС спостерігали зміну фізіологічних показників: підвищення температури тіла в середньому на 1,5 °С, зниження реакцій поведінки, втрату

апетиту. Вивчення фагоцитарної ланки імунітету у тварин після індукції перитоніту введенням ЛПС і в динаміці після світлової дії (червоне світло, $\lambda = 630\text{--}660\text{ нм}$) показало різноспрямовані зміни показників киснедозалежного фагоцитозу (рис. 1).

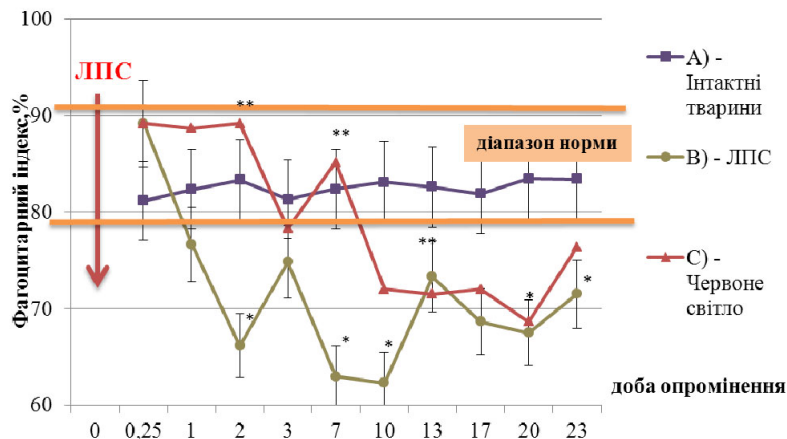


Рис. 1. Зміна фагоцитарного індексу (ФІ) у тварин: референтні значення – діапазон норми, А – інтактні тварини (ІТ), В – тварини з індукованим ЛПС перитонітом (ЛПС-ІП), С – тварини з індукованим ЛПС-перитонітом, яких багаторазово опромінювали червоним світлом $\lambda = 630\text{--}660\text{ нм}$ (ЛПС-ІП-світло). Кожна експериментальна точка є середнім значенням ФІ, отриманим на 6 щурах ($M \pm m$, $n = 6$)

* – достовірні відмінності між показниками у групах А (ІТ) та В (ЛПС-ІП);

** – відмінності між показниками в групі тварин В (ЛПС-ІП) і С (ЛПС-ІП-світло); $p \leq 0,05$.

На тлі запальної реакції у тварин з індукованим перитонітом у групі В (ЛПС-ІП) виявили пригнічення бар'єрної функції вродженого імунітету: спостерігали зниження адгезії й ендоцитозу антигенів фагоцитуючими нейтрофілами, про що судили за показниками фагоцитарного числа (ФЧ), фагоцитарного індексу (ФІ) й індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ), які були знижені (на 10 % відповідно) порівняно з референтними значеннями. Після одноразового введення ЛПС уже з першої доби спостерігали незначне зниження ФІ до $(76,7 \pm 3,3) \%$ при $(83,0 \pm 2,1) \%$ у інтактних тварин. У період з 7-ї до 10-ї доби цей показник знизився до мінімальних значень $(62,3 \pm 2,1) \%$, і лише на 13-ту добу активність нейтрофілів стала підвищуватися. До 23-ї доби ФІ зріс до $(71,5 \pm 10,3) \%$. Після дії червоного світла на тлі одноразового введення ЛПС ФІ з 1-ї до

7-ї доби перебував у межах референтних значень, і був вищим щодо інтактних тварин. З 10-ї до 20-ї доби показник ФІ знизився на 10 %, але залишався нижче значень інтактних тварин. На 23-тю добу спостерігали підвищення цього показника до $(76,3 \pm 5,3) \%$ (рис. 1).

Фагоцитарне число, яке відображає середню кількість клітин *Saccharomyces cerevisiae*, поглинутих одним нейтрофілом, у тварин після опромінення червоним світлом ($\lambda = 630\text{--}660\text{ нм}$) на фоні введення ЛПС було зниженим на 2-гу добу до $(2,7 \pm 0,3)$ у. од. На 7-му добу експерименту цей показник зростає більш ніж удвічі, і з 7-ї по 23-тю добу залишався вище референтних значень і значень групи тварин з індукованим перитонітом без світлового впливу (група В, ЛПС-ІП) (рис. 2).

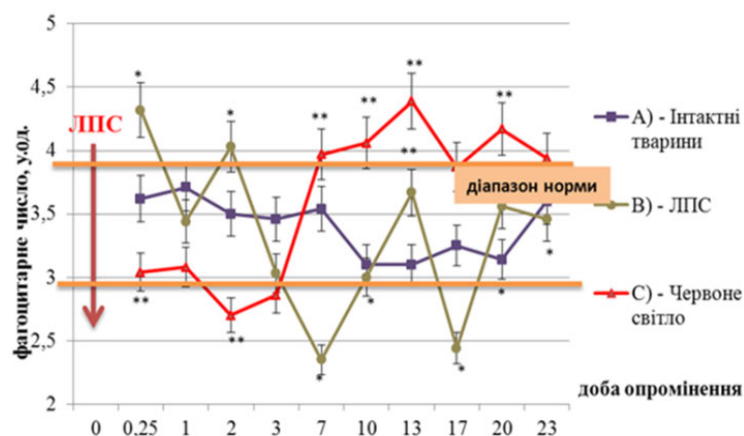


Рис. 2. Зміна фагоцитарного числа (ФЧ) у тварин: референтні значення – діапазон норми, А – інтактні тварини (ІТ), В – тварини з індукованим ЛПС перитонітом (ЛПС-ІП), С – тварини з індукованим перитонітом, яких багаторазово опромінювали червоним світлом $\lambda = 630\text{--}660\text{ нм}$ (ЛПС-ІП-світло). Кожна експериментальна точка є середнім значенням ФЧ, отриманим на 6 щурах ($M \pm m$, $n = 6$)

* – достовірні відмінності між показниками у групах А (ІТ) та В (ЛПС-ІП);

** – відмінності між показниками у групі тварин В (ЛПС-ІП) і С (ЛПС-ІП-світло); $p \leq 0,05$.

Індекс завершення фагоцитозу, який відображає травну здатність нейтрофілів у групі тварин з індукованим ЛПС-перитонітом (група В, ЛПС-ІП), починаючи з 2-ї по 7-му добу, знижувався відносно інтактних тварин. Мінімальне його значення спостерігали на

7-му добу ($0,83 \pm 0,02$) у. од. На 10-ту добу травна здатність нейтрофілів зросла до ($1,05 \pm 0,2$) у. од. З 10-ї до 23-ї доби рівень ІЗФ знижувався щодо інтактних тварин у середньому на 10 %.

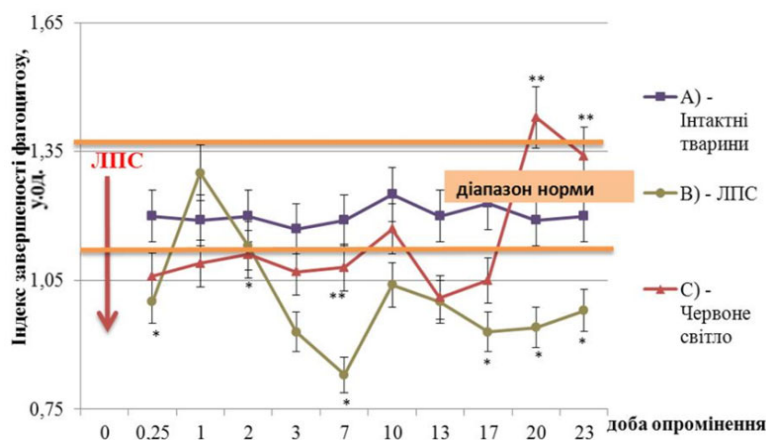


Рис. 3. Зміна індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ) у тварин: референтні значення – діапазон норми, А – інтактні тварини (ІТ), В – тварини з індукованим ЛПС перитонітом (ЛПС-ІП), С – тварини з індукованим ЛПС-перитонітом, яких багаторазово опромінювали червоним світлом $\lambda = 630-660$ нм (ЛПС-ІП-світло).
Кожна експериментальна точка є середнім значенням ІЗФ, отриманим на 6 щурах ($M \pm m$, $n = 6$)

* – достовірні відмінності між показниками у групах А (ІТ) та В (ЛПС-ІП);

** – відмінності між показниками у групі тварин В (ЛПС-ІП) і С (ЛПС-ІП-світло); $p \leq 0,05$.

Після опромінення світлом червоного діапазону спектра у групі С (ЛПС-ІП-світло) на 7-му добу спостерігали підвищення травної здатності фагоцитуючих клітин порівняно з показниками у групі інтактних тварин (група А). З 17-ї по 20-му добу виявили різке зростання ІЗФ на 25 % до нормальних значень (рис. 3). Таким чином, після опромінення червоним світлом ($\lambda = 630-660$ нм) виявили позитивну стимуляцію фагоцитозу, що характеризувалася значною активацією адгезивних властивостей, поглинаючої здатності нейтрофілів й індексу завершення фагоцитозу і, тим самим, стимуляцію регенеративних процесів.

Рівень лімфоцитотоксичності (ЛЦТ), який характеризує ступінь запальної реакції, оцінювали за методом Терасакі. У тварин групи В (ЛПС-ІП) виявили достовірне збільшення ступеня ЛЦТ з 2-ї по 10-ту добу в середньому на 53 %, а з 17-ї по 23-тю добу – у 2,5 рази порівняно з інтактними тваринами (група А). Опромінення

тварин червоним світлом ($\lambda = 630-660$ нм) у групі С (ЛПС-ІП-світло) викликало активацію утворення і накопичення цитотоксичних факторів сироватки крові вже через 6 год після індукції перитоніту введенням ЛПС. Вочевидь, такі зміни відбувалися за рахунок збільшення й накопичення кількості факторів опсонізації антигенів та утворення циркулюючих імунних комплексів, що утворюються в результаті розвитку першої фази запального процесу – альтерації – в черевній порожнині у тварин із перитонітом. На 1-шу добу спостерігали позитивну максимальну активацію ЛЦТ до 73 %, однак до 2-гої доби відзначали стрімке зниження на 40 % ступеня ЛЦТ. Подальше збільшення рівня ЛЦТ з 10 до 40 % спостерігали із 7-ї до 17-ї доби. На 23-тю добу на тлі нівелювання запального процесу в черевній порожнині в експериментальних тварин виявили різке зниження цитотоксичних чинників до нижніх меж норми (рис. 4).

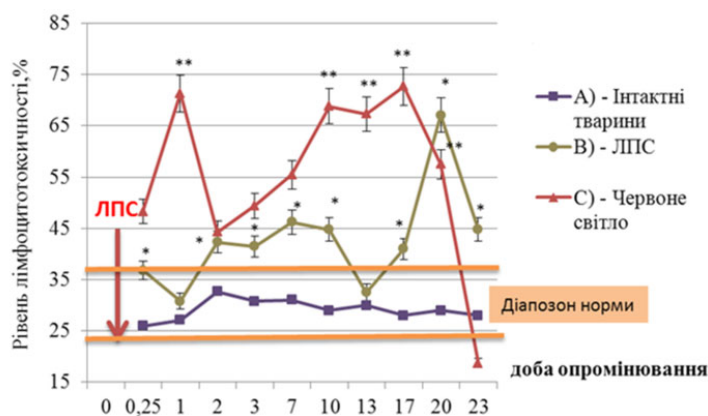


Рис. 4. Кількість клітин зі зруйнованою мембраною після впливу аутоантитіл.
Динаміка розвитку запальної реакції в тесті лімфоцитотоксичності (ЛЦТ) тварин: референтні значення – діапазон норми, А – інтактні тварини (ІТ), В – тварини з індукованим ЛПС перитонітом (ЛПС-ІП), С – тварини з індукованим ЛПС-перитонітом, яких багаторазово опромінювали червоним світлом $\lambda = 630-660$ нм (ЛПС-ІП-світло).
Кожна експериментальна точка є середнім значенням показника ЛЦТ, отриманим на 6 щурах ($M \pm m$, $n = 6$)

* – достовірні відмінності між показниками у групах А (ІЖ) та В (ЛПС-ІП);

** – відмінності між показниками у групі тварин В (ЛПС-ІП) і С (ЛПС-ІП-світло); $p \leq 0,05$.

Концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), що утворюються при взаємодії антитіл і антигенів і комплексу (АГ+АТ+К), які стимулюють імунну відповідь, у інтактних тварин складала $(69,25 \pm 8,6)$ од. Е при референтних значеннях $(65,2 \pm 12,0)$ од. Е. У нормі ЦІК швидко елімінуються із крові завдяки фагоцитозу. У тварин групи В з індукованим неінфекційним перитонітом (ЛПС-ІП) концентрація ЦІК підвищувалася з першої доби дослідження і залишалася високою до 20-ї доби (табл. 1). Опромінення тварин червоним світлом після введення ЛПС (група С, ЛПС-ІП-світло) призводило до коливань концентрації ЦІК, починаючи з 1-ї доби $(117,1 \pm 11,8)$ од. Е, після чого до 7-ї доби спостерігали зниження концентрації ЦІК в середньому на 30 %. На 10-ту добу виявили 2-й пік концентрації ЦІК $(129 \pm 13,6)$ од. Е, потім до 13-ї доби повторне зниження показника на 50 %. До 17-ї доби відзначали 3-й пік концентрації ЦІК $(116,5 \pm 19,4)$ од. Е, а максимальне значення цього показника виявили на 23-тю добу $(166,8 \pm 22,8)$ од. Е (табл. 1).

Отже, вплив червоного світла ($\lambda = 630\text{--}660$ нм) на фази запального процесу призводив до стимуляції показників кисненезалежного фагоцитозу, ступеня

лімфоцитотоксичності і концентрації циркулюючих імунних комплексів [26].

Вплив низькоінтенсивного світла має здатність інтегрувати деякі внутрішньоклітинні механізми на різних стадіях запальної реакції. Дія фотонів світла має значення, оскільки змінює енергетичний клітинний потенціал і впливає на механізми клітинних взаємодій [19]. Механізми світлової дії на живі об'єкти базуються на законах: Bunsen-Roscoe – фотохімічний ефект визначається дозою випромінювання, Stark-Einstein – одна молекула речовини поглинає один квант світла, Grotthus-Drawper – випромінювання має хвилю, яка відповідає довжині, оскільки поглинене світло здатне ініціювати її протікання. Спільна дія світла і кисню викликає фототоксичний ефект, який вперше описали 1900 р. О. Рааб і Х. фон Таппайнер [20]. Збуджені світлом молекули вступають в окисно-відновні реакції з перенесенням електронів і утворенням проміжних радикальних продуктів, які потім взаємодіють із киснем, переводячи його в синглетну форму й окиснюють біомолекули [21].

Таблиця 1. Концентрація циркулюючих імунних комплексів (ЦІК, од. Е) у тварин з індукованим перитонітом (група В, ЛПС) і тварин з індукованим перитонітом після опромінення червоним світлом, $\lambda = 630\text{--}660$ нм (ЛПС-ІП-світло) ($M \pm m$)

Терміни виведення тварин з досліджу, дів	n	Концентрація ЦІК у тварин з індукованим перитонітом у різні терміни після введення ЛПС (група В)	Концентрація ЦІК у тварин з індукованим перитонітом групи С після впливу червоного світла ($\lambda = 660$ нм) у різні терміни (група С)
0,25	6	$35,7 \pm 13,7^*$	$68 \pm 6,3$
1	6	$65,0 \pm 20$	$117,1 \pm 11,8^*$
2	6	$42,8 \pm 6,8^*$	$70,3 \pm 10,6$
3	6	$70,5 \pm 9,1$	$68,5 \pm 6,3$
7	6	$73,0 \pm 13$	$86,3 \pm 5,9$
10	6	$77,0 \pm 10^*$	$129 \pm 13,6^*$
13	6	$77,8 \pm 12,8^*$	$60,5 \pm 5,4$
17	6	$85,7 \pm 24,3^*$	$116,5 \pm 19,4^*$
20	6	$87,1 \pm 17^*$	$88,5 \pm 7,9$
23	6	$69,1 \pm 12$	$166,8 \pm 22,8^*$

Примітки: концентрація ЦІК у групі А інтактних тварин складала $(69,25 \pm 8,6)$ од. Е;

* – відмінності достовірні порівняно з групою інтактних тварин, $p \leq 0,05$.

У багатьох експериментальних роботах було показано, що вплив світла змінює біохімічний склад крові, покращує роботу органів, стимулює імунну систему, має протимікробну дію [2, 20, 22]. Внутрішньоклітинний світловий вплив стимулює синтез АТФ, регулює метаболізм, покращує функції зовнішнього дихання і транспорту кисню у клітинах [6, 14]. А. Акопов та інші вчені показали, що червоне світло з довжиною хвилі 660–740 нм здатне проникати як у поверхневі, так і в більш глибокі шари тканини [23]. Іншими авторами показано, що червоне світло з довжиною хвилі 460–620 нм підвищує біологічну активність ферментів [25]. Зміна активності молекул призводить до вироблення цитокінів, що впливають на тонус судин, модулюють каскад арахідонової кислоти, перекисне окиснення ліпідів, і змінює характер імунних реакцій [3, 25].

Оскільки імунні процеси представляють собою зміну періодів активації і зниження функції імунних факторів при розвитку запального процесу, то індукація фаз інфільтрації і ексудації за рахунок ЛПС відбувалася максимально швидко, відразу через 6 год після введення антигену, на 3–7-му добу розвитку запального процесу. Упродовж перших 13 дів розвитку індукованого ЛПС-перитоніту спостерігали нівелювання за-

пальної реакції за рахунок активації кисненезалежного фагоцитозу нейтрофілів, які ендоцитують цитотоксичні антигени. Завершення стадій запального процесу в експериментальних тварин з індукованим перитонітом узгоджується з отриманими результатами щодо вивчення активності фагоцитарної ланки імунітету (підвищення індексу завершеності фагоцитозу), лімфоцитотоксичності (зниження до кінця експерименту) і циркулюючих імунних комплексів (нормалізація концентрації) після дії червоного світла ($\lambda = 630\text{--}660$ нм) у хворих із хронічними тропічними виразками нижніх кінцівок, яке сприяло активації стадії інфільтрації й ексудації запального процесу [26].

Підвищений вміст ЦІК у сироватці крові вказує на їх накопичення у тканинах із наступною індуцією запального процесу. Зміна концентрації ЦІК у сироватці крові може бути наслідком порушення антиген-презентуючої функції фагоцитуючих клітин, оскільки відомо, що імунні комплекси середньої молекулярної маси важко елімінують з організму, особливо за зниження фагоцитарної активності імунної системи, і можуть активувати систему комплементу за альтернативним шляхом, що сприяє підтримці запального процесу.

Отже, яким чином дія низькоінтенсивного випромінювання червоного діапазону спектра зумовлює описані вище зміни? Ми вважаємо, що дія червоного спектра з довжиною хвилі ($\lambda = 630\text{--}660\text{ нм}$) стимулює у фагоцитах енергетичні процеси. Адсорбція світла в мітохондріях призводить до утворення АТФ, Ca^{2+} , оксиду азоту NO та активних форм кисню – іонів, вільних радикалів, перекису водню, що підсилює бактерицидні властивості фагоцитуючих клітин і приводить до модуляції метаболічних сигнальних шляхів. Таким чином, отримані дані свідчать про здатність низькоінтенсивного світла червоного діапазону активувати складні імунні реакції, які відіграють важливу роль у запальних процесах [15, 26].

Висновки. Дія червоного світла ($\lambda = 630\text{--}660\text{ нм}$) сприяла активації стадій альтерації й інфільтрації запального процесу на тлі експериментального перитоніту за рахунок підвищення бар'єрної функції кисне-незалежного фагоцитозу. Після впливу червоного світла до 20-ї доби спостерігали активацію фагоцитозу, опсонізуючу дію автоантитіл, нормалізацію рівня лімфоцитотоксичності, що відповідає показникам у інтактних тварин. На 23-тю добу спостерігали активацію утворення імунних комплексів (антиген + антитіло + комплемент), що сприяло опсонізації антигенів. Таким чином, застосування низькоінтенсивного світлового впливу червоного діапазону спектра у тварин з ЛПС-індукованим перитонітом чинить позитивний ефект на різні стадії запального процесу, що може бути використано у практиці лікування хворих з ускладненим перебігом ранового процесу, трофічними ранами й іншими видами гнійно-запальних захворювань.

Список використаних джерел

1. Карандашов В. Ультрафіолетовое облучение крови / В. Карандашов, Е. Петухов. – М.: Медицина, 1997. – 199 с.
2. Карандашов В. Фототерапия / В. Карандашов, Е. Петухов, В. Зродников. – М.: Медицина, 2001. – 159 с.
3. Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats / N. Adamskaya, P. Dungal, R. Mittermayr et al. // *Injury*. – 2010. – 41(7). – P. 1038–1042. DOI: 10.1016/j.injury.2010.03.023
4. Васильев Н. Е. Иммунологические аспекты фотодинамической терапии / Н. Е. Васильев, Г. М. Сысоева, Е. Д. Даниленко // *Медицинская иммунология*. – 2003. – № 5. – С. 507–518.
5. Korbek M. Cancer treatment by photodynamic therapy combined with adoptive immunotherapy using genetically altered natural killer cell line / M. Korbek, J. Sun // *Int. J. Cancer*. – 2001. – Vol. 93. – P. 269–274. DOI: 10.1002/ijc.1326
6. Маколкин В. Метаболический синдром / В. Маколкин. – М.: Медицинское информ. агентство, 2010. – 144 с.
7. Rundo A. I. Application of the combined phototherapy in complex treatment of patients with complications of diabetic foot syndrome / A. I. Rundo, V. A. Kosinets // *Novosti Khirurgii*. – 2016. – Vol. 24 (2). – P. 131–137. DOI: 10.18484/2305-0047.2016.2.131
8. Вплив низькоінтенсивного електромагнітного випромінювання на функціональну активність лейкоцитів щурів за експериментального цукрового діабету / С. Тершак, О. Кармаш, М. Люта та ін. // *Молодь і поступ біології: збірник тез*. – Львів, 2018. – С. 101–102.
9. Effect of photobiomodulation therapy on differential white blood cells count and leukocyte antioxidant enzymes activity in streptozotocin-induced diabetic rats / O. I. Karmash, M. Y. Liuta, A. M. Korobov et al. // *Application of Lasers in Medicine and Biology: Book of abstracts*. – Kharkiv, 2018. – С. 176–178.
10. Antihyperglycaemic effect of laser acupuncture treatment at BL20 in diabetic rats / J. Cornejo-Garrido, F. Becerril-Chávez, G. Carlin-Vargas et al. // *Acupunct Med*. – 2014. – Vol. 32. – P. 486–494.
11. Effects of low-level light therapy on hepatic antioxidant defense in acute and chronic diabetic rats / J. Lim, Z. M. Ali, R. A. Sanders et al. // *J. Biochem. Mol. Toxicol*. – 2009. – Vol. 23(1). – P. 1–8.
12. Механизмы индукции воспаления / А. А. Майборода, Е. Г. Кирдей, И. Ж. Семинский, Б. Н. Цибель // *Сибирский мед. журн.* – 1994. – № 1(1-2). – С. 5–9.
13. Shmarakov I. O. Fundamentals of virology / I. O. Shmarakov, M. M. Marchenko, M. Ya. Spivak // *Chernovtzi: Chernovezky national University*. – 2011. – 320 p.
14. Muniz-Junqueira M. I. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes / M. I. Muniz-Junqueira, L. M. Peçanha, V. L. Silva-Filho et al. // *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. – 2003. – Vol. 10. – P. 1096–1102.
15. Иммунокорригирующий эффект фотодинамической терапии у пациентов с гнойно-септическими осложнениями / Е. М. Климова, А. М. Коробов, В. В. Бойко и др. // *Применение лазеров в медицине и биологии: Збірник тез*. – Х., 2016. – С. 126–129.
16. Маянский Д. Н. Лекции по клинической патологии: руководство для врачей / Д. Н. Маянский, И. Г. Урсков. – Новосибирск, 1997. – 249 с.
17. Terasaki P. I. Microdroplet assay of human serum cytotoxins / P. I. Terasaki, J. D. Melelland // *Nature*. – 1964. – № 204. – P. 998–1000. <https://doi.org/10.1038/204998b0>
18. Гриневич Ю. А. Определение иммунных комплексов / Ю. А. Гриневич, Л. Н. Алферов // *Лабораторное дело*. – 1981. – № 8. – С. 493–496.
19. Raab O. The action of fluorescent material on infusorien / O. Raab // *Z. Biol. (Muenich)*. – 1900. – № 39. – С. 524–546.
20. Юрина Н. П. Светоиндуцируемые стрессовые белки плазмид фототрофов / Н. П. Юрина, Д. В. Мокерова, М. С. Одинцова // *Физиол. растений*. – 2013. – № 60(5). – С. 611–624.
21. Казначеев С. В. Изменение биохимических параметров животного под воздействием видимого света / С. В. Казначеев, Л. В. Молчанова // *Сб. Психическая саморегуляция*. – Новосибирск, 1983. – № 3. – С. 301–311.
22. Daly S. M. Go with the flow: A review of methods and advancements in blood flow imaging / S. M. Daly // *J. Biophotonics*. – 2013. – № 6(3). – P. 217–255. DOI: 10.1002/jbio.201200071
23. Akopov A. Preoperative endobronchial photodynamic therapy improves resectability in initially irresectable (inoperable) locally advanced non-small cell lung cancer / A. Akopov, A. Rusanov, A. Gerasineta // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. – 2014. – Vol. 3. – P. 259–264. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.03.011
24. Клебанов Г. И. Изменение активности супероксиддисмутазы в процессе стимуляции полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови / Г. И. Клебанов, М. В. Крейнина, И. И. Чукаева // *Бюллетень эксперимент. биологии и медицины*. – 1990. – № 09(4). – С. 333–334.
25. Любовцева Л. А. Возрастные и видовые различия нейроиммунных структур тимуса крыс, кошек и человека / Л. А. Любовцева, Е. В. Любовцева, О. В. Воробьева // *Актуальные вопросы клинической медицины: сб. материалов региональной науч.-практ. конф.*. – Чебоксары, 2017. – С. 177–184.
26. Klimova O. M. Phagocytes barrier functions and complement system proteins in patients with lower limbs trophic ulcers before and after combined exposure / O. M. Klimova, O. V. Lavinska, E. A. Bychenko // *Scientific achievements of modern society. Abstracts of the 12th International scientific and practical conference*. Cognum Publishing House. – Liverpool, United Kingdom, 2020. – P. 17–22.

References

1. Karandashov V., Petuhov E. *Ultraviolet blood irradiation*. M.: Medicine, 1997. 199 p.
2. Karandashov V., Petuhov E., Zrodnikov V. *Phototherapy*. M.: Medicine, 2001. 159 p.
3. Adamskaya N., Dungal P., Mittermayr R. et al. Light therapy by blue LED improves wound healing in an excision model in rats. *Injury*. 2010; 41(7):1038-42. doi: 10.1016/j.injury.2010.03.023
4. Vasilev N., Sysoeva G., Danilenko E. Immunological aspects of photodynamic therapy. *Medical immunology*. 2003; 5:507-18.
5. Korbek M., Sun J. Cancer treatment by photodynamic therapy combined with adoptive immunotherapy using genetically altered natural killer cell line. *Int. J. Cancer*. 2001; 93:269-74. doi: 10.1002/ijc.1326
6. Makolkin V. *Metabolic syndrome*. M.: Medical Information Agency, 2010. 144 p.
7. Rundo A., Kosinets V. Application of the combined phototherapy in complex treatment of patients with complications of diabetic foot syndrome. *Novosti Khirurgii*. 2016; 24 (2): 131–137. doi: 10.18484/2305-0047.2016.2.131
8. Tershak S., Karmash O., Liuta M., Dudok K., Korobov A., Sibirna N. Influence of low-intensity electromagnetic radiation on the functional activity of rat leukocytes in experimental diabetes mellitus. "Youth and Progress in Biology": Book of abstracts, Lviv. 2018: 101-102.
9. Karmash O.I., Liuta M.Y., Korobov A.M., Sybirna N.O. Effect of photobiomodulation therapy on differential white blood cells count and leukocyte antioxidant enzymes activity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Application of Lasers in Medicine and Biology: Book of abstracts*, Kharkiv. 2018:176-178.
10. Cornejo-Garrido J., Becerril-Chávez F., Carlin-Vargas G. et al. Antihyperglycaemic effect of laser acupuncture treatment at BL20 in diabetic rats. *Acupunct Med*. 2014;32:486-494.
11. Lim J., Ali Z.M., Sanders R.A. et al. Effects of low-level light therapy on hepatic antioxidant defense in acute and chronic diabetic rats. *J BiochemMolToxicol*. 2009; 23(1): 1-8.
12. Majboroda A.A., Kirdej E.G., Seminskij Zh., Cibiel B.N. *Inflammation induction mechanisms*. Siberian Medical Journal. 1994;1(1-2),5-9.
13. Shmarakov I.O., Marchenko M.M., Spivak M.Ya. *Fundamentals of virology*. Chernovtzi: Chernovezky national University. 2011;320.

14. Muniz-Junqueira M.I., Peçanha L.M., Silva-Filho V.L. et al. Novel microtechnique for assessment of postnatal maturation of the phagocytic function of neutrophils and monocytes. Clinical and diagnostic laboratory immunology. 2003;10:1096-1102.
15. Klimova E.M., Korobov A.M., Bojko V.V. et al. Immunocorrective effect of photodynamic therapy in patients with purulent-septic complications. Application of lasers in medicine and biology: Book of abstracts, Kharkiv. 2016: 126-129.
16. Mayanskij D.N., Ursov I.G. Lectures in Clinical Pathology: A Guide for Physicians. Novosibirsk, 1997:249.
17. Terasaki P.I., Melelland J.D. Microdroplet assay of human serum cytotoxicity. Nature. 1964;204:998-1000 <https://doi.org/10.1038/204998b0>.
18. Grinevich Yu.A., Alferov L.N. Determination of immune complexes. Laboratory work. 1981;8:493-496.
19. Raab O. The action of fluorescent material on infusorien. Z. Biol. (Muenich). 1900;39:524-546.
20. Yurina N.P., Mokerova D.V., Odincova M.S. Light-induced stress proteins of phototroph plastids. Plant physiology. 2013;60(5):611-624.
21. Kaznatcheev C.V., Molchanova L.V. Changes in the biochemical parameters of an animal under the influence of visible light. Mental self-regulation. Novosibirsk. 1983;3:301-311.
22. Daly S.M. Go with the flow: A review of methods and advancements in blood flow imaging. J. Biophotonics. 2013;6(3):217-255. doi: 10.1002/jbio.201200071
23. Akopov A., Rusanov A., Gerasin A. et al. Preoperative endobronchial photodynamic therapy improves resectability in initially inoperable (inoperable) locally advanced non-small cell lung cancer. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2014;3:259-264. doi: 10.1016/j.pdpdt.2014.03.011

24. Klebanov G.I., Krejina M.V., Chukaeva I.I. Changes in superoxide dismutase activity during stimulation of polymorphonuclear leukocytes in peripheral blood. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 1990;109.4:333-434.

25. Lyubovceva L.A., Lyubovceva E.V., Vorobeva O.V. Age and species differences in the neuroamine structures of the thymus of rats, cats and humans. Topical issues of clinical medicine: collection of articles. materials of the regional scientific and practical conference. Cheboksary; 2017:177-184.

26. Klimova O.M., Lavinska O.V., Bychenko E.A. Phagocytes barrier functions and complement system proteins in patients with lower limbs trophic ulcers before and after combined exposure. Scientific achievements of modern society. Abstracts of the 12th International scientific and practical conference. Cognum Publishing House. Liverpool, United Kingdom. 2020:17-22

Надійшла до редколегії 4.09.2020
Отримано виправлений варіант 5.10.2020
Підписано до друку 5.10.2020

Received in the editorial 4.09.2020
Received a revised version on 5.10.2020
Signed in the press on 5.10.2020

- ^{1,2} Е. Климова, д-р биол. наук, ² А. Коробов, канд. физ.-мат. наук, ^{1,2} Е. Быченко мл. науч. сотр.,
^{1,2} Е. Лавинская, канд. биол. наук, ¹ Т. Кордон, канд. биол. наук, ¹ Л. Дроздова, канд. биол. наук
¹ГУ "Институт общей и неотложной хирургии имени В. Т. Зайцева НАМНУ", Харьков, Украина,
² Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, Харьков, Украина

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ОБЛУЧЕНИЯ ОПТИЧЕСКОГО ДИАПАЗОНА СПЕКТРА ($\lambda = 630-660$ НМ) НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ЖИВОТНЫХ С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

Лечение воспалительных и септических состояний представляет серьезную проблему из-за существующей устойчивости к антибиотикам. Необходимы новые методы лечения с использованием биологических и физических факторов, влияющих на течение воспалительных реакций при хронических процессах. Важным является достижение понимания механизмов взаимодействия световых фотонов с клеточными акцепторами, которые обеспечивают реактивность и резистентность.

Цель – оценить влияние низкоинтенсивного света красного спектра ($\lambda = 630-660$ нм) на течение воспалительного процесса у животных с ЛПС-индуцированным перитонитом. Было выделено 3 группы: А – интактные животные; Б – животные с перитонитом, вызванным внутрибрюшинным введением ЛПС; В – животные с ЛПС-индуцированным перитонитом после многократного воздействия красного света. Облучение брюшной стенки проводили светодиодными матрицами Коробов А. В. – Коробов В. В. "Барва-Флекс / 24ФМ", излучающими в красной области спектра. Использовали методы световой микроскопии (оценка барьерной функции нейтрофилов в кислородонезависимом фагоцитозе, определение степени лимфоцитотоксичности) и спектрофотометрии (определение концентрации циркулирующих иммунных комплексов).

У животных после индукции перитонита (группа В) наблюдали угнетение фагоцитоза, которое проявлялось в снижении адгезии и эндоцитоза антигенов нейтрофилами по сравнению с контролем. Использование светового воздействия красного спектра (группа С) активировало фагоцитарные клетки и уменьшало степень лимфоцитотоксичности и концентрацию циркулирующих иммунных комплексов на разных стадиях воспалительного процесса. Таким образом, действие красного света способствовало нормализации иммунорезистентности у животных, тем самым снижая антигенную нагрузку за счет активации инфильтрационной и экссудационной стадий воспалительного процесса и индукции регенеративных процессов после повторного облучения в конце эксперимента.

Ключевые слова: воспаление, низкоинтенсивное излучение, фагоцитоз, цитотоксичность.

^{1,2} O. Klimova, Dr Sci., ² A. Korobov, PhD, ^{1,2} K. Bichenko, Junior Researcher,

^{1,2} O. Lavinska, PhD, ¹ T. Kordon, PhD, ¹ L. Drozdova, PhD

¹ State Institution "Zaitsev V. T. Institute of General and Urgent Surgery of National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kharkiv, Ukraine

² V. N. Karazin Kharkiv National University

INFLUENCE OF LOW-INTENSITY RADIATION OF THE OPTICAL RANGE SPECTRUM ($\lambda = 630-660$ NM) ON THE IMMUNORESISTANCE PARAMETERS IN ANIMALS WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS

Treatment of inflammatory and septic conditions is a serious problem due to the existing antibiotic resistance. It is necessary to find new treatments using biological and physical factors that affect the course of inflammatory reactions in chronic processes. It is important to understand the mechanisms of interaction of light photons with cellular acceptors, which provide reactivity and resistance.

The aim – is to evaluate the low-intensity light effect of the red range spectrum ($\lambda = 630-660$ nm) on the course of the inflammatory process in experimental animals with LPS-induced peritonitis. Animals were divided into 3 groups: A – intact animals; B – animals with peritonitis induced by intraperitoneal administration of LPS; C – animals with LPS-induced peritonitis after repeated exposure to red light. Irradiation of the abdominal wall was performed with LED matrices Korobov A. – Korobov V. "Barva-Flex/24FM", which emit in the red region of the spectrum. Methods of light microscopy (study of the barrier function in oxygen-independent phagocytosis of neutrophils, estimation of the lymphocytotoxicity degree in the Terasaki test) and spectrophotometry (determination of the concentration of circulating immune complexes) were used.

In animals after induction of peritonitis (group B) was observed inhibition of phagocytosis, which manifested itself in reduced adhesion and endocytosis of antigens by neutrophils compared with intact animals. The use of light exposure of the red range spectrum (group C) significantly activated phagocytic cells and reduced the degree of lymphocytotoxicity and the concentration of circulating immune complexes at different stages of the inflammatory process. Thus, the action of red light contributed to the normalization of immunoresistance in animals, thereby reducing antigenic load by activating infiltration and exudation stages of the inflammatory process and induction of regenerative processes after repeated irradiation at the end of the experiment.

Keywords: inflammation, low-intensity radiation, phagocytosis, cytotoxicity.