“ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ”
 “EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY”
Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Наукові статті / Reviews
 ECPB 2021, 3/4(93):5–10 <https://doi.org/>

УДК 616-001-003.9-036.1-085.849.19-092.9

Особливості регуляції репаративних процесів хронічних ран цитокінами при використанні фотобіомодуляційної терапії

Н.М. БАБЕНКО

*Харківська медична академія післядипломної освіти, Харківський національний
педагогічний університет імені Г.С. Сковороди, Харків, Україна*

E-mail: natali_babenko@ukr.net

Резюме. Фізичні методи впливу на рановий дефект широко застосовуються в процесі лікування пошкоджень. Метою нашої роботи було вивчення впливу фотобіомодуляційної (ФБМ) терапії на регуляцію порушень заживлення хронічних ран цитокінами (на прикладі інтерлейкіну-1β (ІЛ-1β) та інтерлейкіну-4 (ІЛ-4)). У дослідженні були задіяні 54 щури лінії Вістар: інтактні тварини (6 щурів), тварини контрольної та експериментальної груп (по 24 щури в кожній), яким було змодельовано хронічні рани. Щури експериментальної групи отримували ФБМ терапію один раз на добу, протягом 5 днів. Лазерний апарат «Ліка-терапевт М» (Черкаси) застосовували в безперервному режимі при довжині хвилі 660 нм, вихідній потужності 10 мВт, щільності енергії 1 Дж/см², часі експозиції 314 с. Ранові дефекти тварин контрольної групи опромінювали фіктивно. Щурів виводили з експерименту на 3-тю, 7-му, 14-ту та 28-му добу після оперативного втручання. Дослідження рівнів ІЛ-1β та ІЛ-4 в сироватці крові тварин проводилося методом імуноферментного аналізу. Застосування ФБМ-терапії призвело до збільшення рівнів ІЛ-1β через 3 дні після індукції рани і зниження – через 28 днів. Концентрації ІЛ-4 знизилися через 3 дні та підвищилися через 14 і 28 днів в групі тварин, ранові дефекти яких піддавалися впливу ФБМ- терапії. Застосування ФБМ-терапії сприяє регуляції процесів загоєння хронічних ран шляхом модуляції рівнів ІЛ-1β і ІЛ-4 на різних стадіях загоєння. Краще розуміння клітинних і молекулярних механізмів, що лежать в основі загоєння ран при застосуванні ФБМ-терапії, дозволить впливати на репараційні процеси, що призведе до нових та ефективних терапевтичних стратегій для багатьох патологічних станів.

Ключові слова: хронічна рана, фотобіомодуляційна терапія, цитокіни, експериментальна модель.

Features of the regulation of reparative processes of chronic wounds by cytokines when using photobiomodulation therapy

BABENKO N.M.

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, H.S. Skovoroda Kharkiv National Pedagogical University, Kharkiv, Ukraine

Abstract. Physical methods of influencing a wound defect are widely used in the process of treating injuries. The aim of our work was to study the effect of photobiomodulation (PBM) therapy on the regulation of disorders of chronic wound healing by cytokines (for example, interleukin-18 (IL-18) and interleukin-4 (IL-4)). The study involved 54 Wistar rats: intact animals (6 rats), animals of the control and experimental groups (24 rats in each group), which were simulated chronic wounds. The rats of the experimental group received PBM therapy once a day for 5 days. The laser apparatus Lika-therapist M (Cherkassy) was used in a continuous mode at a wavelength of 660 nm, an output power of 10 mW, an energy density of 1 J/cm², and an exposure time of 314 s. The wounds of the animals in the control group treated with sham. The rats were taken out of the experiment on days 3, 7, 14, and 28 after surgery. The study of the levels of IL-18 and IL-4 in the blood serum of animals was carried out by the method of enzyme-linked immunosorbent assay. The use of PBM therapy led to an increase in IL-18 levels 3 days after wound induction and to a decrease after 28 days. IL-4 concentrations decreased after 3 days and increased after 14 and 28 days in the group of animals whose wound defects were exposed to PBM therapy. The use of PBM therapy contributes to the regulation of chronic wound healing processes by modulating the levels of IL-18 and IL-4 at different stages of healing. A better understanding of the cellular and molecular mechanisms underlying wound healing with PBM therapy will allow influencing the repair processes, which will lead to new and effective therapeutic strategies for many pathological conditions.

Key words: chronic wound, photobiomodulation therapy, cytokines, experimental model.

Вступ. Лікування хронічних ран є актуальною проблемою світової медицини, що лягає важким тягарем на економіку та суспільство [1]. Пошук ефективних методів впливу на репаративні процеси необхідно проводити з урахуванням розуміння основ патогенезу ранового процесу. Для загоєння ушкоджень потрібна складна синхронізація різних типів клітин у послідовних фазах [2]. Зазвичай процес загоєння ран ділять на 3 або 4 фази. У концепції 4 фаз є фаза гемостазу, фаза запалення, фаза проліферації та фаза ремоделювання. При трифазному підході фаза гемостазу знаходиться в межах запальної фази. Точна регуляція клітинних реакцій у процесі загоєння ран залежить від комплексних сигнальних шляхів, індукованих факторами росту та цитокінами. Порушення процесів загоєння ран може призвести до хронічних ран, у яких спостерігається дисбаланс між про- і протизапальними сигналами [3]. Фотобіомодуляція (ФБМ) – це нова галузь інтересу в науковому співтоваристві. Метод заснований на випромінюванні світлових хвиль червоного та ближнього інфрачервоного діапазонів. Цей метод знайшов широке застосування при лікуванні багатьох захворювань, зокрема хронічних ран. У даний час вивчаються механізми, що лежать в основі ФБМ, та пов'язані з нею сигнальні шляхи [4]. Застосування ФБМ-терапії дає змогу регулювати порушення репаративних процесів шляхом цитокінової модуляції на ранніх етапах загоєння ран [5].

Дослідження ролі цитокінів на всіх фазах загоєння ран при застосуванні ФБМ-терапії нечисленні.

Метою нашої роботи було вивчення впливу ФБМ-терапії на регуляцію порушеній загоєння хронічних ран цитокінами (на прикладі інтерлейкіну-18 (ІЛ-18) та інтерлейкіну-4 (ІЛ-4)).

Матеріали й методи дослідження. В експеримент були включені 54 щури лінії Вістар масою 250 ± 30 г віком 8-9 місяців, яких утримували у віварії Харківської медичної академії післядипломної освіти. Тварини випадковим чином були поділені на дві групи по 24 щурів. До раневих дефектів тварин експериментальної групи застосовували ФБМ-терапію. Ранові дефекти тварин контрольної групи не отримували такої терапії. Інтактні тварини представлені 6 тваринами. Експерименти проводилися відповідно до принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) та Загальними принципами експериментів на тваринах, затвердженими Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Експеримент був схвалений етичним комітетом Харківської медичної академії післядипломної освіти (Протокол № 5 від 12 листопада 2020 р.).

При загальній анестезії, що спричинена внутрішньом'язовим введенням розчину золетілу з розрахунку 10 мг/кг маси тіла, після депіляції шерсті видалявся клапоть шкіри діаметром 2 см у проксимальному відділі спини щура. Після чого по краях рани накладали перпендикулярний петлевидний шкірно-фасціальний шов. На поверхні дна рани розсікали поверхневу фасцію перпендикулярними розрізами з утворенням осередків розмірами 5×5 мм, які вшивали П-подібними швами [6]. Рани щурів експериментальної групи опромінювали щодня протягом п'яти днів, починаючи з 24-ї години після моделювання рани. Лазерну рукоятку тримали перпендикулярно поверхні рани. Була опромінена вся площа рани. Використовували апарат «Ліка-терапевт М» (Черкаси, Україна) в безперервному режимі при довжині хвилі 660 нм, вихідній потужності 10 мВт, щільності енергії 1 Дж/см², часі експозиції 314 с. Вибір параметрів ФБМ-терапії здійснювався за результатами аналізу літератури [7]. Тварини контрольної групи піддавалися таким же маніпуляціям, але з вимкненим приладом.

Евтаназія 6 щурів з кожної групи була проведена шляхом вдихання хлороформу в замкнутому просторі через 3, 7, 14 і 28 діб після індукції ран. Кров для дослідження брали методом відкритої серцевої пункції. Рівні ІЛ-18 і ІЛ-4 в сироватці крові тварин визначали, використовуючи набори реагентів Вектор-Бест (Росія), імуноферментним методом згідно з протоколами виробників.

Вимірювання площі рани проводили в контрольній та експериментальній групах. Була проведена цифрова макрозйомка поверхні рани. Площу поверхні рани вимірювали на фотографіях за допомогою програми ImageJ (NIH, США). Відносну площу ран (S) розраховували за формулою: $S = St / So \times 100\%$, де So – площа рани після її нанесення; St – площа поверхні рани при заданому періоді загоєння.

Для статистичної обробки результатів використовували пакет статистичного аналізу Statistica 6.0. Для кожного оцінюваного параметра були розраховані $M \pm SE$, де M – середнє арифметичне; SE – стандартна помилка середнього арифметичного. Достовірність відмінностей між групами (статистичну значущість) визначали з використанням непараметричного критерію Краскела-Волліса ANOVA для незалежних вибірок. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. У післяопераційний період тварини залишалися здоровими без клінічних ознак інфекції.

Концентрації ІЛ-18 і ІЛ-4 представлені на рисунку.

Зміна рівнів досліджуваних показників в сироватці крові тварин: а – ІЛ-1β; б – ІЛ-4 (* $p < 0,05$)

Застосування ФБМ-терапії призводить до збільшення рівнів ІЛ-1β через 3 дні після індукції рани та зниження – через 28 днів. Концентрації ІЛ-4 знижуються через 3 дні та підвищуються через 14 і 28 днів в експериментальній групі тварин.

Результати вимірювання відносної площі поверхні рани у тварин експериментальної групи та у тварин, яким ФБМ-терапія не проводилася, подані в таблиці.

Зміни відносної площі ранової поверхні

Групи тварин	Дні										
	3	5	7	10	12	14	16	18	21	24	28
Відносна площа ранової поверхні в контрольній групі, %	93.5 ± 1.0	82.9 ± 2.1	78.3 ± 1.6	65.6 ± 1.9	57.0 ± 1.0	45.4 ± 2.5	27.4 ± 0.9	18.4 ± 2.8	8.5 ± 1.5	6.4 ± 1.4	0
Відносна площа ранової поверхні в експериментальній групі, %	83.2 ± 2.5*	75.6 ± 1.9*	68.8 ± 1.6*	67.2 ± 1.9	65.1 ± 1.8*	60.2 ± 2.2*	51.4 ± 2.1*	35.8 ± 2.1*	14.1 ± 0.9*	3.3 ± 1.2	0

* $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою.

У дослідженні була змодельована хронічна рана з відтворенням умов локальної гіпоксії та порушенням мікроциркуляції, оскільки відомо, що тривала гіпоксія уповільнює загоєння ран [8]. Хронічним ранам притаманні високі рівні прозапальних цитокінів. У роботі був вивчений вплив ФБМ-терапії на експресію прозапального цитокіна ІЛ-1β. Відомо, що передача сигналів ІЛ-1 необхідна для ефективного загоєння ран [9]. Застосування в нашій роботі ФБМ-терапії приводило до підвищення концентрацій ІЛ-1β на ранній стадії ранового процесу. Що, мабуть, пов'язано зі здатністю ФБМ-терапії пригнічувати або розв'язувати запальний процес [10]. Аналогічні результати продемонстровано в дослідженні, у якому показано підвищення рівнів цього цитокіну після впливу низькоінтенсивного лазерного випромінювання на ранніх стадіях загоєння ран [11]. За іншими даними, ФБМ терапія знижувала експресію ІЛ-1β на 7-й день після застосування у м'язах щурів після гострого пошкодження [12].

Через 28 днів після оперативного втручання застосування ФБМ-терапії призводить до зниження рівнів ІЛ-1β, що, мабуть, сприяє зменшенню патологічного хронічного запалення й запобіганню фіброзу, оскільки показано, що гальмування ІЛ-1 зменшує рубцювання та поліпшує загоєння глибоких тканин [13].

Важливу роль у процесах репарації ран відіграє також протизапальний цитокін ІЛ-4. Відомо, що ІЛ-4 сприяє проліферації та хемотаксису фібро-

бластів, а також продукції колагену й молекул позаклітинного матриксу в шкірних ранах [14]. Зниження рівнів ІЛ-4 через 3 дні після індукції рани й застосування ФБМ-терапії, яке ми отримали в нашій роботі, можливо, зумовлено компенсаторними реакціями, пов'язаними з підвищенням рівнів ІЛ-1 β в експериментальній групі тварин на цьому терміні загоєння рани.

Отримані дані збігаються з результатами наших попередніх досліджень [5]. Подальше підвищення концентрацій ІЛ-4 на стадіях переходу проліферації в стадію ремоделювання і, власне, ремоделювання пов'язано, мабуть, зі здатністю ІЛ-4 спільно з ІЛ-13, а також ІЛ-4R і ІЛ-13R активувати транскрипцію перетворювача сигналу й активатора транскрипції 6 (STAT6), що стоїть нижче, та сприяти поляризації макрофагів другого типу, пов'язаних з репаративним фенотипом і протизапальною дією [15]. У літературі показана стійка індукція ІЛ-4 в результаті впливу червоного світла в 3D-моделі шкіри [16]. Низькоінтенсивна лазерна терапія приводила також до підвищення експресії ІЛ-4 при нейрозапаленні на 3-й, 7-й і 14-й дні після пошкодження [17].

Незважаючи на скорочення термінів загоєння ран при використанні ФБМ-терапії на початкових фазах загоєння (до 7-го дня) (див. таблицю), надалі значущих відмінностей в площі скорочення ран експериментальної групи, порівняно з аналогічним показником тварин контрольної групи, не виявлено. У літературі також є роботи, у яких, незважаючи на позитивні ефекти лікування, застосування цього методу не прискорювало загоєння ран. Наприклад, у дослідженні Isler S.C. з колегами, не було виявлено суттєвих відмінностей в площі загоєння піднебінних ран після ФБМ-терапії [18]. У іншій роботі, що вивчає вплив низькоінтенсивної терапії при 670 нм на загоєння пролежнів у мишей, зміна освітленості й часу експозиції для досягнення заданої щільності енергії (5 Дж/см²) призвела до суперечливих результатів. Статистично значуще збільшення швидкості закриття ран спостерігалось не у всіх групах експериментальних тварин [19]. Відмінності в моделях ран і в параметрах лазера, що використані в розглянутих роботах, ускладнює порівняння досліджень і встановлення оптимальних параметрів опромінення, таких як рекомендовані дози, довжина хвилі й щільність потужності. Таким чином, найбільш оптимальні параметри ФБМ-терапії, що застосовуються для поліпшення загоєння ран, ще належить визначити.

Висновки. Застосування ФБМ-терапії з параметрами, використаними в даному дослідженні, сприяє регуляції репаративних процесів хронічних ран шляхом модуляції рівнів інтерлейкіну-1 β і інтерлейкіну-4 і на різних стадіях загоєння.

Поліпшення нашого розуміння сигнальних шляхів, за допомогою яких контролюється процес загоєння ран, може полегшити розробку нових регенеративних методів лікування.

Фінансування. Дослідження фінансувалося Міністерством охорони здоров'я України за рахунок коштів державного бюджету.

Рекомендовано до друку комісією з етики

ПОСИЛАННЯ

1. Raziyeva K, Kim Y, Zharkimbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of Acute and Chronic Wound Healing. *Biomolecules*. 2021;11(5):700. doi:10.3390/biom11050700.
2. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev*. 2019;99(1):665–706. doi:10.1152/physrev.00067.2017.
3. Larouche J, Sheoran S, Maruyama K, Martino MM. Immune Regulation of Skin Wound Healing: Mechanisms and Novel Therapeutic Targets. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2018;7(7):209–31. doi:10.1089/wound.2017.0761.
4. Jere SW, Abrahamse H, Houeeld NN. The JAK/STAT signaling pathway and photobiomodulation in chronic wound healing. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017;38:73–9. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.10.001.
5. Pavlov SB, Babenko NM, Kumetchko MV, Litvinova OB, Semko NG, Mikhaylusov RN. The influence of photobiomodulation therapy on chronic wound healing. *Rom Rep Phys*. 2020;72:609.

6. Зинатуллин РМ, Гизатуллин ТР, Павлов ВН, Катаев ВА, Фархутдинов РР, Баймурзина ЮЛ и др., изобретатели. Зинатуллин РМ, Гизатуллин ТР, правообладатели. Способ моделирования трофической раны в эксперименте. РФ патент 2510083. 20.03.2014 г. (Zinatullin RM, Gizatullin TR, Pavlov VN, Kataev VA, Farhutdinov RR, Baymurzina JL, et al., inventors. Zinatullin RM, Gizatullin TR, assignee. A method for modeling a trophic wound in an experiment. Russian patent 2510083. 2014-03-20).
7. Zein R, Selting W, Hamblin MR. Review of light parameters and photobiomodulation efficacy: dive into complexity. *J Biomed Opt.* 2018;23(12):1–17. doi:10.1117/1.JBO.23.12.120901.
8. Cano Sanchez M, Lancel S, Boulanger E, Nevieri R. Targeting Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in the Treatment of Impaired Wound Healing: A Systematic Review. *Antioxidants (Basel).* 2018;7(8):98. doi:10.3390/antiox7080098.
9. Pyrillou K, Burzynski LC, Clarke MCH. Alternative Pathways of IL-1 Activation, and Its Role in Health and Disease. *Front Immunol.* 2020;11:613170. doi:10.3389/fimmu.2020.613170
10. Lopes-Martins RAB, Leonardo PS, Bjordal JM, Marcos RL. Photobiomodulation: Inhibition or Resolution of the Inflammatory Process? *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2020;38(8):453–4. doi:10.1089/photob.2020.4825.
11. Mo S, Chung PS, Ahn JC. 630 nm-OLED Accelerates Wound Healing in Mice Via Regulation of Cytokine Release and Genes Expression of Growth Factors. *Current Optics and Photonics.* 2019;3(6):485–95. doi:10.3807/COPP.2019.3.6.485.
12. Fernandes KP, Alves AN, Nunes FD, Souza NH, Silva JA Jr, Bussadori SK, Ferrari RA. Effect of photobiomodulation on expression of IL-1 β in skeletal muscle following acute injury. *Lasers Med Sci.* 2013;28(3):1043–6. doi:10.1007/s10103-012-1233-x.
13. Thomay AA, Daley JM, Sabo E, Worth PJ, Shelton LJ, Harty MW, et al. Disruption of interleukin-1 signaling improves the quality of wound healing. *Am J Pathol.* 2009;174(6):2129–36. doi:10.2353/ajpath.2009.080765.
14. Nguyen JK, Austin E, Huang A, Mamalis A, Jagdeo J. The IL-4/IL-13 axis in skin fibrosis and scarring: mechanistic concepts and therapeutic targets. *Arch Dermatol Res.* 2020;312(2):81–92. doi:10.1007/s00403-019-01972-3.
15. Van Dyken SJ, Locksley RM. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:317–43. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095906.
16. Leong C, Bigliardi PL, Sriram G, Au VB, Connolly J, Bigliardi-Qi M. Physiological Doses of Red Light Induce IL-4 Release in Cocultures between Human Keratinocytes and Immune Cells. *Photochem Photobiol.* 2018;94(1):150–7. doi:10.1111/php.12817.
17. Song JW, Li K, Liang ZW, Dai C, Shen XF, Gong YZ, et al. Low-level laser facilitates alternatively activated macrophage/microglia polarization and promotes functional recovery after crush spinal cord injury in rats. *Sci Rep.* 2017;7:620. doi:10.1038/s41598-017-00553-6.
18. Isler SC, Uraz A, Guler B, Ozdemir Y, Cula S, Cetiner D. Effects of Laser Photobiomodulation and Ozone Therapy on Palatal Epithelial Wound Healing and Patient Morbidity. *Photomed Laser Surg.* 2018;36(11):571–80. doi:10.1089/pho.2018.4492.
19. Lanzaforame R, Stadler I, Kurtz AF, Connelly R, Timothy PA Sr, Brondon P, et al. Reciprocity of exposure time and irradiance on energy density during photoradiation on wound healing in a murine pressure ulcer model. *Lasers Surg. Med.* 2007;39(6):534–42. doi:10.1002/lsm.20600.