

УДК 616.5-001.27: 615.8

М. В. Красносельський, Л. І. Сімонова✉, **В. З. Гертман,** **О. С. Пушкар, Т. С. Завадська***ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», вул. Пушкінська, 82, 61024, г. Харків, Україна*

ТКАНИННІ ІМУННІ КЛІТИНИ ТА ЇХ РОЛЬ У ПРОЦЕСАХ ЗАГОЄННЯ ІНФІКОВАНИХ ПРОМЕНЕВИХ ВИРАЗОК ПРИ ВПЛИВІ ФОТОДИНАМІЧНОЇ ТЕРАПІЇ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

Мета: вивчення впливу антибактеріальної ФДТ на динаміку тканинних нейтрофільних лейкоцитів CD18 і тканинних макрофагів ED1 в тканинах інфікованої променевої виразки на етапах спонтанного загоєння і при лікуванні ФДТ.

Матеріали і методи. Інфіковану променево виразку моделювали шляхом локального рентгенівського опромінення шкіри стегна щура в дозі 85,0 Гр з подальшим нанесенням на поверхню виразки бактеріальної суспензії. ФДТ проводили за допомогою фотонного апарату «Барва-LED/630» і фотосенсибілізатора метиленового синього. Вплив ФДТ на стан клітинного імунітету визначали за допомогою імуногістохімічного методу за показниками кількісного вмісту нейтрофільних лейкоцитів CD18 і макрофагів ED1 на етапах загоєння інфікованої променевої виразки.

Результати. В процесі спонтанного загоєння променевої виразки (контроль I) динаміка змін відносного об'єму тканинних нейтрофільних лейкоцитів CD18 та макрофагів ED1 в зоні ураження, зниження індексу CD18/ED1 у понад 2 рази свідчили, що перемикання нейтрофільної реакції на макрофагальну відбувалося до 52-ї доби спостереження. При інфікуванні променевої виразки *S. aureus* (контроль II) перемикання нейтрофільної реакції на макрофагальну не відбулося протягом всього періоду спостереження. При застосуванні ФДТ у разі інфікованої *S. aureus* променевої виразки (дослідна група) зниження індексу CD18/ED1 визначалося починаючи з 21-ї доби спостереження.

Висновки. Позитивний ефект антибактеріального методу ФДТ інфікованих *S. aureus* променевих виразок проявлявся повною мікробною деконтамінацією рани, скороченням фаз ранового процесу, повним загоєнням променевої виразки. Застосування ФДТ призводило до загибелі бактерій, зниження кількості нейтрофільних лейкоцитів і збільшення макрофагів у зоні ураження, перемикання нейтрофільної реакції на реакцію моноцитарно-макрофагальних клітин вже на ранніх стадіях загоєння.

Ключові слова: фотодинамічна терапія, фотосенсибілізатор, фотодіоди, інфіковані променеві виразки.

Проблеми радіаційної медицини та радіобіології. 2019. Вип. 24. С. 250–260. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-250-260

✉ Сімонова Лариса Іванівна, e-mail: patphysiologia_imr@ukr.net

M. V. Krasnoselsky, L. I. Simonova✉, V. Z. Gertman, E. S. Pushkar, T. S. Zavadskaya

SI «Institute of Medical Radiology named by S.P. Grigoriev National Academy of Medical Sciences of Ukraine», 82 Pushkinska St., 61024, Kharkiv, Ukraine

TISSUE IMMUNE CELLS AND THEIR ROLE IN THE HEALING PROCESS OF INFECTED RADIATION ULCERS UNDER THE IMPACT OF PHOTODYNAMIC THERAPY (EXPERIMENTAL STUDY)

Objective: to study the effect of antibacterial photodynamic therapy (PDT) on the dynamics of tissue neutrophilic leukocytes CD18 and tissue macrophages ED1 in the tissues of infected radiation ulcer during the stages of spontaneous healing and in the treatment of PDT

Materials and methods. Infected radiation ulcer was modeled by local X-ray irradiation of the rat thigh skin at a dose of 85.0 Gy, followed by applying to the surface of the ulcer bacterial suspension of *S. aureus*. PDT was performed using a «Barva-LED/630» photonic apparatus and a methylene blue photosensitizer. The effect of PDT on the state of cellular immunity was determined using an immunohistochemical method based on the quantitative indices of neutrophilic leukocytes CD18 and ED1 macrophages during the stages of healing of an infected radiation ulcer.

Results. In the course of spontaneous healing of the ulcer (control I), the dynamics of changes in the relative volume of tissue neutrophil leukocytes CD18 and ED1 macrophages in the lesion zone, a decrease in the CD18 / ED1 index more than 2 times indicated that switching of the neutrophil response to macrophage occurred before 52nd days of observations. When infected with *S. aureus* X-ray (control II), the switching of the neutrophil response to the macrophage did not occur during the entire observation period. When using PDT in the case of *S. aureus* infected ulcer (experimental group), the decrease in the CD18 / ED1 index was determined from the 21st day of observation.

Conclusions. The positive effect of the antibacterial PDT method of infected *S. aureus* radiation ulcers was manifested by complete microbial decontamination of the wound, reduction of phases of the wound process, complete healing of radiation ulcers. The use of PDT has led to the death of bacteria, a decrease in the number of neutrophilic leukocytes and an increase in macrophages in the lesion area, the switching of the neutrophilic response to the reaction of monocyte-macrophage cells in the early stages of healing.

Key words: photodynamic therapy, photosensitizer, photodiodes, infected radiation ulcers.

Problems of Radiation Medicine and Radiobiology. 2019;24:250-260. doi: 10.33145/2304-8336-2019-24-250-260

ВСТУП

Однією з головних функцій лейкоцитів є запобігання розвитку запальних процесів і знищення мікробів в осередках інфекції. Встановлено, що міграція лейкоцитів до місця пошкодження тканин, осередку інфекції або запалення починається з їх адгезії (прилипання) до ендотелію судин запалених тканин, при проходженні по кров'яному руслу (переважно в венулах) клітини прикріплюються до ендотелію судин, на яких експресуються рецептори для адегезії лейкоцитів [1, 2]. Крім того, клітини в зоні запалення, зокрема макрофаги, секретують у вигляді захисної реакції цитокіни, які на поверхні клітин ендотелію викликають утворення молекул адгезії. Останні притягують і пов'язують з собою циркулюючі лейкоцити, які через суміжні епітеліальні клітини здійснюють трансендотеліальну міграцію у вогнище запалення [1, 2].

INTRODUCTION

One of the main functions of leukocytes is to prevent the development and induce destruction of microbes in the foci of infection and inflammatory processes. It has been established that the migration of leukocytes to the site of tissue damage, focus of infection or inflammation begins with their adhesion to the vascular endothelium of inflamed tissues, when passing through the bloodstream (mainly in the venules) cells attach to the vascular endothelium, on which receptors for leukocyte adhesion are expressed [1, 2]. In addition, cells in the outbreak of inflammation, in particular macrophages, secrete in the form of a protective reaction cytokines, which on the surface of endothelial cells cause the formation of adhesion molecules. The latter attract and bind circulating leukocytes, which, through adjacent epithelial cells, carry out trans-endothelial migration to the inflammatory focus [1, 2].

✉ Larysa I. Simonova, e-mail: patphysiologia_imr@ukr.net

Дотепер відкрито три суперродини клітинних молекул адгезії: селектини, інтегрини і ряд імуноглобулінів. Серед інтегринів виділено 3 підродини, в одну з яких входить бета-2-інтегрин (CD18), що експресується переважно на тканинних нейтрофільних лейкоцитах [3]. Описано рідкісні генетичні захворювання, спричинені порушенням лейкоцитарної адгезії, наприклад, недостатність бета-2-інтегрину внаслідок мутації його гена, що призводить до зниження опірності бактеріальним інфекціям і уповільнення загоєння ран [4]. За деяких умов у тканинах може спостерігатися ослаблення запальних реакцій, незважаючи на виражений нейтрофільний лейкоцитоз, саме через нестачу лейкоцитів CD18 [4]. Тому важливо оцінити не просто зміни кількості тканинних лейкоцитів в процесі загоєння пошкоджених тканин, особливо інфікованих ран, а й виявити лейкоцити, що володіють молекулами міжклітинної адгезії.

фотодинамічна терапія (ФДТ) широко застосовується у лікуванні запальних і проліферативних захворювань, злоякісних новоутворень [5–8]. У клінічних та експериментальних дослідженнях встановлено, що ФДТ може активувати імунну відповідь організму проти пухлин [9–11]. Визначено роль макрофагальних цитокінів у стимуляції локального і системного запалення при застосуванні ФДТ [12].

Перспективним напрямком є використання ФДТ у лікуванні ран, що тривало не загоюються, з антибіотикорезистентною флорою [13–19]. Бактерицидна і бактериостатична дія ФДТ на збудників інфекційних захворювань здійснюється за допомогою генерації синглетного кисню і перекисних радикалів фотосенсибілізаторами, що знаходяться зовні і всередині бактеріальної клітини з подальшим розвитком фототоксичних реакцій [20]. ФДТ гнійних інфекцій є процесом взаємодії активних форм кисню і токсичних радикалів з бактеріальними тілами. Результати цієї взаємодії залежать від інтенсивності генерації синглетного кисню, активності антистрессорних протеїнів, антиоксидантних ферментів бактерій і багатьох інших факторів [16, 18, 19].

Ефективність ФДТ досліджена нами на експериментальній моделі інфікованої *Pseudomonas aeruginosa* променевої виразки шкіри. Наявність *Pseudomonas aeruginosa* у променевої виразці призводила до збільшення площі ранової порожнини в порівнянні з неінфікованою променевої виразкою і до істотного гальмування процесів її загоєння. Приєднання фактора інфікування знижувало ак-

To date, 3 superfamilies of cellular adhesion molecules have been discovered: selectins, integrins, and a number of immunoglobulins. Among the integrins, 3 subfamilies are distinguished, one of which includes beta-2-integrin (CD18), which is mainly expressed on tissue neutrophilic leukocytes [3]. Rare genetic diseases caused by impaired leukocyte adhesion are described, for example, beta-2-integrin deficiency due to mutation of its gene, which leads to a decrease in the resistance to bacterial infections and delayed wound healing [4]. Under certain conditions, a weakening of inflammatory reactions can be observed in the tissues, despite expressed neutrophilic leukocytosis, precisely because of the lack of CD18 leukocytes [4]. Therefore, it is important to assess not just changes in the number of tissue leukocytes in the healing process of damaged tissues, especially infected wounds, but the identification of leukocytes with intercellular adhesion molecules.

PDT is widely used in the treatment of inflammatory and proliferative diseases, malignancies [5–8]. In clinical and experimental studies, PDT has been shown to activate the body's immune response against tumors [9–11]. The role of macrophage cytokines in stimulating local and systemic inflammation in the use of PDT has been determined [12].

A promising direction is the use of PDT in the treatment of long-term non-healing wounds with antibiotic-resistant flora [13–19]. The bactericidal and bacteriostatic action of PDT on infectious agents is carried out by the generation of singlet oxygen and peroxide radicals by photosensitizers located outside and inside the bacterial cell with the subsequent development of phototoxic reactions [20]. PDT purulent infections are the process of reacting reactive oxygen species and toxic radicals with bacterial bodies. The results of this interaction depend on the intensity of singlet oxygen generation, the activity of antistressor proteins, antioxidant enzymes of bacteria and many other factors [16, 18, 19].

The efficacy of PDT was investigated by us in an experimental model of infected skin ulcer *Pseudomonas aeruginosa*. The presence of *Pseudomonas aeruginosa* in the radiation ulcer led to an increase in the area of the wound cavity compared to uninfected radiation ulcers and to a significant inhibition of its healing processes. The attachment of the infection factor reduced the activity of reparative proces-

тивність репаративних процесів у променевої виразці на 20 % порівняно з неінфікованою. ФДТ сприяла повному загоєнню в середньому на один місяць раніше, ніж у тварин контрольних груп [21, 22].

Особливий інтерес представляє участь тканинних імунних клітин в процесі загоєння інфікованих променевих виразок, оскільки відомо пригнічуючий вплив іонізуючої радіації на загальний і місцевий імунітет, в тому числі, на продукцію та функції нейтрофільних лейкоцитів і макрофагів.

З огляду на це, при використанні антимікробної ФДТ для лікування інфікованих експериментальних променевих виразок актуальним є вивчення динаміки стану нейтрофільної і моноцитарно-макрофагальної популяцій у тканинах інфікованої променевої виразки.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ

Метою роботи було вивчення впливу антибактеріальної ФДТ на динаміку тканинних нейтрофільних лейкоцитів CD18 і тканинних макрофагів ED1 в тканинах інфікованої променевої виразки на етапах спонтанного загоєння і при лікуванні ФДТ.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експеримент проведено на 60 щурах лінії Вістар, в ході якого було сформовано 4 групи: інтактна (n = 10), дві контрольні і дослідна групи. І контрольна група (n = 15) – тваринам моделювали променеву виразку шкіри в ділянці стегна. Доза локального опромінення – 85,0 Гр. II контрольна група (n = 15) – тваринам моделювали променеву виразку шкіри з наступним (на 7-му добу після опромінення) нанесенням на її поверхню 0,2 мл суспензії *Staphylococcus aureus* (0,5 млн мікробних клітин/см²). III дослідна група (n = 20) – тварини з інфікованою *S. aureus* променевої виразкою і подальшим впливом ФДТ на її поверхню.

Променеве ушкодження шкіри щурів здійснювали в ділянці верхньої поверхні стегна за допомогою рентген-терапевтичного апарату TUR-60. Умови опромінення: напруга 50 кВ, анодний струм 10 мА, фільтр 0,6 мм Al, потужність дози 33,5 Гр/хв.

Інфікування променевих ушкоджень проводили на 7-му добу після локального опромінення при появі перших ознак розвитку променевої виразки. Для інфікування використовували музейні референтні штами *S. aureus* ATCC 25923.

Вплив ФДТ здійснювали за допомогою фотонного апарату «Барва-LED/630» з використанням фотосенсибілізатора 0,1 % розчину метиленового синього. Енергетична експозиція за сеанс становила

ses in the radiation ulcer by 20% compared with the uninfected. PDD promoted complete healing on average one month earlier than control animals [21, 22].

Of particular interest is the involvement of tissue immune cells in the healing process of infected radiation ulcers, since it is known to suppress the effect of ionizing radiation on general and local immunity, including on the production and function of neutrophilic leukocytes and macrophages.

In this regard, when using antimicrobial PDT for the treatment of infected experimental radiation ulcers, it is relevant to study the dynamics of the state of neutrophil and monocyte-macrophage populations in tissues of infected radiation ulcers.

OBJECTIVE

The research objective was to study the effect of antibacterial PDT on the dynamics of tissue neutrophilic leukocytes CD18 and tissue macrophages ED1 in the tissues of infected radiation ulcer during the stages of spontaneous healing and in the treatment of PDT.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted on 60 Wistar rats, divided on 4 groups: intact (n = 10), two control and one experimental groups. In the I control group (n = 15) – animals simulated radiation ulcer of the skin in the thigh area by application of 85.0 Gy local dose. Control group II (n = 15) – animals were simulated radiation ulcer of the skin followed by application of 0.2 ml of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) suspension (0.5 million microbial cells/cm²) onto its surface on the 7th postradiation day. III experimental group (n = 20) – animals with radiation ulcers infected with *S. aureus* and the subsequent influence of PDT on their surface.

Radiation damage to the skin of rats was applied to the upper thigh with an X-ray therapy device TUR-60. Irradiation conditions were following: voltage 50 kV, anode current 10 mA, filter 0.6 mm Al, dose rate 33.5 Gy/min.

Infection of radiation damage was performed on day 7 after local irradiation with the appearance of the first signs of the development of radiation ulcer. For infection, museum reference strains of *S. aureus* ATCC 25923 were used.

The influence of PDT was carried out using a Barva-LED/630 photonic apparatus using a photosensitizer with a 0.1 % solution of methylene blue. The energy exposure per session was 45 J/cm².

45 Дж/см². Курс лікування ФДТ складався з двох сеансів з інтервалом 3 доби.

Тварин виводили з експерименту на 14, 21, 30, 37, 52-ту добу після опромінення.

Умови утримання та поводження з тваринами відповідали вимогам «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» [23, 24].

Матеріалом морфологічного дослідження слугувала шкіра з підлеглими м'якими тканинами в ділянці стегна щура, де моделювали променево виразку.

Отриманий від експериментальних тварин матеріал фіксували в 10 % розчині формаліну. Імуногістохімічне дослідження проводили на парафінових зрізах товщиною 5–6 мкм прямим і непрямим методом Кунса за методикою М. Brosman (1979) з використанням моноклональних антитіл (МКА) до CD 18 і ED1 (Novocastra Laboratories Ltd.).

Препарати вивчали в люмінесцентному мікроскопі «Ахіоскор 40». Оптичну щільність імунофлуоресценції клітин визначали за методом Г. І. Губинової-Вакулик і співавт. [25]. Кількість імунних клітин визначали у полі зору × 400 і наводили у відсотках (%). Обчислювали лейкоцитарно-макрофагальний індекс як співвідношення середніх значень відносних обсягів CD18 до ED1. Для порівняльного аналізу середніх значень показників використовували U-тест Манна-Уїтні (U-test Mann-Whitney) [26].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У інтактних щурів у зразках шкіри і підлеглих м'яких тканин, узятих у відповідних ділянках, при імуногістохімічному дослідженні були виявлені тільки поодинокі нейтрофільні лейкоцити (CD18), серед макрофагів також відзначалися поодинокі клітини, що експресують рецептори до ED1.

Динаміка кількісного складу тканинних імунних клітин у піддослідних тварин всіх груп представлена в таблиці 1.

З представлених даних видно, що у тварин з променевою виразкою (контроль I – локальне опромінення, спонтанне загоєння) упродовж 14 діб після опромінення в периульцерозній зоні відбулися виражені структурні зміни. У зоні опромінення визначався великий дефект рани – променево виразка, яка доходила до глибоких відділів дерми. Аналіз імуногістохімічних препаратів показав, що серед всіх імунних клітин переважали нейтрофільні лейкоцити (CD18), а їх відносний об'єм становив 58,4%.

The course of treatment of PDT consisted of two sessions with an interval of 3 days.

Animals were removed from the experiment on the 14th, 21st, 30th, 37th, 52nd day after irradiation.

The conditions of detention and treatment of animals met the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals, which are used for experimental and other scientific purposes [23, 24].

The material for the morphological study was the skin with the underlying soft tissues in the thigh area of the rat, where had been simulated radiation ulcer.

The material obtained from experimental animals was fixed in 10 % formalin solution. Immunohistochemical studies were performed on paraffin sections 5–6 μm thick using the direct and indirect Coons method according to the method of M. Brosman (1979), using monoclonal antibodies (MCA) to CD 18 and ED1 (Novocastra Laboratories Ltd.).

The preparations were studied in an Axioskor 40 fluorescent microscope. The optical density of the immunofluorescence of the cells was determined by the method of G. I. Gubina-Vakulik et al. [25]. The number of immune cells was determined in a field of view × 400 and expressed in percent (%). The leukocyte macrophage index was calculated as the ratio of the average values of relative volumes of CD 18 to ED 1. The U-test Mann-Whitney was used for comparative analysis of the mean values [26].

RESULTS AND DISCUSSION

An immunohistochemical study revealed only single neutrophilic leukocytes (CD18) in intact rats in skin and soft tissue samples taken at the relevant sites, and single cells expressing ED1 receptors were also observed among macrophages.

The dynamics of the quantitative composition of tissue immune cells in experimental animals of all groups are presented in Table 1.

From the presented data it can be seen that by 14 days after irradiation in animals with radiation ulcer (control I – local irradiation, spontaneous healing) expressed structural changes occurred in the periulcerous zone. In the area of exposure, a large wound defect was determined – a radiation ulcer that reached the deep parts of the dermis. The analysis of immunohistochemical preparations showed that neutrophilic leukocytes (CD18) prevailed among all immune cells, and their relative volume was 58.4%.

Таблиця 1

Середні значення відносних об'ємів тканинних імунних клітин (%), (M ± m)

Table 1

Average values of tissue immune cell relative volumes (%), M ± m

Номер групи, умови експерименту Group number, experimental conditions	Показники Indices	Терміни експерименту, дні / Terms of the experiment, days				
		14	21	30	37	52
I, контроль: променева виразка I, control: radiation ulcer	CD18	58.44 ± 0.21	54.20 ± 0.71	49.15 ± 0.60	46.12 ± 0.92	39.07 ± 0.64
	ED1	6.48 ± 0.40	8.13 ± 0.43	10.03 ± 0.42	10.42 ± 0.66	9.12 ± 0.50
	CD18 / ED1	9.20 ± 0.60	6.76 ± 0.38	4.94 ± 0.23	4.52 ± 0.29	4.36 ± 0.28
II, контроль: променева виразка + <i>S. aureus</i> II, control: radiation ulcer + <i>S. aureus</i>	CD18	69.40 ± 0.46*	62.18 ± 0.80*	59.42 ± 1.03*	56.35 ± 0.49*	49.42 ± 1.02*
	ED1	5.15 ± 0.47*	7.13 ± 0.36*	8.13 ± 0.45*	8.35 ± 0.34*	11.13 ± 0.59*
	CD18 / ED1	13.98 ± 1.11*	8.77 ± 0.46*	7.43 ± 0.47*	6.18 ± 0.33*	4.50 ± 0.23
III, дослід: променева виразка + <i>S. aureus</i> + ФДТ III, experiment: radiation ulcer + <i>S. aureus</i> + PDT	CD18	54.00 ± 0.58 ^{*,##}	36.08 ± 0.33 ^{*,##}	23.50 ± 1.03 ^{*,##}	17.33 ± 1.03 ^{*,##}	12.00 ± 1.03 ^{*,##}
	ED1	14.25 ± 0.31 ^{*,##}	14.17 ± 1.03 ^{*,##}	9.00 ± 0.52	7.33 ± 10.42*	5.35 ± 0.49 ^{*,##}
	CD18 / ED1	3.80 ± 0.08 ^{*,##}	2.56 ± 0.09 ^{*,##}	2.66 ± 0.16 ^{*,##}	2.39 ± 0.11 ^{*,##}	2.35 ± 0.24 ^{*,##}

Примітки. *,** – достовірна відмінність від контрольної групи I (p<0,05; p<0,01 відповідно) за U-test Mann–Whitney; ^{*,##} – достовірна відмінність від контрольної групи II (p<0,05; p<0,01 відповідно) за U-test Mann–Whitney.

Notes. *,** – significant difference from the control group I (p<0.05; p<0.01, respectively) according to the Mann – Whitney U-test; ^{*,##} – significant difference from control group II (p<0.05; p<0.01, respectively) according to Mann – Whitney U-test.

Водночас популяція макрофагів ED1 ще представлена слабо, тому індекс співвідношення даних популяцій був ще досить низький (9,20 ± 0,60). Подібна картина зберігалася на 21-шу і 30-ту добу, але поступово відносна кількість нейтрофільних лейкоцитів починала знижуватися і на 52-гу добу становила вже 39,1 % (p < 0,05 відносно вихідного значення). Паралельно відбувалося збільшення кількості тканинних макрофагів ED1 аж до 37 діб експерименту (з 6,48 % до 10,42 %) і, відповідно, зниження індексу CD18/ED1 в понад 2 рази. До 52-ї доби популяція макрофагів в даній групі переставала наростати і починала трохи знижуватися. Тобто, при спонтанному загоєнні променевої виразки до 52-ї доби вже відбувалося перемикання нейтрофільної реакції на макрофагальну.

Інфікування променевої виразки штамом *S. aureus* підвищувало кількість нейтрофільних лейкоцитів CD18 до 68,2 % (p < 0,05 відносно показника в контролі I). У структурі тканин променевої виразки переважали гнійно-некротичні прошарки. У променевій виразці вони становили від 51 % до 68 % об'єму порожнини на 14, 21 і 30-ту добу.

У всі наступні терміни спостереження відносний об'єм лейкоцитів CD18 перевищував відповідні показники у тільки опроміненіх тварин приблизно на 10 % і до 52 діб становив 48,1 %. Одночасно відбувалося збільшення популяції макрофагів, але їх кількість була практично в усі терміни менша, ніж у тільки опроміненіх тварин. Тому індекс співвідно-

At the same time, the population of macrophages ED1 was still poorly represented, therefore the ratio index of these populations was still quite low (9.20 ± 0.60). A similar pattern persisted on days 21 and 30, but gradually the relative number of neutrophilic leukocytes began to decline and by day 52 it was already 39.1 % (p < 0.05 relative to the initial value). In parallel, there was an increase in the number of tissue macrophages ED1 up to 37 days of the experiment (from 6.48 to 10.42 %) and, accordingly, a decrease in the CD18/ED1 index of more than 2 times. By 52nd day, the population of macrophages in this group ceased to grow and began to decline slightly. That is, with the spontaneous healing of radiation ulcers, by the 52nd day, the switching of neutrophilic reaction to macrophage one had already occurred.

Infection of radiation ulcer with the *S. aureus* strain increased the number of CD18 neutrophil leukocytes to 68.2 % (p < 0.05 relative to the control I). In the tissue structure of radiation ulcers, purulent-necrotic layers prevailed. In radiation ulcer, they comprised from 51 to 68 % of the volume of the wound cavity on days 14, 21, 30.

During all subsequent follow-up periods, the relative volume of CD18 leukocytes exceeded the corresponding figures in only irradiated animals by about 10 % and was 52.1 % by day 52. At the same time, there was an increase in the population of macrophages, but their number was almost all the time less than that of only irradiated animals.

шення лейкоцитарно-макрофагальних популяцій був у групі інфікованих приблизно в 1,5 раза вищим майже весь період спостережень (до 37-ї доби). Кількість макрофагів у цій групі продовжувала збільшуватися до кінця експерименту (52-га доба). Це свідчило, що перемикання нейтрофільної реакції на макрофагальну у тварин з інфікованою променевою виразкою не відбувалося протягом 52 діб спостереження, тобто запізнювалася порівняно з тільки опроміненими тваринами.

У щурів дослідної групи, які отримували ФДТ, на тлі повної деконтамінації мікробів з поверхні рани визначалося погравлення регенераторних процесів [21]. На відміну від двох контрольних груп (нелікованих тварин) у щурів після ФДТ вже на 14–30-ту добу лейкоцитарно-некротичний шар зменшувався на 18–32 %. До 37 діб лейкоцитарно-некротичні вогнища у променевої виразці пролікованих тварин були відсутні.

Грануляційна тканина з'являлася вже на 14-ту добу з достовірним перевищенням її кількості в усі терміни спостереження. На 52-гу добу грануляційна тканина вже не визначалася, відбувалася епітелізація поверхні рани з повним загоєнням променевої виразки і 100 % відновленням сполучної тканини.

У щурів дослідної групи, які отримували ФДТ, відзначалося очікуване зниження кількості нейтрофільних лейкоцитів CD18. Вже на 14-ту добу відносний об'єм цих клітин був достовірно нижче, ніж в контрольних групах (52,3 %, $p < 0,05$), на 30-ту добу і далі знижувався в 2–3 рази і до 52 діб становив всього 12,0 %. Паралельно наростав об'єм популяції макрофагів: вже на 14–21-шу добу об'єм ED1 зростав до 14,25–14,17 %, що майже в 2 рази перевищувало аналогічні контрольні показники. До 30 діб об'єм макрофагальної популяції починав знижуватися і до 52 діб становив уже тільки 5,35 % ($p < 0,05$ до початкового об'єму). Індекс CD18/ED1 був у цій групі різко знижений і становив до 52-ї доби 2,35 %.

Таким чином, імуногістохімічні та морфометричні дані променевої виразки свідчать про пригнічення процесів загоєння, особливо в інфікованій групі, що обумовлюється впливом *S. aureus*. Позитивний ефект ФДТ проявлявся у повній мікробній деконтамінації рани та прискоренні загоєння. При цьому тривалість всіх класичних фаз раневого процесу (запальна, проліферативна і реорганізація рубця) значно скорочувалася з повним загоєнням променевої виразки.

Therefore, the ratio index of leukocyte-macrophage populations was approximately 1.5 times higher in the infected group for almost the entire observation period (up to 37 days). The number of macrophages in this group continued to increase until the end of the experiment (52 days). This indicated that the switching of the neutrophilic reaction to the macrophage in animals with an infected radiation ulcer did not occur for 52 days, i.e. is delayed compared with the only irradiated animals.

Recovery of regenerative processes was determined on the background of complete decontamination of germs from the wound surface in rats of the experimental group receiving PDT. In contrast to the two control groups (untreated animals) in the PDT treated rats already at 14–30 days the leukocyte-necrotic layer decreased by 18–32 %. By day 37, leukocyte-necrotic foci in the radiation ulcer of the treated animals were absent.

Granulation tissue appeared already on day 14 with a significant excess of its quantity during all periods of observation. By day 52, granulation tissue was no longer determined, epithelization of the wound surface was noted with complete healing of radiation ulcer and 100 % restoration of connective tissue.

An expected decrease in the number of neutrophilic CD18 leukocytes was observed in this group. Already on day 14, the relative volume of these cells was significantly lower than in the control groups (52.3 %, $p < 0.05$), by 30 days and then decreased by 2–3 times and by 52 days was only 12.0 %. At the same time, the volume of the population of macrophages increased: as early as day 14–21, the volume of ED1 increased to 14.25–14.17 %, which was almost 2 times higher than the same control indicators. By the 30th day, the volume of the macrophage population began to decline and by the 52nd day it was already only 5.35 % ($p < 0.05$ to the initial volume). The CD18: ED1 index was sharply reduced in this group and amounted to 2.35 % by 52 days.

Thus, immunohistochemical and morphometric data of radiation ulcers indicate the suppression of the healing process, especially in the infected group, which is due to the influence of *S. aureus*. The positive effect of PDT was manifested in complete microbial wound decontamination and accelerated healing. At the same time, the duration of all the classic phases of the wound process (inflammatory, proliferative and reorganization of the scar) was significantly reduced with complete healing of the radiation ulcer.

Отримані факти також свідчать, що при використанні антибактеріального методу ФДТ після загибелі бактерій відбувалося не тільки очікуване зниження кількості нейтрофільних лейкоцитів у зоні пошкодження, але й стимуляція макрофагальної реакції, яка наставала набагато раніше (на 2 тижні), ніж навіть в неінфікованій виразці. Як відомо, сприятливий перебіг запальної реакції і загоєння ран залежать від своєчасного і повноцінного включення макрофагів у патологічний процес. Важливо відзначити, що однією з важливих функцій макрофагів є експресія ростових факторів, в тому числі фактора росту фібробластів, що відіграє велику роль у процесах загоєння ран різного генезу [2, 27]. На підставі отриманих даних можна припустити, що перемикання нейтрофільної реакції на реакцію моноцитарно-макрофагальних клітин, яка спостерігалася в лікованій ФДТ групі тварин, є одним з механізмів, що визначають позитивний ранозагоювальний ефект ФДТ.

ВИСНОВКИ

1. У процесі спонтанного загоєння променевої виразки динаміка змін відносного об'єму тканинних нейтрофільних лейкоцитів CD18 і макрофагів ED1 в зоні ураження, зниження індексу CD18/ED1 у понад 2 рази свідчили, що до 52-ї доби спостереження відбувалося перемикання нейтрофільної реакції на макрофагальну.
2. Внаслідок пригнічення процесів загоєння інфікованої *S. aureus* променевої виразки перемикання нейтрофільної реакції на макрофагальну не відбулося протягом 52 діб спостереження, тобто запізнювалося порівняно зі спонтанним загоєнням неінфікованої виразки.
3. Позитивний ефект антибактеріального методу ФДТ інфікованих *S. aureus* променивих виразок проявлявся повною мікробною деконтамінацією рани, скороченням фаз ранового процесу, повним загоєнням променевої виразки. Застосування ФДТ призводило до загибелі бактерій, зниження кількості нейтрофільних лейкоцитів і збільшення макрофагів в зоні ураження, перемикання нейтрофільної реакції на реакцію моноцитарно-макрофагальних клітин на ранніх стадіях загоєння.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Клиническая патофизиология : курс лекций / под ред. В. А. Черешнева, П. Ф. Литвицкого, В. Н. Цыгана. 2-е изд., испр. и доп. Санкт-Петербург : СпецЛит., 2015. 472 с.
2. Маянский Д. Н. Хроническое воспаление. М : Медицина, 1991. 272 с.

The findings also indicate that when using the antibacterial PDT method, after the death of bacteria, not only the expected reduction in the number of neutrophilic leukocytes in the damage zone occurred, but also the macrophage response, which occurred much earlier (by 2 weeks) than even in an uninfected ulcer. As it is known, the favorable course of the inflammatory reaction and wound healing depends on the timely and complete involvement of macrophages in the pathological process. It is worth to note that one of the important functions of macrophages is the expression of growth factors, including fibroblast growth factor, which plays a key role in the healing processes of wounds of various genesis [2, 27]. Based on the data obtained, one can assume that switching neutrophil response to the reaction of monocyte-macrophage cells observed in the treated PDT group of animals is one of the mechanisms that determine a positive wound healing effect of PDT.

CONCLUSIONS

1. In the course of spontaneous healing of the ulcer, the dynamics of changes in the relative volume of tissue neutrophil leukocytes CD18 and ED1 macrophages in the affected area, a decrease in the CD18 / ED1 index more than 2-fold indicated that by the 52nd day of observation, there was a switch to neutrophil switching.
2. Owing to the suppression of healing processes of *S. aureus* infected ulcer, switching of the neutrophil response to macrophage did not occur within 52 days of observations, ie it was delayed in comparison with spontaneous healing of uninfected ulcer.
3. Positive effect of the antibacterial PDT method of infected *S. aureus* radiation ulcers was manifested by complete microbial decontamination of the wound, reduction of phases of the wound process, complete healing of radiation ulcers. The use of PDT has led to the death of bacteria, a decrease in the number of neutrophilic leukocytes and an increase in macrophages in the lesion area, the switching of the neutrophilic response to the reaction of monocyte-macrophage cells in the early stages of healing.

REFERENCES

1. Chereshev VA, Litvitsky PF, Tsygan VN. [Clinical pathophysiology: a course of lectures]. 2nd ed. St. Petersburg: SpetsLit; 2015. 472 p. Russian.
2. Mayansky DN. [Chronic inflammation]. Moscow: Medicina; 1991. 272 p. Russian.

3. Schymeinsky J., Mocsai A., Walzog B. Neutrophil activation via beta2 integrin (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb. Haemost.* 2007. Vol. 98, no. 2. P. 262–273.
4. Roos D., Law S. K. Hematologically important mutations leukocyte adhesion deficiency. *Blood Cells Mol. Dis.* 2003. Vol. 27, no. 6. P. 1000–1004.
5. Лалченко А. С. Фотодинамическая терапия. Области применения и перспективы развития в оториноларингологии. *Вестник оториноларингологии.* 2015. Т. 80, № 6. С. 4–9.
6. Фотодинамическая терапия. История создания метода и механизмы / А. В. Гейниц, А. Е. Сорокатый, Д. М. Ягудаев, Р. С. Тухманов. *Лазерная медицина.* 2007. Т. 11, № 3. С. 42–46.
7. Фотодинамическая терапия эпителиальных злокачественных новообразований кожи / В. Н. Капинус, М. А. Каплан, И. С. Спиченкова и др. *Фотодинамическая терапия и фотодиагностика.* 2014. Т.3, вып. 3. С. 9–14.
8. Овчинников В. А., Угляница К. Н., Волков В. Н. Современные методы лучевого лечения онкологических больных. *Журнал ГрГМУ.* 2010. № 1. С. 93–97.
9. Canti G., De Simone A., Korbelik M. Photodynamic therapy and the immune system in experimental oncology. *J. Photochem. Photobiol.* 2002. Vol. 1. P. 79–80.
10. Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy / D. E. Dolmans, A. Kadambi, G. S. Hill et al. *Cancer Res.* 2002. Vol. 62, no. 15. P. 4289–4294.
11. Targeted therapy of cancer using photodynamic therapy in combination with multi-faceted anti-tumor modalities / M. Olivo, R. Bhuvanewari, S. L. Swarnalatha et al. *Pharmaceutical (Basel).* 2010. Vol. 3, no. 5. P. 1507–1529.
12. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation / S. O. Gollnick, S. S. Evans, H. Baumann et al. *Br. J. Cancer.* 2003. Vol. 88, no. 11. P. 1772–1779.
13. Дмитриева Н. В., Петухова И. Н., Смолянская А. З. Инфекционные осложнения в онкологической клинике. *Практическая онкология.* 2001. № 1 (5). С. 18–20.
14. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications / G. Jori, C. Fabris, M. Soncin et al. *Lasers Surg. Med.* 2006. Vol. 38. P. 468–481.
15. Short-term multimodal phototherapy approach in a diabetic ulcer patient / B. Chandrasekaran, R. Chettri, N. Agrawal, C. Sathyamoorthy. *Singapore. Med. J.* 2012. Vol. 53, № 6. P. 122–124.
16. Странадко Е. Ф. Фотодинамическая терапия гнойно-воспалительных заболеваний мягких тканей. *Фотобиология та фотомедицина.* 2011. № 2. С. 14–19.
17. Рисованная О. С. Бактериостатическая терапия при лечении воспалительных заболеваний тканей пародонта. *Лазерная медицина.* 2006. Т. 10, № 2. С. 21–28.
18. Экспериментальное обоснование применения фотодинамической терапии на заживление гнойных ран / П. И. Толстых, У. М. Корабков, А. Б. Шехтер и др. *Лазерная медицина.* 2001. Т. 5, № 2. С. 8–13.
3. Schymeinsky J., Mocsai A., Walzog B. Neutrophil activation via beta2 integrin (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost.* 2007;98(2):262-73.
4. Roos D, Law SK. Hematologically important mutations leukocyte adhesion deficiency. *Blood Cells Mol Dis.* 2003;27(6):1000-4.
5. Lapchenko AS. [Photodynamic therapy. Fields of application and development prospects in otorhinolaryngology]. *Vestnik otorinolaringologii.* 2015;80(6):4-9. Russian.
6. Heinitz AV, Sorokaty AE, Yagudaev DM, Tuxhmanov RS [Photodynamic therapy] Method creation history and mechanisms]. *Lasernaya meditsina* 2007;11(3):42-6.
7. Kapinus VN, Kaplan MA, Spichenkova IS., Shubina AM, Yaroslavtseva-Isaeva EV. [Photodynamic therapy of epithelial malignant neoplasms of the skin]. *Fotodinamicheskaya terapiya i fotodiagnostika.* 2014;3(3):9-14. Russian.
8. Ovchinnikov VA, Uglyanitsa KN, Volkov VN. [Modern methods of radiation treatment of cancer patients]. *Zhurnal GrGMU. GrGMU.* 2010;(1):93-7. Russian.
9. Canti G, De Simone A, Korbelik M. Photodynamic therapy and the immune system in experimental oncology. *J Photochem Photobiol.* 2002;1:79-80.
10. Dolmans DE, Kadambi A, Hill GS, Flores KR, Gerber JN, Walker JP et al. Targeting tumor vasculature and cancer cells in orthotopic breast tumor by fractionated photosensitizer dosing photodynamic therapy. *Cancer Res.* 2002;62(15):4289-94.
11. Olivo M, Bhuvanewari R, Swarnalatha SL, Dendukuri N, Soo-Ping Thong P. Targeted therapy of cancer using photodynamic therapy in combination with multi-faceted anti-tumor modalities. *Pharmaceutical (Basel)* 2010 May;3(5):1507-29.
12. Gollnick SO, Evans SS, Baumann H, Owczarczak B, Maier P, Vaughan L et al. Role of cytokines in photodynamic therapy - induced local and systemic inflammation. *Br J Cancer.* 2003;88(11):1772-9.
13. Dmitriyeva NV, Petukhova IN, Smolyanskaya AZ. [Infectious complications in the oncology clinic]. *Prakticheskaya onkologiya* 2001;1(5):18-20. Russian.
14. Jori G, Fabris C, Soncin M et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg. Med.* 2006;38:468-81.
15. Chandrasekaran B, Chettri R, Agrawal N, Sathyamoorthy C. Short-term multimodal phototherapy approach in a diabetic ulcer patient. *Singapore Med J.* 2012;53(6):122-4.
16. Stranadko YeF. Photodynamic therapy of purulent-inflammatory diseases of soft tissues. *Fotobiologiya ta fotomeditsina.* 2011;(2):14-9. Ukrainian.
17. Risovannaya OS. [Bacteriostatic therapy in the treatment of inflammatory diseases of periodontal tissues]. *Lasernaya meditsina.* 2006;10(2):21-8. Russian.
18. Tolstykh PI., Korabov UM., Shekhter AB. et al. [Experimental substantiation of the use of photodynamic therapy for the heal-

19. Микробиологическое обоснование эффективности фотосенсибилизаторов при фотодинамической терапии / О. Е. Шишкина, Л. Ю. Бутакова, Ю. О. Иванченко, С. С. Антонов. *Лазерная медицина*. 2013. Т.17, № 1. С. 35–37.
20. Красновский А. А. Фотодинамическое действие и синглетный кислород. *Биофизика*. 2004. Т. 49, № 2. С. 305–321.
21. Морфологическая характеристика и особенности заживления лучевой язвы кожи, инфицированной *Pseudomonas aeruginosa* / Н. В. Красносельский, Л. И. Симонова-Пушкар, А. Т. Гони-Симеха, И. В.Сорокина, М.С. Мирошниченко, Н. В. Гольева, Наука і практика. *Міжвідомчий медичний журнал*. 2017. № 1/2 (9/10). С. 64–68.
22. Мікробіологічне обґрунтування ефективності фотодинамічної терапії на експериментальній моделі інфікованої променевої виразки шкіри / Н. І. Скляр, Л. І. Симонова-Пушкар, В. В. Саркіс-Іванова, В. З. Гертман. *Актуальні проблеми сучасної медицини*. 2016. Вип.4 (56), ч. 3. С. 61–65.
23. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg, 1986. 53 p.
24. Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: метод. рекомендації / укл.: О. Г. Резніков, А. І. Соловйов, Н. В. Добреля, О. В. Стефанов. *Вісник фармакології та фармакопеї*. 2006. № 7. С. 47–60.
25. Пат. 46489 Україна, G01N 33/00. Спосіб кількісного визначення вмісту антигену в біологічних тканинах / Губіна-Вакулик Г. І. (UA), Сорокіна І. В.(UA), Марковський В. Д. та ін. (UA); заявник і патентовласник Харківський національний медичний університет (UA). № u200906730; заявл. 26.06.2009; опубл. 25.12.2009, Бюл. № 4.
26. Бюль А., Цефель П. SPSS: искусство обработки информации. Анализ статистических данных и восстановление скрытых закономерностей / пер. с нем. СПб : «ДиаСофтЮП», 2001. 608 с.
27. Субпопуляции макрофагов и мезенхимальные стволовые клетки в регуляции ремоделирования костной ткани / Е. Э. Иванюк, С. В. Надеждин, Л. А. Покровская и др. *Цитология*. 2018. Т. 60, № 4. С. 252–261.
- ing of purulent wounds]. *Lasernaya meditsina*. 2001;5(2):8-13. Russian.
19. Shishkina OE, Butakova LY., Ivanchenko YuO., Antonov SS. [Microbiological substantiation of the effectiveness of photosensitizers in photodynamic therapy]. *Lasernaya meditsina*. 2013;17 (1):35-7. Russian.
20. Krasnovsky AA.[Photodynamic action and singlet oxygen]. *Biofizika*. 2004;49(2):305-21.Russian.
21. Krasnoselsky NV, Simonova-Pushkar LI. Goni-Simeha AT., Sorokina IV, Miroshnichenko MS, V. Goleva NV. [Morphological characteristics and healing features of radiation ulcers of the skin infected with *Pseudomonas aeruginosa*]. *Nauka i praktika. Mizhvidomchiy medichniy zhurnal*. 2017;(1/2):64-8. Russian.
22. Skliar NI, Simonova-Pushkar LI, Sarkis-Ivanova W, Hertman VZ. [Microbiological substantiation of the effectiveness of photodynamic therapy on the experimental model of infected skin ulcer]. *Aktualni Problemy Suchasnoi Medytsyny*. 2016;(4 Part 3):61-5. Ukrainian.
23. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 53 p.
24. Reznikov OH, Soloviov AI, Dobrelia nv, Stefanov OV. [Bioethical examination of preclinical and other scientific researches carried out on animals: a methodical recommendations]. *Visnyk Farmakohii ta Farmakopei*. 2006;(7):47-60. Ukrainian.
25. Gubina-Vakulyk GI, Sorokina IV, Markovsky VD, et al., inventors; Kharkiv National Medical University, assignee. Ukrainian patent UA 46489. [The method of quantitative determination of antigen content in biological tissues]. 2009 Dec 25. Bulletin No. 4. Ukrainian.
26. Buhl. A, Zofel P. SPSS, version 10. Einfuhrung in de modern Dateanalyse unter Windows. Munchen: Person Education Deutschland GmbH; 2001.
27. Ivanyuk EE, Nadezhdin SV, Pokrovskaya LA, Shupletsova W, Khaziakhmatova OG, Yurova KA, et al. [Macrophage subsets and mesenchymal stem cells in regulation of bone tissue remodeling]. *Tsitologiya*. 2018;60(4):252-61. Russian.

ІНФОРМАЦІЯ ПРО АВТОРІВ

Красносельський Микола Віленович – доктор медичних наук, професор, директор Державна установа «Інститут медичної радіології ім. С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», м. Харків

Симонова Лариса Іванівна – доктор медичних наук, професор, головний науковий співробітник лабораторії радіаційної онкології, ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», м. Харків

Гертман Віра Захарівна – кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник лабораторії радіаційної онкології, ДУ «Інститут медичної радіології

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Mykola V. Krasnoselsky – Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the SI «Institute of Medical Radiology named by S.P. Grigoriev National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

Larysa I. Simonova – Doctor of Medical Sciences, Professor, Head Researcher of the Department of the Radiation Oncology, SI «Institute of Medical Radiology named by S.P. Grigoriev National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

Vira Z. Gertman – Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher of the Department of the Radiation Oncology, SI «Institute of Medical Radiology named by

ім. С. П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», м. Харків

Пушкар Олена Сергіївна – лікар відділення клінічної онкології, ДУ «Інститут медичної радіології ім. С.П. Григор'єва Національної академії медичних наук України», м. Харків

Завадська Тетяна Станіславівна – онкохірург, головний лікар МЦ «Життя-Київ», м. Київ

S.P. Grigoriev National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

Olena S. Pushkar – physician of the Department of Clinical Oncology, SI «Institute of Medical Radiology named by S.P. Grigoriev National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv, Ukraine

Tetiana S. Zavadskaya – onco-surgeon, chief physician of Life-Kyiv Medical Center, Kyiv, Ukraine

Стаття надійшла до редакції 12.07.2019

Received: 12.07.2019