

УДК 616-001.17:612.111.7

## СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ РОСТА В СЫВОРОТКЕ И ТРОМБОЦИТАРНОМ ЛИЗАТЕ ПАЦИЕНТОВ С ОЖГОВОЙ БОЛЕЗНЬЮ

**Алейник Д.Я., Сидорова Т.И., Чарыкова И.Н., Бегун С.М., Рубцова Ю.П.**  
*ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации, Нижний Новгород, e-mail: daleynik@yandex.ru*

В работе представлено сравнительное исследование содержания факторов роста (PDGF – BB, VEGF- A, TGF- $\beta$ , FGFb) в сыворотке и тромбоцитарном лизате (ТЛ) условно здоровых доноров и пациентов с ожоговой травмой различной площади. ТЛ получали методом холодового шока. Для определения содержания факторов роста в сыворотке и ТЛ использовали метод иммуноферментного анализа. Показано, что содержание факторов роста (PDGF-BB, VEGF-A, TGF- $\beta$ , FGFb) у здоровых и пациентов с ожоговой травмой подвержено значительным колебаниям при преобладании содержания протеинов в ТЛ по сравнению с таковым в сыворотке. Не фиксируется статистически значимого изменения PDGF-BB, VEGF-A и TGF- $\beta$  в ТЛ у пациентов с ожоговой болезнью при поступлении в стационар по сравнению с уровнем этих протеинов у условно здоровых добровольцев. В процессе лечения ожоговой болезни отмечаются достоверные изменения уровня факторов роста в ТЛ и сыворотке. Максимальное содержание факторов роста (PDGF-BB, VEGF-A, TGF- $\beta$ ) в ТЛ и сыворотке определяется в период с 10 по 20 день после ожога. В этот период содержание FGFb в сыворотке и ТЛ пострадавших с ожоговой травмой достоверно отличается от такового у здоровых добровольцев. Отсутствие изменений количественного содержания основных факторов роста в ТЛ пациентов с ожоговой травмой по сравнению с таковым в ТЛ здоровых свидетельствует о сохранении продукции этих протеинов, несмотря на тяжесть патологического процесса.

**Ключевые слова:** ожоги, раны, тромбоциты, тромбоцитарный лизат, факторы роста

## THE CONTENT OF SOME GROWTH FACTORS IN THE SERUM AND PLATELET LYSATE OF PATIENTS WITH BURN DISEASE

**Aleynik D.Ya., Sidorova T.I., Charykova I.N., Begun S.M., Rubtsova Yu.P.**  
*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Privolzhsky Research  
Medical University» of the Ministry of Health of the Russian Federation,  
Nizhny Novgorod, e-mail: daleynik@yandex.ru*

The article presents the comparing trials of the quantity of growth factors (PDGF – BB, VEGF- A, TGF- $\beta$ , FGFb) in serum and platelet lysate (PL) of healthy volunteers and burn patients with burns of different degrees. The PL was obtained using cold shock technique. Enzyme immunoassay was using for determining the quantity of growth factors in the serum and the PL. The report demonstrates that the quantity of growth factors (PDGF-BB, VEGF-A, TGF- $\beta$ , FGFb) in healthy and patients with burn injury is subject to significant fluctuations with prevalence of protein content in PL compared with that in serum. Statistically significant changes of PDGF-BB, VEGF-A and TGF- $\beta$  in the PL for burn patients during hospitalization compared to the quantity of this proteins for healthy volunteers weren't observed. Changes of amounts of growth factors in the PL and the serum were observed in the course of the treatment. The highest level of growth factors (PDGF-BB, VEGF-A, TGF- $\beta$ ) occurs in the PL and the serum from day 10 to 20 days after burns. The quantity of FGFb in the serum and the PL for burn patients also differs significantly compared to healthy volunteers during this period. There is no change in the quantitative content basic growth factors in the PL and the serum of burn patients compared to results of healthy volunteers, reflecting the protein synthesis is retained despite the serious pathological process.

**Keywords:** burns, wounds, thrombocytes, platelet lysate, growth factors

Биологически активные молекулы: цитокины и факторы роста – играют ключевую роль в регуляции процессов восстановления тканей после повреждения. Активация и оптимальное использование эндогенных биоактивных молекул является важнейшей задачей регенеративной медицины. Одним из возможных источников факторов роста в организме при патологических процессах может быть фракция тромбоцитов или продукты на их основе.

Структура и функции тромбоцитов подробно изучены и освещены в литературе. Известно, что в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов со-

держится комплекс биологически активных протеинов – факторов роста [1–3]. Среди них для регенерации кожи важнейшее значение имеют тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF-A), трансформирующий фактор роста (TGF- $\beta$ ), фактор роста фибробластов (FGF) и некоторые другие [2–5]. В сложном каскаде молекулярных событий, который обеспечивает процесс регенерации тканей после повреждения, участвуют все указанные протеины, а их функции дополняют и на каких-то этапах дублируют друг друга. Каждый из факторов роста характеризуется

плейотропным действием, т.е. имеет много мишеней. Эффекты воздействия факторов на разные клетки-мишени могут различаться, что определяется как самой клеткой мишенью, так и наличием и соотношением других факторов роста, их синергическим действием. В  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов кроме факторов роста содержатся и другие активные молекулы: остеокальцин, остеоонектин, фибриноген, фибронектин, витронектин, тромбоспондин-1, цитокины, хемокины, металлопротеазы, фунгицидные белки, факторы коагуляции [6].

Накопление данных о биологически активных веществах, содержащихся в  $\alpha$ -гранулах тромбоцитов, послужило основанием для клинического применения продуктов на основе тромбоцитов. Такими продуктами в первую очередь стала обогащенная тромбоцитами плазма [7, 8] и тромбоцитарный лизат – ТЛ [9, 10]. Положительный эффект применения обогащенной тромбоцитами плазмы отмечен при длительно незаживающих ранах, трофических язвах, травматических повреждениях кожного покрова и некоторых других патологиях кожных и мягких тканей [11–13].

Активация процессов регенерации с использованием продуктов на основе тромбоцитов при таких сложных и тяжелых поражениях, каковыми являются ожоги, имела бы существенное значение. Хорошо известно, что течение ожоговой болезни сопровождается угнетением и нарушением функций всех органов и систем организма, в том числе и системы кроветворения. Поэтому нельзя исключить снижение содержания тех или иных факторов роста в тромбоцитах и, как следствие, в сыворотке пациентов с ожоговой травмой, что может влиять на процесс заживления ожоговой раны. Для понимания этого вопроса необходимо исследование изменений основных факторов роста у пациентов с ожоговыми поражениями.

**Цель работы:** провести сравнительное исследование содержания основных факторов роста (PDGF-BB, VEGF-A, FGFb, TGF- $\beta$ ) в ТЛ и сыворотке пациентов с ожоговой болезнью и условно здоровых добровольцев.

#### Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служили сыворотка и ТЛ периферической крови восемнадцати условно здоровых добровольцев и 31 пациента с ожоговой травмой 2–3 степени, находившиеся на лечении в Ожоговом центре Университетской клиники ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России. Площадь поражения кожи у обследованных пациентов составляла от 10 до 80% (ср. –  $42,8 \pm 8,9\%$ ). В зависимости от площади поражения пациенты были разделены на две группы: 1 группа – пациенты с ожогом площа-

дью от 10 до 20% п.т., 2 группа – пациенты с ожогом более 20% п.т. Среди пострадавших преобладали люди работоспособного возраста от 21 до 61 года ( $40,68 \pm 6,8$ ), 23 мужчины, 8 женщин. Все пациенты получали комплексное лечение, включавшее инфузионно-трансфузионную, антибактериальную терапию, хирургическое лечение. Протокол исследования был одобрен локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО ПИМУ Минздрава России, и каждый пациент дал добровольное информированное согласие на участие в нем.

Кровь для исследования забирали из кубитальной вены: для получения сыворотки – без консерванта, для получения тромбоцитарной массы (ТМ) – с цитратом. Сыворотку получали стандартным методом после 15-минутной инкубации при комнатной температуре с последующим центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут, отбирали, аликвотировали и замораживали при  $-80^\circ\text{C}$  для последующего исследования.

Для исследования содержания биологически активных протеинов в динамике образцы крови у пострадавших с ожоговой травмой  $>20\%$  п.т. забирали трижды. Первый раз – непосредственно при поступлении в клинику (первые семь дней после травмы), второй – в период разгара заболевания (так называемый «период напряженных компенсаторных процессов» [14] – 10–20 день после инцидента), третий – на этапе полного восстановления кожного покрова перед выпиской из стационара (21 день и более после травмы). Время забора крови для исследования было отделено от времени гемо- и плазматрансфузий, как минимум на 48 часов. ТМ пациентам не переливалась.

ТМ получали методом двухэтапного центрифугирования и нормировали по концентрации тромбоцитов ( $1,75 \times 10^9$  тромбоцитов/мл). Для получения ТЛ использовали метод температурного лизиса (три цикла быстрого замораживания при  $-80^\circ\text{C}$  на 24 часа с последующим размораживанием при  $+37^\circ\text{C}$ ) [15]. Такой метод приводит к разрушению  $\alpha$ -гранул тромбоцитов и высвобождению из них факторов роста. В этом случае в ТЛ отсутствуют примеси биохимических активаторов, а концентрация факторов FGFb, PDGF-BB, TGF- $\beta$  и VEGF-A достаточно высока. По данным литературы содержание белка в ТЛ при таком способе получения минимально [6], поэтому загрязненность его веществами, способными вызвать неблагоприятные иммунологические реакции, сводится к минимуму.

Далее образцы центрифугировали при 4000 об/мин для осаждения фрагментов клеток, фильтровали через фильтр 0,22 мкм и после микроскопического контроля с негативным результатом аликвотировали и замораживали при  $-80^\circ\text{C}$ .

Факторы роста (PDGF-BB, VEGF-A, TGF- $\beta$ , FGFb) в сыворотке и ТЛ определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа, используя наборы реагентов «eBioscience», USA (PDGF – BB, VEGF-A, TGF- $\beta$ 1) и набор фирмы R&D systems (USA) для определения FGFb. Величину оптической плотности регистрировали на анализаторе «Sunrise» (Австрия) с использованием программы «Magellan», позволяющей в автоматическом режиме строить калибровочную кривую и определять концентрацию исследуемых веществ.

Статистическую обработку проводили методами непараметрической статистики с применением критериев парных сравнений Вилкоксона, Манна – Уитни с использованием программ STATISTICA 6.0.

### Результаты исследования и их обсуждение

Показано, что как у условно здоровых доноров, так и у пациентов с ожоговой травмой на всех этапах исследования, содержание факторов роста в ТЛ и сыворотке было подвержено значительным колебаниям. При сравнении содержания факторов роста в сыворотке и ТЛ у здоровых доноров и пациентов с ожоговой болезнью, независимо от тяжести ожоговой травмы и срока обследования, отмечается, что уровень исследованных протеинов в сыворотке, как правило, меньше, чем в ТЛ. Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов, демонстрирующих преобладание содержания факторов роста в тромбоцитах по сравнению с сывороткой [11]. При этом надо отметить, что статистически значимых отличий между уровнем протеинов в ТЛ у здоровых и пациентов с ожоговой травмой, независимо от площади

поражения и стадии ожоговой болезни, не зафиксировано. В то же время отмечается тенденция к снижению уровня протеинов в сыворотке пациентов при поступлении в стационар, а содержание VEGF-A (табл. 1) у пациентов с ожогом > 20% п.т., по сравнению с уровнем у здоровых, снижено статистически значимо.

При определении уровня протеинов на фоне течения ожоговой болезни у пациентов с площадью поражения > 20% п.т. отмечено статистически значимое увеличение содержания всех исследованных факторов и в сыворотке, и в ТЛ в период разгара заболевания по сравнению с этими показателями при поступлении в стационар. При восстановлении целостности кожного покрова (период реконвалесценции) и нормализации общего состояния пострадавших фиксируется снижение уровня протеинов и в сыворотке и ТЛ, однако их содержание не достигает уровня, отмеченного при поступлении в стационар (табл. 2–4).

**Таблица 1**

Содержание факторов роста в сыворотке

группы	1. Здоровые (n = 18)	2. Ожог < 20% п.т. (n = 11)	3. Ожог > 20% п.т. (n = 20)
VEGF-A	401,87 ± 64,08 (1102,42 – 8,38)	303,13 ± 155,84 (1068,38 – 16,5)	188,76 ± 41,22* (707,42 – 7,56)
TGF-β	28205,65 ± 3679,813 (55110–4276,5)	15604,08 ± 8885,83 (59820–4999,5)	19928,48 ± 4928,22 (85740,00–1680,000)
PDGF	8719,7 ± 3005,89 (16904,4–210,1)	1597,58 ± 1037,92 (6695,2–32)	5621,36 ± 1655,53 (18166,2–13,57)

Примечание. \* – p < 0,05 при сравнении групп 1 и 3 критерий Манна – Уитни.

**Таблица 2**

Содержание VEGF-A у пациентов с ожоговой болезнью в процессе лечения (n = 20)

Группа	При поступлении (срок 1)	10–20 сутки после травмы (срок 2)	При выписке (срок 3)
1. VEGF-A, лизат тромбоцитов, (пг/мл)	1391,9 ± 348,87 (6000–27,04)	3167,92 ± 581,98● (8000–32,9)	1944,39 ± 417,76 (7000–513,7)
2. VEGF-A, сыворотка, (пг/мл)	188,76 ± 41,22* (707,42–7,56)	1360,07 ± 49,62* ● (5889,4–0)	459,74 ± 175,23* (2776,6–35,56)

Примечание. \* – p < 0,05 сравнение содержания VEGF-A в группах 1 и 2; критерий Манна – Уитни; ● – p < 0,05 сравнение содержания VEGF-A на сроках 1 и 2; критерий Вилкоксона.

**Таблица 3**

Содержание TGF-β у пациентов с ожоговой болезнью в процессе лечения (n = 20)

группа \ срок	При поступлении (срок 1)	10–20 сутки после травмы (срок 2)	При выписке (срок 3)
1. TGF-β, лизат тромбоцитов, (пг/мл)	67275,30 ± 8430,92 (150030–37704,21)	92908,33 ± 7498,1● (140430,0–15279,60)	69203,5 ± 10821,51 (143490,0– 2280,0)
2. TGF-β, сыворотка, (пг/мл)	19928,48 ± 4928,22* (85740,00–1680,000)	38985,40 ± 9622,38*● (146370,0–6298,000)	21976,03 ± 7359,4* (115290,0–3060,000)

Примечание: \* – p < 0,05 сравнение содержания TGF-β в группе 1 и 2; критерий Манна – Уитни; ● – p < 0,05 сравнение содержания TGF-β на сроке 1 и 2; критерий Вилкоксона.

**Таблица 4**

Содержание PDGF-BB у пациентов с ожоговой болезнью в процессе лечения (n = 20)

группа	При поступлении (срок 1)	10–20 сутки после травмы (срок 2)	При выписке (срок 3)
1. PDGF, лизат тромбоцитов, (пг/мл)	17233,48 ± 3512,78 (65032–4928,01)	28367,77 ± 4125,64● (77508–5564)	21253,2 ± 5993,67 (94880–3225,8)
2. PDGF, сыворотка, (пг/мл)	1364,46 ± 341,17* (5857,8–40,304)	8531,32 ± 2965,54*● (53444–108,56)	5621,36 + 1655,53* (18166,2–13,57)

Примечание: \* – p < 0,05 сравнение содержания PDGF в группах 1 и 2; критерий Манна – Уитни; ● – p < 0,05 сравнение содержания PDGF на сроке 1 и 2; критерий Вилкоксона.

У части пострадавших (9 человек) в период разгара ожоговой болезни определяли дополнительно основной фактор роста фибробластов (FGFb). В то время как в сыворотке и ТЛ условно здоровых добровольцев FGFb практически не определялся (ср. 0,91 ± 0,659 пг/мл), у пациентов с ожогами содержание FGFb составило около 40 пг/мл (ср. 39,6 ± 10,7 пг/мл). В ТЛ этой группы пациентов уровень FGFb достоверно превышал таковой у здоровых, 55,03 ± 11,33 пг/мл и 86,77 ± 14,07 пг/мл соответственно. Указанные изменения могут свидетельствовать об интенсификации процессов ангиогенеза и пролиферации в этот период ожоговой болезни, в регуляции которых участвует этот медиатор [16, 17].

К сожалению, как показывает опыт нашей клиники, пациенты с ожоговой травмой до поступления в клинику не получают адекватного лечения на местах. Поэтому у них, как правило, при поступлении преобладают явления воспаления. Период разгара ожоговой болезни характеризуется интенсивной хирургической активностью (перевязки, еженедельные операции некрэтомии и/или свободной кожной пластики). Раневая поверхность при обширных ожоговых поражениях в этот период неоднородна: образовавшаяся грануляционная ткань, донорские раны на разных этапах заживления, участки с выраженными явлениями воспаления, зоны эпителизации, прижившиеся и приживающиеся аутотранспланты. Таким образом, в этот период фиксируются все этапы изменения раневой поверхности: воспаление, пролиферация, начало ремоделирования раны. Соответственно, на этом этапе ожоговой болезни требуется напряженная работа всех механизмов, регулирующих как процессы ангиогенеза, так и пролиферации клеток мезенхимного ряда, экспансии эпителиальных клеток, так и ремоделирования внеклеточного матрикса.

Результатом является наблюдаемое увеличение содержания всех ростовых факторов (PDGF, VEGF, TGF-β), участвующих в регуляции этих процессов [2–5].

В период реконвалесценции происходит постепенная стабилизация процессов с возвращением содержания факторов роста, как в сыворотке, так и в ТЛ, к исходному уровню. Динамика и протяженность этого процесса, вероятнее всего, обусловлена тяжестью ожоговой травмы.

#### Заключение

Таким образом, уровень факторов роста (PDGF-BB, VEGF-A, TGF-β, FGFb) у пациентов с ожоговой травмой, как и у здоровых, в ТЛ превышает содержание этих протеинов в сыворотке. Содержание протеинов (PDGF-BB, VEGF-A, TGF-β) в ТЛ независимо от площади поражения и стадии ожоговой болезни не отличается от такового у здоровых добровольцев, а уровень FGFb в период разгара процесса превышает его.

Содержание факторов роста в сыворотке и ТЛ в процессе течения ожоговой болезни изменяется однонаправленно с максимальной выраженностью в период разгара ожоговой болезни. При восстановлении целостности кожных покровов и улучшении состояния пациентов (период реконвалесценции) отмечается постепенное снижение уровня факторов роста и в сыворотке, и в ТЛ. Отсутствие количественных изменений содержания основных факторов роста в ТЛ у пациентов с ожоговой травмой по сравнению с таковым у здоровых добровольцев свидетельствуют о сохранении синтеза этих протеинов, несмотря на тяжесть патологического процесса. Эти результаты позволяют говорить об отсутствии необходимости системного введения экзогенных факторов роста при терапии ожоговой травмы и о возможности использования аутологичного ТЛ для местного применения.

## Список литературы

1. Blair P., Flaumenhaft R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates // *Blood reviews*. – 2009. – Vol. 23. – P. 177–189.
2. Marx R. Platelet-rich plasma: evidence to support its use // *Journal of oral and maxillofacial surgery*. – 2004. – Vol. 62. – P. 489–496.
3. Hemeda H., Giebel B., Wagner W. Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells // *Cytotherapy*. – 2014. – Vol. 16. – P. 170–180.
4. Lopez-Vidriero E., Goulding K.A., Simon D.A., Sanchez M., Johnson D.H. The use of platelet-rich plasma in arthroscopy and sports medicine: optimizing the healing environment // *Arthroscopy*. – 2010. – Vol. 26. – № 2. – P. 269–278.
5. Stellos K., Kopf S., Paul A., Marquardt J.U., Gawaz M., Huard J., Langer H.F. Platelets in regeneration // *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*. – 2010. – Vol. 36. – № 2. – P. 175–184.
6. Lange C., Cakiroglu F., Spiess A.-N., Cappallo-Obermann H., Dierlamm J., Zander AR. Accelerated and safe expansion of human mesenchymal stromal cells in animal serum-free medium for transplantation and regenerative medicine // *J. Cell. Phys.* – 2007. – Vol. 213. – P. 18–26.
7. Mishra A.K., Skrepnik N.V., Edwards S.G., Jones G.L., Sampson S., Vermillion D.A., Ramsey M.L., Karli D.C., Rettig A.C. Efficacy of platelet-rich plasma for chronic tennis elbow: a double-blind, prospective, multicenter, randomized controlled trial of 230 patients // *Am J. Sports Med.* – 2014. – Vol. 42. – P. 463–471.
8. De Pascale M.R., Sommese L., Casamassimi A., Napoli C. Platelet Derivatives in Regenerative Medicine: An Update. *Transfus Med. Rev.* – 2015. – Vol. 29. – P. 52–61.
9. Stacey M.C., Mata S.D., Trengove N.J., Mather C.A. Randomised doubleblind placebo controlled trial of topical autologous platelet lysate in venous ulcer healing // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* – 2000. – Vol. 20. – P. 296–301.
10. Al-Ajlouni J., Awidi A., Samara O., Al-Najar M., Tarwanah E., Saleh M., Awidi M., Hassan F.A., Samih M., Bener A., Dweik M. Safety and Efficacy of Autologous Intra-articular Platelet Lysates in Early and Intermediate Knee Osteoarthritis in Humans: A Prospective Open-Label Study // *Clin. J. Sport. Med.* – 2015. – Vol. 25. – № 6. – P. 524–528.
11. Стимуляция регенераторных процессов в хронических ранах с помощью богатой тромбоцитами аутоплазмы: клинико-экспериментальное исследование / В.Н. Оболенский [и др.] // *Клин. и эксперимент. хир. Журн. им. акад. Б.В. Петровского*. – 2016. – № 1. – С. 38–43.
12. Roos E., Marck M.D., Kim L.M., Gardien K.L.M., Stekelenburg C.M., Vehmeijer M., Baas D., Tuinebreijer W.E., Breederveld R.S., Middelkoop E. The application of platelet-rich plasma in the treatment of deep dermal burns: A randomized, double-blind, intra-patient controlled study // *Wound Repair and Regeneration J.* – 2016. – Vol. 24. – № 4. – P. 712–720.
13. Suthar M., Gupta S., Bukhari S., Ponemone V. Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet-rich plasma: a case series // *J. of Biomedical Science*. – 2017. – Vol. 24. – № 16. – P. 1–9.
14. Парамонов Б.А., Порембский Я.О., Яблонский В.Г. Ожоги. Руководство для врачей. – СПб.: Спец. Лит, 2000. – 480 с.
15. Шанский Я. Лизат тромбоцитов человека, как ростовая добавка для культивирования различных типов клеток: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Москва, 2016. – 17 с.
16. Lathrop B., Thomas K., Glaser L. Control of myogenin C differentiation by fibroblast growth factor is mediated by position in the G1 phase of the cell cycle // *Cell Bioi.* – 1985. – Vol. 101. – P. 2194–2198.
17. Lanz T.V., Opit C.A., Ho P.P., Agrawal A., Lutz C., Weller M., Mellor A.L., Steinman L., Wick W., Platten M. Mouse mesenchymal stem cells suppress antigen-specific TH cell immunity independent of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) // *Stem Cells Dev.* – 2010. – Vol. 19. I. 5. – P. 657–668.