

# Вміст факторів росту та фактора 1 $\alpha$ , індукованого гіпоксією, в рановому ложі шкіри щурів різного віку

Н.Р. Грицевич<sup>1</sup>, В.В. Верещака<sup>2</sup>, Л.І. Степанова<sup>2</sup>, Н.С. Нікітіна<sup>2</sup>, Т.В. Берегова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Вищий навчальний комунальний заклад Львівської обласної ради «Львівська медична академія ім. Андрія Крупинського»;

<sup>2</sup>Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; e-mail: vvv090675@gmail.com

*Метою роботи було визначення вмісту фактора росту ендотелію судин (VEGF), фактора росту нервів (NGF) та фактора 1 $\alpha$ , індукованого гіпоксією (HIF-1 $\alpha$ ), в шкірі 40 щурів-самиць різного віку (3 і 12 міс) після закриття ранового ложа. В кожній віковій групі 10 щурів були контрольними (без оперативних утручань), а 10 інших проводили операції фейсліфтингу та змодельовані різані рани на передній черевній стінці (5 см  $\times$  0,5 см). Фіксували тривалість загоєння ранових поверхонь і різних вікових груп. Імуноферментним методом визначали вміст VEGF, NGF та HIF-1 $\alpha$ . Встановлено, що у 3-місячних щурів повне загоєння ранової поверхні після операції фейсліфтингу відбувалося через 14,0  $\pm$  1,0 днів, а на передній черевній стінці – через 13,0  $\pm$  1,0 днів. У 12-місячних щурів тривалість загоєння ранової поверхні після операції фейсліфтингу та різаної рани на передній черевній стінці зростала до 17,0  $\pm$  1,5 днів. У рановому ложі вміст HIF-1 $\alpha$  у 3-місячних щурів зростав на 60,7%, а у 12-місячних – на 231,6%, вміст VEGF та NGF у 3-місячних щурів – на 14,8 та 11,7% відповідно, а у 12-місячних щурів – на 182,4 та 152,6%. Зроблено висновок про більш виражену гіпоксію в ділянках шкіри після оперативних утручань у 12-місячних щурів порівняно з 3-місячними, що може бути причиною післяопераційних ускладнень.*

*Ключові слова:* різані рани; шкіра; фактори росту; фактор 1 $\alpha$ , індукований гіпоксією.

## ВСТУП

Омолодження обличчя залишається однією з найчастіше запитуваних естетичних процедур. Найвідомішою хірургічною технікою є підтяжка обличчя (ритидектомія), і багато хто вважає її стандартом для лікування структур старіння [1]. Незважаючи на велику різноманітність хірургічних методів, вона зберігає спільну мету – відновлення вікових анатомічних змін. За даними косметичної національної бази даних американського товариства естетичних пластичних хірургів у 2014 р. виконано 126713 операцій фейсліфтингу (кругова підтяжка обличчя) [2], а у 2019 р. – 68983 таких операцій [3]. Це дуже популярна естетична хірургічна процедура, яку виконують у пацієнтів віком за 65 років [2].

Хоча загальна частота серйозних ускладнень після операції фейсліфтингу є низькою,

будь-яке ускладнення може мати потенційно руйнівний косметичний результат та створювати значне фінансове навантаження на пацієнта та хірурга [4]. Найбільш поширеними ускладненнями після підтяжки обличчя є гематома, некроз, сероми, розшарування ран, гіпертрофічні рубці, пошкодження нервів, алопеція, нерівності контуру та інфекція [5–7].

Одним із факторів, що впливає на швидкість загоєння, формування нормального, а не гіпертрофованого або келоїдного рубця, та зумовлює частоту післяопераційних ускладнень є вік пацієнтів [4, 8]. Такий загальноновизнаний факт іноді спростовується поодинокими працями, в яких доводиться, що вік, стать, наявність цукрового діабету і його тривалість, а також супутньої патології не впливають на гоєння ран [9]. У низці фун-

даментальних праць на основі аналізу літератури та власних результатів автори дійшли висновку, що вік залишається мало вивченим фактором, який впливає на гоєння ранового процесу [10]. Це підтверджує актуальність обраного дослідження.

Однозначно відповісти на питання, чи є вік фактором ризику післяопераційних ускладнень, можна буде після дослідження біохімічних процесів у рановому ложі у тварин різних вікових груп. Нами були обрані фактор росту ендотелію судин (VEGF), фактор росту нервів (NGF) та фактор  $1\alpha$ , індукований гіпоксією (HIF- $1\alpha$ ). Роль цих чинників у реепітелізації доведена. Перед нами постало питання визначити вміст указаних факторів після повного закриття ранової поверхні у зв'язку із дослідженням післяопераційних ускладнень.

Ангіогенез є необхідним компонентом відновлення тканини, оскільки судини забезпечують клітини в ділянці ранового процесу нутрієнтами і киснем. Основний індуктор ангіогенезу – VEGF, який стимулює міграцію ендотеліальних клітин, їх проліферацію, збирання в трубки та формування кровоносної сітки [11]. Крім того, він є відповідальним за утворення колагену [12].

Збільшуються докази того, що нейтрофіни, а саме NGF та його рецептори, мають велике значення у загоєнні ран [13, 14]. NGF був першим членом родини відкритих нейротропних факторів і є основним нейротропним фактором для розвитку і захисту центральної та периферичної нервової системи [15]. До того ж він впливає на загоєння ран. Наприклад, сприяє проліферації фібробластів і кератиноцитів, експресії та секреції компонентів позаклітинного матриксу, ангіогенезу та диференціації міофібробластів [16, 17]. HIF-1 відіграє важливу роль в ангіогенезі, старінні, імунитеті проти деяких хвороб та в патогенезі низки захворювань [18]. Таким чином всі досліджувані фактори залучені в ангіогенез, порушення якого (зменшення або збільшення) призводить до ускладнень

у післяопераційному періоді.

Метою нашої роботи було визначити вміст факторів росту VEGF, NGF та HIF- $1\alpha$  у рановому ложі шкіри щурів після його реепітелізації.

## МЕТОДИКА

Дослідження проведені відповідно до рекомендацій Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), правил Міжнародного комітету редакторів медичних журналів (ICMJE), а також рекомендацій «Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах» (Київ, 2006).

Експерименти здійснювали на 40 білих нелінійних лабораторних щурах, 20 з яких були віком 3 міс, а 20 інших – 12 міс. Ми обрали щурів віком 12 міс у зв'язку з тим, що за даними літератури перші ознаки старіння у цих тварин саме у цьому віці [19].

Кожна вікова група була розділена на 2 підгрупи. Перша підгрупа слугувала контролем. У щурів другої підгрупи в кожній віковій групі виконували операцію фейсліфтингу, після чого моделювали різані рани на передній черевній стінці [20]. Для цього ми робили розріз по серединній лінії живота і вирізали лоскут шкіри довжиною 5 см та шириною 0,5 см. Потім через кожний сантиметр накладали шви і обробляли ранову поверхню 10%-м розчином бетадіну. Фіксували тривалість загоєння ранових поверхонь. У день повного загоєння тварин умертвляли. Матеріалом для біохімічних досліджень слугувала шкіра в ділянках ранового ложа. У щурів контрольної групи вирізали шкіру в тих самих місцях, як у тварин дослідних груп. Шкіру гомогенізували та імуноферментним методом у ній визначали вміст факторів росту та HIF- $1\alpha$ .

Результати досліджень піддавали статистичній обробці з використанням методів варіаційної статистики в програмі Statistica

8.0. Отримані результати тестували на нормальність розподілу за допомогою тесту Шапіро–Уїлка. Оскільки вони виявилися нормально розподіленими, для порівняння вибірок був використаний критерій t Стьюдента. Результати представлені у вигляді  $M \pm SD$  [21].

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених досліджень встановлено, що у 3-місячних щурів повне загоєння ранової поверхні на голові після операції фейсліфтингу відбувалося через  $14,0 \pm 1,0$  днів, а на передній черевній стінці – через  $13,0 \pm 1,0$  днів. Отже, статистично достовірної різниці між тривалостями гоєння різаних ран у різних ділянках тіла 3-місячних щурів не було.

У 12-місячних щурів тривалість загоєння ранової поверхні на голові після операції фейсліфтингу зростала до  $17,0 \pm 1,5$  днів, що на 21,4% ( $P < 0,05$ ) перевищувало таку у 3-місячних щурів. Загоєння різаних ран на передній черевній стінці також відбувалося за  $17,0 \pm 1,5$  днів. Таким чином, статистично достовірної різниці між тривалостями гоєння різаних ран в різних ділянках тіла 12-місячних щурів не було. Щоденний огляд тварин

показав, що загоєння ран у всіх групах тварин відбувалося під первинним натягом, без ускладнень, в тому числі і без бактеріального інфікування рани.

У контрольних щурів різниці у вмісті факторів росту та HIF-1 $\alpha$  в шкірі у різних ділянках тіла (голова та передня черевна стінка) не було. Також була відсутня різниця у вмісті досліджуваних показників після реепітелізації ранового ложа на голові та передній черевній стінці. Це давало можливість отримувати більше біоматеріалу після закінчення експерименту.

Як видно з рис. 1, у щурів 3-місячного віку після повної реепітелізації ранового ложа вміст в ньому VEGF, NGF і HIF-1 $\alpha$  були більшими порівняно з неоперованою шкірою інтактних щурів відповідно на 14,8% ( $P < 0,05$ ), 11,7% ( $P < 0,05$ ) та 60,7% ( $P < 0,01$ ). Найбільш виражене зростання було характерним для HIF-1 $\alpha$ .

У 12-місячних щурів контрольної групи вміст VEGF, NGF і HIF-1 $\alpha$  в шкірі був відповідно на 37,0% ( $P < 0,05$ ), 20,8% ( $P < 0,05$ ) та 32,1% ( $P < 0,01$ ) меншим порівняно з 3-місячними щурами контрольної групи (рис. 2).

Як і у 3, у 12-місячних тварин після повної реепітелізації ранового ложа вміст у ньому VEGF, NGF і HIF-1 $\alpha$  був більшим порівняно

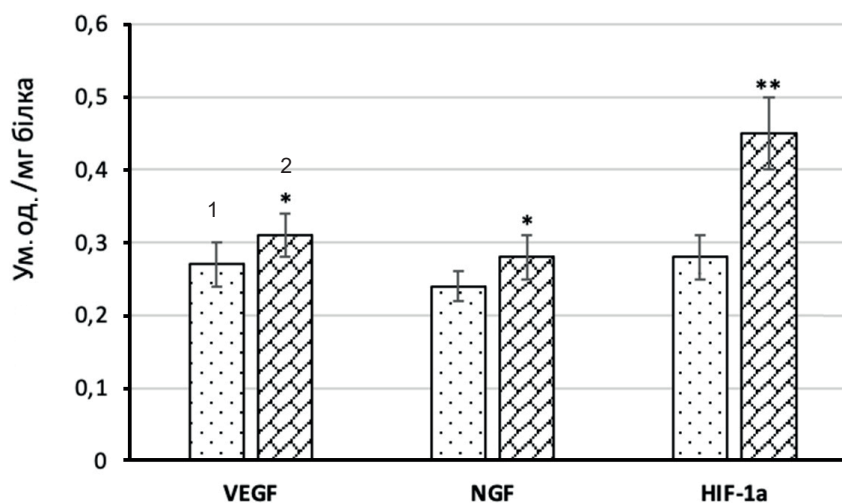


Рис. 1. Вміст факторів росту (VEGF і NGF) та фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1 $\alpha$ ) у шкірі 3місячних щурів після повної реепітелізації ранового ложа: 1 – контроль, 2 – дослід. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  щодо контролю

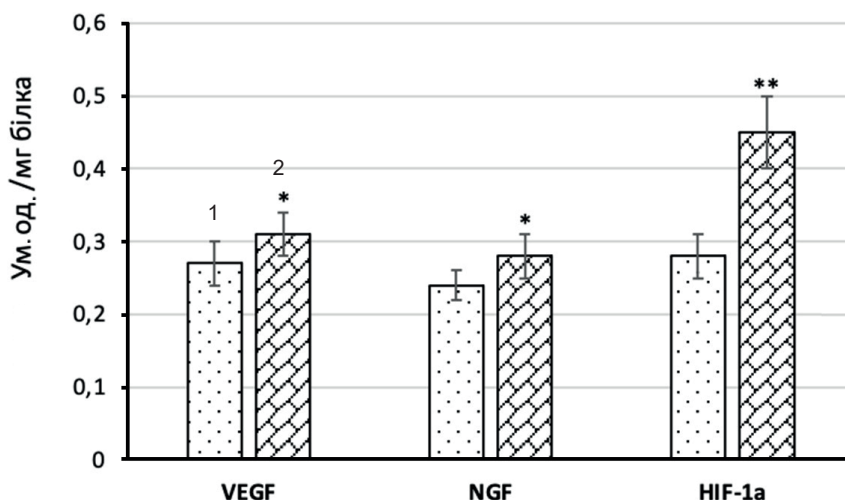


Рис. 2. Вміст факторів росту (VEGF і NGF) та фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1α) у шкірі інтактних щурів віком 3 (1) та 12 (2) міс. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01 щодо контролю

з неоперованою шкірою інтактних 12-місячних щурів відповідно на 182,4% (P < 0,01), 152,6% (P < 0,01) та 231,6% (P < 0,001; рис. 3).

Серед усіх ангіогенних факторів сімейство VEGF є основним в неоангіогенезі. Після народження рівень експресії цього фактора прогресивно зменшується і в дорослому віці він у більшості тканин знаходиться на достатньо низькому рівні, за виключенням тканин з активним ангіогенезом: яєчники, матка, шкіра [22]. Це певною мірою пояснює зменшення вмісту VEGF в шкірі інтактних 12-місячних

щурів щодо значень у щурів віком 3 міс. Оскільки ангіогенез активується у відповідь на пошкодження тканин для їх регенерації, то зростання вмісту VEGF у рановому ложі після його реепітелізації у щурів різних вікових груп відповідає загальноприйнятим уявленням про механізми реепітелізації ушкодженої шкіри. Далі виникає питання, чому зростання вмісту VEGF у рановому ложі після його реепітелізації у 12-місячних щурів було в 12,3 раза більшим, ніж у 3-місячних? Логічно припустити, що це пов'язано з біль-

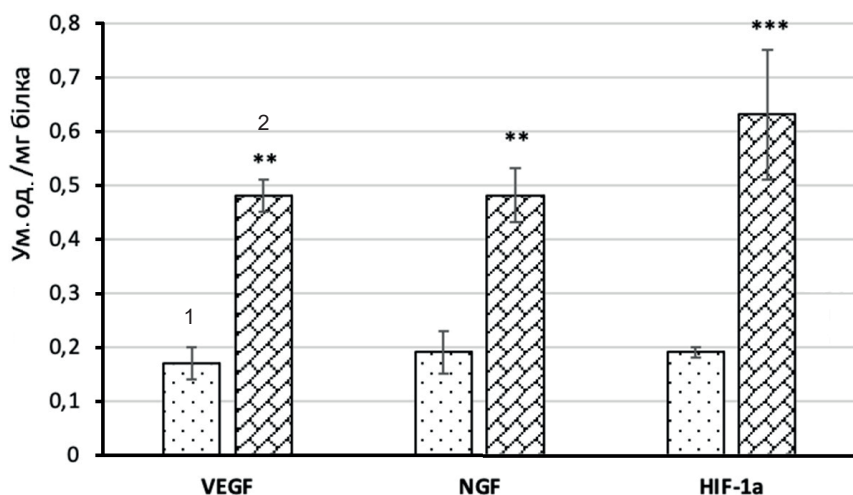


Рис. 3. Вміст факторів росту (VEGF і NGF) та фактора, індукованого гіпоксією (HIF-1α) у шкірі 12-місячних щурів після повної реепітелізації ранового ложа. \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001 щодо контролю

шою тривалістю загоєння у 12-місячних щодо 3-місячних щурів. Зважаючи на те, що VEGF є відповідальним за утворення колагену [12], ми зробили висновок, що за певних обставин цей факт може бути причиною розвитку гіпертрофованого або келоїдного рубця.

Слід відмітити надмірне зростання вмісту HIF- $1\alpha$  в рановому ложі після його реепітелізації у щурів різних вікових груп. Єдиним логічним поясненням, на наш погляд, є накопичення колагенів, які забезпечують міцність рубця. Фібробласти не тільки синтезують колагени, але, як і у разі спайок, очевидно продукують підвищений базальний вміст трансформуючого фактора росту  $\beta 1$  та VEGF [12]. Відомо, що гіпоксія стимулює фіброз тканин за допомогою активації HIF- $1\alpha$  [23]. Тому суттєве зростання вмісту останнього в рановому ложі після його реепітелізації є свідченням гіпоксії, яка зберігається в ділянці колишньої ранової поверхні після її загоєння. У 12-місячних щурів більший вміст HIF- $1\alpha$  вказує на більш виражену гіпоксію щодо значень 3-місячних щурів. Якщо гіпоксія триватиме і далі, це може призвести надалі до післяопераційних ускладнень.

## ВИСНОВКИ

1. У 12-місячних щурів тривалість загоєння різаних ран на голові та передній черевній стінці була на 3 дні довшою, ніж у щурів віком 3 міс.

2. У щурів 3-місячного віку після повної реепітелізації ранового ложа вміст в ньому VEGF, NGF і HIF- $1\alpha$  були більшими порівняно з неоперованою шкірою інтактних щурів на 14,8, 11,7 та 60,7% відповідно.

3. У 12-місячних щурів контрольної групи вміст VEGF, NGF і HIF- $1\alpha$  в шкірі був статистично достовірним меншим порівняно з 3-місячними шурами контрольної групи.

4. У 12-місячних тварин після повної реепітелізації ранового ложа вміст в ньому VEGF, NGF і HIF- $1\alpha$  були більшими порівняно з неоперованою шкірою інтактних

щурів цього віку на 182,4, 152,6 та 231,6% відповідно.

5. Виявлені вікові зміни у вмісті VEGF, NGF і HIF- $1\alpha$  в рановому ложі після його реепітелізації можуть бути причиною післяопераційних ускладнень.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**N.R. Hrytsevych<sup>1</sup>, V.V. Vereschaka<sup>2</sup>,  
L.I. Stepanova<sup>2</sup>, N.S. Nikitina<sup>2</sup>, T.V. Beregova<sup>2</sup>**

## CONTENT OF GROWTH FACTORS AND HYPOXIA-INDUCIBLE FACTOR IN THE SKIN OF RATS OF DIFFERENT AGE AFTER WOUND HEALING

<sup>1</sup>Higher educational communal institution of the Lviv regional council "Andrei Krupinsky Lviv Medical Academy", Lviv;

<sup>2</sup>Educational and Scientific Center "Institute of Biology and Medicine" of Taras Shevchenko National University of Kyiv; e-mail: vvv090675@gmail.com

The aim of the study was to determine the content of vascular endothelial growth factor (VEGF), nerve growth factor (NGF) and hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF- $1\alpha$ ) in the skin of 40 female rats of different ages (3 and 12 mo) after closure of the wound bed. In each age group composed of 20 rats, 10 rats served as a control group, and in remaining rats a facelift operation was performed and cut wounds on the anterior abdominal wall (5 cm  $\times$  0.5 cm) were simulated. The duration of wound surface healing in rats of different age groups was recorded. On the day of complete healing, the animals were killed, and the skin was cut in the areas of the former wound bed. In control rats, the skin was excised in the same places. The content of VEGF, NGF and HIF- $1\alpha$  was determined in the skin by enzyme-linked immunosorbent assay. It was found that in the group of young (3-month-old) rats, complete healing of the wound surface after facelift surgery occurred after  $14.0 \pm 1.0$  days, and on the anterior abdominal wall - after  $13.0 \pm 1.0$  days. In 12-month-old rats, the duration of wound surface healing after facelift surgery and incised wound on the anterior abdominal wall increased to  $17.0 \pm 1.5$  days. In the former wound bed, the content of HIF- $1\alpha$  in young rats increased by 60.7%, and in 12-month-old rats - by 231.6%. In the former wound bed, the content of VEGF and NGF in

young rats increased by 14.8 and 11.7%, respectively, and in 12-month-old rats - by 182.4 and 152.6%, respectively. It was concluded that more pronounced hypoxia in the skin after surgery in 12-month-old rats may be the cause of postoperative complications.

Key words: cut wounds, skin; growth factors; hypoxia-inducible factor 1alpha.

## REFERENCES

- Warren RJ, Aston SJ, Mendelson BC. Face lift. *Plast Reconstr Surg.* 2011; 128:747e-764e.
- Cosmetic surgery national data bank statistics. *Aesthet Surg J.* 2015; 35(Suppl 2):1-24.
- The Aesthetic Society's Cosmetic Surgery National Data Bank: Statistics 2019. *Aesthet Surg J.* 2020; 40(Suppl 1):1-26.
- Gupta V, Winocour J, Shi H, Shack RB, Grotting JC, Higdon KK. Preoperative Risk Factors and Complication Rates in Facelift: Analysis of 11,300 Patients. *Aesthetic Surg J.* 2016; 36(1):1-13.
- Mustoe T, Park E. Evidence-based medicine: face lift. *Plast Reconstr Surg.* 2014; 133:1206-1213.
- Chaffoo RAK. Complications in facelift surgery: avoidance and management. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2013; 21:551-558.
- Pitanguy I, Machado BHB. Facial rejuvenation surgery: a retrospective study of 8788 cases. *Aesthet Surg J.* 2012; 32:393-412.
- Martin P., Nunan R. Cellular and molecular mechanisms of repair in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol.* 2015 Aug; 173(2):370-378.
- Barinova M.E. Pathogenes of wound process disturbance in conditions of diabetes mellites. *Avtoref. ... doct. med. sci.* 14.03.04 – pathophysiology. Donetsk: 2011. 38 p. [Ukr.]
- Eming S.A., Martin P., Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med.* 2014 Dec; 6(265):265 sr6.
- Zakharova N.B., Durnov D.A., Mykhailov V.Yu. Diagnostic value of the study of vascular endothelial growth factor in blood serum. *Fundamental investigations.* 2011; 11:215-220. [Rus]
- Volyanska A.V. Pathogenetic substantiation of adhesion prevention during gynecological operations in women of reproductive age (clinical-experimental study). *Diss. ... doct. med. sci.* 14.01.01 – obstetrics and gynecology. Odessa: 2016. [Ukr]
- Chen J.C., Lin B.B., Hu H.W., Lin C., Jin W.Y., Zhang F.B., Zhu Y.A., Lu C.J., Wei X.J., Chen R.J. NGF accelerates cutaneous wound healing by promoting the migration of dermal fibroblasts via the PI3K/Akt-Rac1-JNK and ERK pathways. *Biomed Res Int.* 2014; 2014(547187).
- Gostynska N., Pannella M., Rocco M.L., Giardino L., Aloe L., Calza L. The pleiotropic molecule NGF regulates the in vitro properties of fibroblasts, keratinocytes, and endothelial cells: Implications for wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2020;318:C360–C371.
- Liu Z., Wu H., Huang S. Role of NGF and its receptors in wound healing (Review). *Exp Ther Med.* 2021 June; 21(6):599.
- Liu Z., Cao Y., Liu G., Yin S., Ma J., Liu J., Zhang M., Wang Y. p75 neurotrophin receptor regulates NGF-induced myofibroblast differentiation and collagen synthesis through MRTF-A. *Exp Cell Res.* 2019; 383(111504).
- Troullinaki M, Alexaki VI, Mitroulis I, Witt A, Klotzsch-von Ameln A, Chung KJ, Chavakis T, Economidou M. Nerve growth factor regulates endothelial cell survival and pathological retinal angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2019; 23:2362–2371.
- Radchenko O.M., Fedyk O.V. Inflammation, hypoxia, and anemia in pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: literature review and own research. *Ukrainian pulmonological journal.* 2021; 2:58-62.
- Martynova Yu.V. Effect of rhythmic extreme cooling and cord blood on state of neurohumoral regulation systems in dynamics of rats' aging. *Diss. ... cand.biol.sci. (Doctor of Philosophy)* 03.00.19 – cryobiology. Kharkiv: 2018.
- Yakovleva L.V., Tkachova O.V., Butko O.V., Laryanovska Yu.B. Experimental study of new drugs for topic treatment of wounds: metod. rek. DEC of Ministry of Health of Ukraine. K.: DEC of Ministry of Health of Ukraine, 2013. – 52 p. [Ukr]
- Rebrova O.Yu. Statistical analysis of medical data. Application package application STATISTICA. M.: Media Sphera. 2002. 312 p. [Rus]
- Chumak Z.V., Zelinsky O.O., Shapoval M.V., Manasova G.S., Kuhar N.M. Endometrium and HIF and VEGF as molecular tissue regulatory factors in hypoxia. *Women Health.* 2015; 15(105):78-80. [Rus]
- Kim J., Kim B., Kim S.M., Yang C.E., Song S.Y., Lee W.J., Lee J.H. Hypoxia-Induced Epithelial-To-Mesenchymal Transition Mediates Fibroblast Abnormalities via ERK Activation in Cutaneous Wound Healing. *Int J Mol Sci.* 2019 May; 20(10):2546.

*Матеріал надійшов до редакції 18.10.2021*