

UDC: 616.5-002.4:616.379-008.64]-085:615.36

[https://doi.org/10.32345/USMYJ.3\(141\).2023.138-147](https://doi.org/10.32345/USMYJ.3(141).2023.138-147)

Received: June 22, 2023

Accepted: September 03, 2023

Вплив аутологічного плазміногену на швидкість загоєння хронічних ран шкіри у пацієнтів з цукровим діабетом та рівень протеїнів – маркерів гіпоксії та ангіогенезу

Бадзюх Сергій¹, Петренко Олег¹, Безродний Борис¹, Тихомиров Артем²¹Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, Київ, Україна²Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, Україна

Address for correspondence:

Badziukh Sergiy

E-mail: serhiybadzyuh@ukr.net

Анотація: хронічні діабетичні рани є ускладненням перебігу цукрового діабету, які розвиваються внаслідок токсичної дії гіперглікемії, що призводить до порушення обмінних процесів із розвитком імуносупресії, ангіопатій, нейропатій та остеоартропатії. Накопичено значний об'єм експериментальних даних, які свідчать, що участь системи плазміноген-плазміну у загоєнні ран полягає не лише в очищенні ран від фібринових згустків, але й у тонкому регулюванні активності клітин, які забезпечують адекватний перебіг усіх стадій загоєння. Дану роботу було проведено з метою вивчення впливу аутологічного плазміногену на швидкість загоєння хронічних ран у пацієнтів із синдромом діабетичної стопи. В дослідженні брали участь 45 пацієнтів з гнійно-некротичною формою діабетичної стопи. Порівнювали ефективність місцевого застосування стандартних лікарських засобів з аплікаціями аутологічного плазміногену. Визначали площу рани один раз на дві доби, до повного загоєння. Для вивчення молекулярних механізмів впливу плазміногену на процес загоєння ран визначали рівень маркерних протеїнів ключових фізіологічних процесів, асоційованих з загоєнням, а саме, гіпоксії та ангіогенезу. Оцінювали рівні білкових регуляторів ангіогенезу (фактор росту ендотеліальних клітин (VEGF), гіпоксія-індуцибельний фактор-1α (HIF-1α) та ангіостатини) у шкірній тканині ран на початку та в кінці лікування аутологічним плазміногеном у пацієнтів із хронічними діабетичними ранами, що мали нейропатичну форму діабетичної стопи. Рівні VEGF, HIF-1α та ангіостатинів визначали за допомогою вестерн-блоттингу. Нами встановлено, що ранова тканина у пацієнтів із хронічними діабетичними ранами до початку лікування характеризується зниженим рівнем VEGF, що являє нездатність даних ран до регенерації. Разом з тим, визначається підвищений рівень HIF-1α та ангіостатинів. Після проведення лікування за допомогою аплікацій аутологічного плазміногену відмічено достовірне збільшення експресії VEGF на тлі прогресивного зниження активності HIF-1α та ангіостатинів. Отримані результати вказують на те, що підвищена продукція ангіогенних інгібіторів може протидіяти ангіогенезу та сприяти невдалому загоєнню хронічної рани. Застосування аплікацій плазміногену зменшує рівень ангіостатинів в біоптатах ран, що дозволило підвищити рівень проангіогенних факторів. Лікування плазміногеном продемонструвало покращення стану ранової поверхні та перехід загоєння у проліферативну фазу за рахунок ініціації запального процесу в ранах. Результати планіметричного вимірювання

площі рани вказують на зменшення часу необхідного для повного загоєння рани у 5 разів в групі, яка отримувала аплікації плазміногену, в порівнянні з цим параметром у групі пацієнтів, які отримували стандартну терапію.

Ключові слова: цукровий діабет, хронічні виразки шкіри, плазміноген, гіпоксія-індукований фактор-1 α (HIF-1 α), фактор росту ендотелію судин (VEGF), ангіостатини.

Вступ

Цукровий діабет займає третє місце у світовій структурі захворюваності поступаючись за поширеністю серцево-судинним захворюванням та онкологічним хворобам. Поширеність захворювання на цукровий діабет постійно зростає і кількість хворих подвоюється кожні 15 років. Масові скринінгові дослідження вказують на те, що у більшості розвинених країн людей, страждаючих на важкі форми цукрового діабету, від 2 до 4% населення. 422 мільйони людей хворіють на цукровий діабет у всьому світі та 1,5 мільйона смертей щороку пов'язані з цим захворюванням. Передбачається, що до 2030 року кількість хворих на цукровий діабет зросте до 600 млн. Більше 1 млн 400 тисяч осіб в Україні зареєстровано, хворих на діабет (Jeffcoate WJ, et al., 2016). Діабетична стопа (ДС) – Захворювання стопи людини з наявним або раніше діагностованим цукровим діабетом, яке включає одне або більше з перерахованого: периферична нейропатія, захворювання периферичних артерій, інфекція, виразка(и), нейроостеоартропатія, гангрена або ампутація. (IWGDF 2023 update). ДС ускладнює перебіг захворювання майже у 25% пацієнтів з цукровим діабетом. Гангрена нижніх кінцівок у цих хворих виникає у 20 разів частіше, ніж у загальній популяції, що спричиняє 84% від усіх випадків ампутацій (Vas PRJ. et al., 2019). ДС становить одну з найбільш тяжких медико-соціальних проблем сучасності та найбільш часто призводить до госпіталізації та інвалідності пацієнтів з цією хворобою. Зважаючи на складність лікування та відносно високу вартість лікарських засобів, що, втім, не гарантує повного одужання і часто супроводжується розвитком побічних ефектів, пошук нових ефективних засобів патогенетичної терапії хронічних ран на сьогодні не втрачає своєї актуальності.

Загоєння ран є складним біологічним процесом, який складається з декількох стадій (гемостаз, запалення, міграція/проліферація клітин, ремоделювання), чітко скоординованих у просторі та часі. На відміну від гострих ран, загоєння хронічних дефектів шкіри часто гальмується на стадії запалення (Sanderson-Smith ML, De Oliveira DM, Ranson M, McArthur JD., 2012). Основними факторами, які спричиняють хронізацію загоєння є порушення хемотаксису клітин та фагоцитозу, підвищене утворення вільних радикалів, порушення синтезу колагену, дисбаланс цитокінів, дефіцит факторів росту, підсилення апоптозу та некротичної загибелі клітин в ушкодженій тканині, зниження їхнього проліферативного потенціалу. Хронічні рани також характеризуються низькою інтенсивністю реепітелізації, що виникає внаслідок зниження швидкості міграції і проліферації кератиноцитів.

Як відомо, протеази відіграють ключову роль у перебігу кожної фази загоєння, беручи участь у деградації екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), забезпечуючи ремоделювання тканин, а також регулюючи міграцію та проліферацію клітин, які залучені до реалізації запальних процесів й реепітелізації. Порушення активаторно-інгібіторного балансу протеолітичних систем є драматичною подією на шляху до хронічного перебігу репаративних процесів (Brubaker AL, Rendon JL, Ramirez L, Choudhry MA, Kovacs EJ. 2013) Ключовим протеїном, що координує молекулярно-клітинні процеси за загоєння ран, є плазміноген (Pg) – глікопротеїн з молекулярною масою 92 кДа, який синтезується у печінці та циркулює у крові у концентрації 1.8 – 2.2 μ M. Pg є каталітично неактивним зимогеном плазміну (Pm) – центральної протеази фібринолітичної системи (Stoscheck C.M., 1990).

На сьогодні накопичено значний об'єм експериментальних даних, які свідчать, що

участь P_g/P_m у загоєнні ран полягає не лише в очищенні ран від фібринових згустків, але й у тонкому регулюванні активності клітин, які забезпечують адекватний перебіг усіх стадій загоєння. Крім виконання фібринолітичної функції в гемостазі, система P_g/P_m бере участь у реалізації процесів, які лежать в основі репарації тканин, залучаючись до ремоделювання тканин, регулювання міграції клітин та апоптозу, ангіогенезу, ініціації та резолуції запалення (Tykhomurov AA, Yusova EI, Diordieva SI, Corsa VV, Grinenko TV. 2013). Встановлено, що P_g доставляється до місця пошкодження запальними клітинами ще на початкових етапах загоєння, де він бере участь в активації факторів росту, матриксних металопротеїназ (ММР), забезпечує міграцію кератиноцитів, моноцитів/макрофагів, функціонує як самостійна сигнальна молекула через активацію низки клітинних рецепторів (Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. 2013. Keragala CB, Medcalf RL. 2021). Завдяки низці плейотропних ефектів, які проявляє P_g у регулюванні процесів загоєння, у роботі (Shibuya M. 2008) він отримав назву «головний регулятор загоєння ран».

Згідно з даними експериментів, проведених на лабораторних тваринах, локальне застосування або системне введення P_g значно пришвидшує загоєння ран різної етіології. Зокрема, Shen та ін. показали, що введення P_g мишам з опіками шкіри пришвидшує загоєння у тварин за гострого ушкодження та значно покращує репаративні процеси у хронічних ранах за експериментальної гіперглікемії. В іншій роботі (Fallah M. et al., 2020) встановлено, що локальна аплікація P_g мишам з ранами шкіри, спричиненими радіацією, прискорює закриття ранових дефектів та зменшує ризик утворення фіброзного рубця. Авторами доведено, що терапевтичні ефекти цього протеїну реалізуються через модулювання транскриптому та репрограмування експресії низки генів, що відповідають за перебіг запальних процесів, розвиток фіброзу та стан метаболічних процесів, нормалізуючи їх. Попри широку доказову базу стосовно позитивних рано-загоєвальних ефектів P_g, продемонстрованих на різних експериментальних моделях, наразі

не існує даних щодо застосування цього протеїну плазми крові у клінічних цілях для лікування хронічних ран, зокрема, у пацієнтів з цукровим діабетом.

Мета

Метою представленої роботи було визначити ефективність локального застосування аутологічного P_g на швидкість загоєння хронічних ран шкіри пацієнтів із ДС на фоні цукрового діабету II типу. Для дослідження можливих молекулярних механізмів дії P_g було поставлено за завдання оцінити його вплив на рівень маркерних протеїнів ключових фізіологічних процесів, асоційованих із загоєнням, а саме, гіпоксії та ангіогенезу.

Матеріали і методи

В дослідженні брали участь 45 пацієнтів із хронічними ранами на тлі цукрового діабету (24 чоловіки, 21 жінка), які знаходились на амбулаторному лікуванні у ЦП МВС України. Вік пацієнтів становив від 48 до 81 років (середній вік 64,5 років). Усі пацієнти мали нейропатичну форму діабетичної стопи. У 36 хворих рани носили хронічний характер після перенесеного оперативного втручання, у 9 пацієнтів рани появились самостійно внаслідок недотримання правил догляду за ногами. Розміри ран коливались від 3 до 12 см². Рівень глікемії становив на початку експерименту 10 ± 0,2 ммоль/л, наприкінці експерименту – 7 ± 0,5 ммоль/л. В дослідження включали пацієнтів після нормалізації рівня глікемії, для виключення токсичної дії глюкози на тканини. Усі пацієнти мали хронічні рани (не загоювались протягом 6 тижнів з моменту виникнення) та згідно класифікації PEDIS мали параметри P₂ED₂I₂S₁. Пацієнтів було розділено на 2 групи, Основна (20 хворих) та контрольна – 25 хворих. За віком, статтю, наявною супутньою патологією групи були репрезентативні.

Місцеву обробку шкірних ран пацієнтам обох груп призначали згідно зі стандартними протоколами, які передбачали застосування антисептичних засобів (хлоргексидин 0,05%, повідон-йод, декасан), водорозчинних мазей (левомеколь, офлокаїн), протеолітичних засобів: ферменти при гнійних ранах (трипсин, хімотрипсин), стимулятори регенерації (метилурацил), гідроколоїдні та сорбуючі пов'язки

(Хартман гідрокол, Хартман тендер вед, Мепілекс Аг). Протягом усього періоду лікування всі хворі отримували цукрознижувальні препарати. В досліджуваній групі (І група) додатково до стандартної обробки рани місцево наносили аутологічний P_g на ділянку поранення в дозі 1,0 мг/мл стерильного забуференого фізіологічного розчину кожні 2 дні протягом 20 днів (загалом 10 аплікацій). Усі пацієнти підписували згоду на проведене лікування.

Нативну форму P_g (Glu-P_g) одержували зі свіжої цитратної плазми крові донорів (пацієнти з цукровим діабетом з дослідної групи) методом афінної хроматографії на Lys-сефарозі (GE Healthcare, Amersham, Велика Британія) за присутності інгібітора серинових протеїназ апротиніну (10 мг/мл) за Lijpen з мінорними модифікаціями. Чистоту одержаних препаратів P_g оцінювали за допомогою денатуруючого гель-електрофорезу в 10% поліакриламідному гелі (SDS-PAGE). Результати гель-електрофорезу свідчать, що препарати Glu-P_g, ізольованого з плазми крові донорів, були електрофоретично гомогенними (ступінь чистоти 99%). Перед використанням препарати P_g перевіряли на наявність спонтанної амідолітичної активності за допомогою фотометричного методу з використанням специфічного хромогенного субстрату плазміну S2251 та брали до роботи лише ті, які не проявляли спонтанної активності. Препарати протеїну концентрували, стерилізували ультрафільтрацією та зберігали за -20°C до використання.

Отриманий P_g розводили у стерильному фізіологічному розчині до концентрації 1 мг/мл та виконували аплікації стерильними серветками до ранової поверхні. Проводили курс 10 аплікацій 1 раз на 2 доби протягом 20 діб.

Визначення площі рани являється об'єктивним способом оцінки перебігу ранового процесу, що дозволяє провести порівняльний аналіз ефективності лікування. В дослідженні використовували програму Imito Wound 2.0.0.17 (розробник компанія ImitoAG Германія, <https://imito.io/en/imitowound>) на програмному забезпеченні системи Android. Imito Wound - медичний додаток, який вимірює пло-

щу шкірних вогнищ, новоутворень, або виразок будь якої форми без додаткових інструментів. Також програма дозволяє виконувати збереження і аналіз динаміки росту або загоєння. Планіметричні вимірювання проводили один раз на три доби в процесі лікування.

Для вимірювання площі рани фотографували разом з лінійкою. Щоб отримати точні дані, лінійку розміщували на одному рівні з об'єктом та проводили калібрування, після чого краї рани обводились за допомогою курсора. Програма Imito Wound проводить автоматичний підрахунок пікселів обведених фігур і розрахунок площі об'єкта що вимірюється по пропорції.

Дослідження вмісту біомаркерів проводили до проведення лікування P_g та на 18-у добу з початку експериментального лікування. Біоптати тканини з ранового ложа (100-150 мг) подрібнювали у скрапленому нітрогені та гомогенізували у 50 мМ трис-НСl буфері (рН 7,4), який містив 0,15 М NaCl, 0,1% SDS, 1,0% Triton X-100 та коктейль інгібіторів протеаз та фосфатаз (Pierce™ Protease and Phosphatase Inhibitor, ThermoScientific, США). Співвідношення тканина/буфер було 1/5 (m/v). Після гомогенізації екстракти тканин додатково обробляли ультразвуком за допомогою ультразвукового дезінтегратора Sartorius (Labsonic® M, Göttingen, ФРН) та центрифугували за 16 тис. г при 4 °С. Вміст загального протеїну в супернатантах визначали спектрофотометрично (Melincovici C.S., et al. 2017). Зразки розводили в електрофоретичному буфері Леммлі в співвідношенні 1/1, прогрівали на хітері до 90 °С протягом 5 хв. та зберігали за -20°C до аналізу.

Визначення рівнів маркерних протеїнів (фактор, що індукується гіпоксією – HIF-1 α , фактор росту ендотеліальних клітин судин – VEGF та ангіостатини – AS) проводили +вестерн-блот аналізом так, як описано раніше. Після проведення електрофоретичного розділення за допомогою SDS-PAGE протеїни з гелю переносили на нітроцелюлозну мембрану шляхом електроблоту. Для імунохімічної детекції протеїнів маркерів використовували наступні первинні антитіла: кролячі anti-HIF-1 α (Sigma Aldrich, США, no. HPA001275), ми-

шачі anti-VEGF (Invitrogen, США, no. MA5-12184), кролячі anti-AS (отримано, як описано раніше (Kuttikrishnan S, et all. 2017)). Як маркер адекватності нанесення загального протеїну використовувався тубулін (щурячі anti-tubulin YL1/2; Abcam, США). У роботі використовували наступні вторинні анти-видові антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому: anti-rabbit IgG, Abcam, США, ab6721; anti-mouse IgG, Abcam, США, ab197767; anti-rat IgG, Abcam, США, ab97057). Імунореактивні зони візуалізували за допомогою методу підсиленої хемілюмінесценції (ECL), використовуючи 0,25 М розчин люмінолу, 0,09 М розчин кумарової кислоти у 0,1 М трис-НСІ буфері (рН 8,5), що містив 0,0035% H_2O_2 як субстрат пероксидази, авторадіографією на рентгенівських плівках. Молекулярну масу протеїнів у зразках визначали, порівнюючи їхню міграцію з розташуванням на нітроцелюлозній мембрані забарвлених маркерів Page Ruler™ Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas, Литва, кат. № 26619) у діапазоні 10–230 кДа. Напівкількісний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою денситометрії забарвлених імунореактивних зон, використовуючи програмне забезпечення TotalLab (TL120, Nonlinear Inc, США). Вміст цільового протеїну виражали в умовних одиницях оптичної густини імунозабарвлення, віднесеної до густини поліпептидної зони тубуліну.

Для аналізу даних вестерн-блотів використовувався *U*-критерій Манна-Уїтні для оцінки відмінностей між середніми параметрами. Усі змінні були виражені як середнє \pm стандартна похибка середнього (SEM). Різниця між середніми вважалася статистично достовірною при $P < 0,05$. Для виконання всіх статистичних розрахунків використовувалося програмне забезпечення «OriginPro» (основна версія 9.0 SR2 Pro English).

Результати та обговорення

Хронічні ранові дефекти у пацієнтів з нейропатичною формою діабетичної стопи у пацієнтів основної групи були пов'язані із перенесеними попередніми оперативними втручаннями (ампутація пальців, розкриття гнійних процесів на кінцівці – 16 пацієнтів). У 4 пацієнтів рани утворились внаслідок не-

дотримання правил догляду за ногами та порушення біомеханіки стопи, які проявлялись обмеженням рухомості та деформації суглобів плоскостопією. Локалізація ран відповідала зонам максимального навантаження, переважно на підошовній поверхні. Клінічно рани характеризувались наявністю в'ялої, блідої грануляційної тканини, відсутністю перифокального запалення, помірною ексудацією та вогнищевими некрозами. Ранова поверхня була вкрита фібринозним нальотом. Крайова епітелізація була незначною та мала синюшній колір (Рис. 1, 0 доба). Як правило, пацієнти скарж на болі не виказували. На момент госпіталізації больовий синдром у хворих склав у середньому $2,43 \pm 0,12$ бали. Меншу виразність больового синдрому у пацієнтів можна пояснити відсутністю гострого запального процесу та тривалим перебігом ран, що в певній мірі впливає на формування болю. Після другої аплікації стан ранової поверхні та клінічні прояви зазнавали певних змін. У пацієнтів появились больові відчуття в ділянці ранової поверхні пекучого характеру. Протягом наступних трьох діб больовий синдром становив у середньому $4,83 \pm 0,2$ бали. У подальшому, починаючи з 8-ї доби лікування, пацієнти на болі не скаржились. Після третьої аплікації об'єктивно було відзначено наявну перифокальну гіперемію та набряк. Ранова поверхня набула червоного кольору із вираженою ексудацією. Оточуючі тканини були гарячі на дотик. У трьох пацієнтів було зазначено петехіальні висипи на шкірі навколо рани. Починаючи з 6-ї доби лікування стан пацієнтів покращувався. Набряки та гіперемія зменшувались, рани очищались від фібринового нальоту, ступень ексудації зменшувалась. Пацієнти зауважували на відсутність больового синдрому та в подальшому переносили аплікації безсимптомно (Рис. 1, 3-8 доба). На 14-у добу лікування аплікаціями аутологічного плазмінотену рани очищались (рис. 1, 14 доба). Слід зазначити повну відсутність фібрину та появу грануляційної тканини, яка була червоного кольору, дрібнозерниста. Ексудація скудна. Вміст серозного кольору, без запаху. На 18-ту добу відмічали появу крайової епітелізації та ретракцію площі рани. Ранова



0 доба



3 доба



8 доба



14 доба



20 доба

Рис. 1. Типова клінічна картина загоєння хронічної виразки стопи пацієнта з цукровим діабетом за застосування локальної аплікації аутологічного плазміногену

поверхня була чиста, вкрита грануляційною тканиною. Грануляції мали «здоровий» вигляд, були червоними та рихлими. На 20 добу розміри ран зменшувались, мала місце епітелізація ранової поверхні, яка покривала 75% грануляційної тканини. По краях формувалась ніжна рубцева тканина.

Згідно з усередненими даними планіметрії ранової поверхні, представленими на рис. 2, локальне застосування плазміногену сприяло закриттю рани у 5 разів швидше у порівнянні з цим параметром у групі порівняння (24 ± 4 та 120 ± 17 доби відповідно, $P < 0,01$).

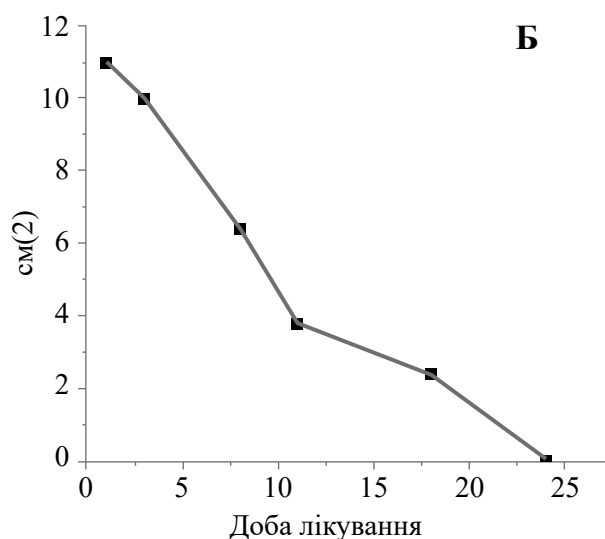
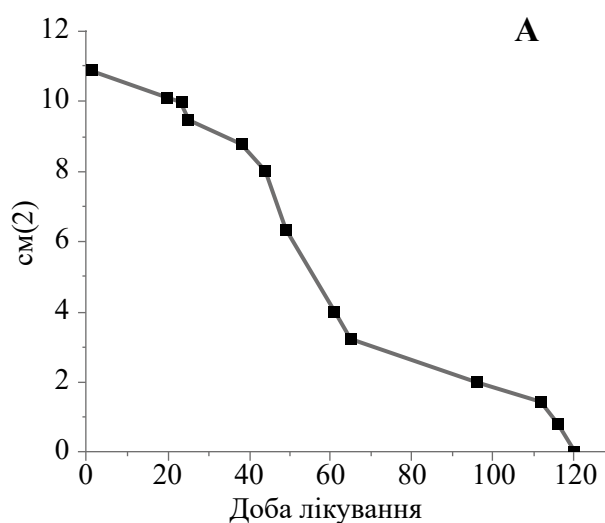


Рис. 2. Усереднені результати планіметричного вимірювання площі хронічних ран у пацієнтів контрольної групи (А) та пацієнтів за застосування локальної аплікації аутологічного плазміногену (Б).

За допомогою вестерн блоту було проведено кількісний аналіз біохімічних параметрів у біоптатах шкіри, відібраних з ранової поверхні пацієнтів до початку спостереження (0 доба) та на 18-у добу лікування з використанням аутологічного плазміногену. Додаткове до стандартного протоколу лікування хронічних ран зовнішнє застосування плазміногену призвело до статистично достовірного зменшення рівня HIF-1 α у 6,3 рази у порівнянні з цим показником до початку лікування ($P < 0,01$) (рис. 3).

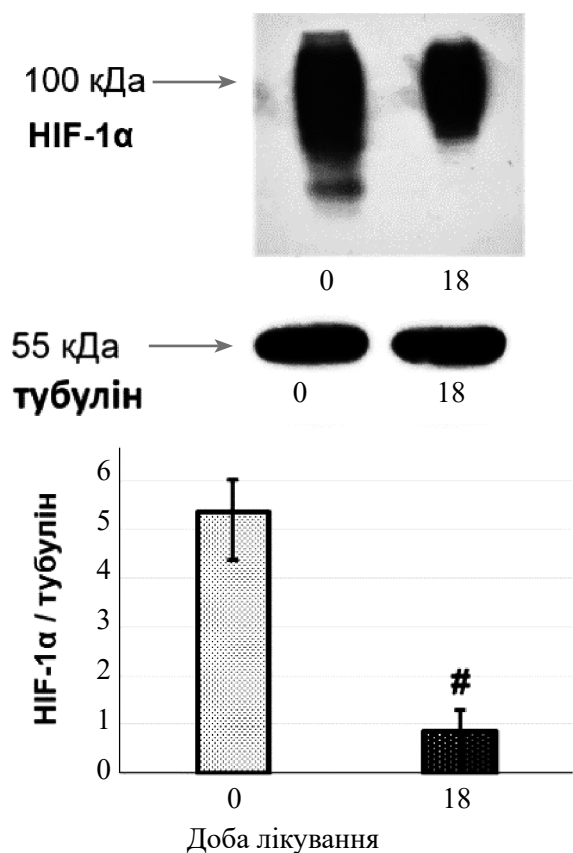


Рис. 3. Репрезентативна блотограма HIF-1 α у біоптатах хронічних ран та результати денситометричного аналізу (# - $P < 0,01$, U-тест Манна-Уїтні, $n = 20$)

На 18-у добу було показано достовірне збільшення рівня ростового фактора VEGF у 1,9 рази ($P < 0,05$) у порівнянні з його вмістом у рановій тканині до лікування (Рис. 4). Рівень ізоформ ангіостатинів, антагоністів VEGF, зменшився у середньому у 2,5 рази ($P < 0,05$) після застосування плазміногену в лікуванні трофічних виразок шкіри у порівнянні з відповідною величиною (рис. 4).

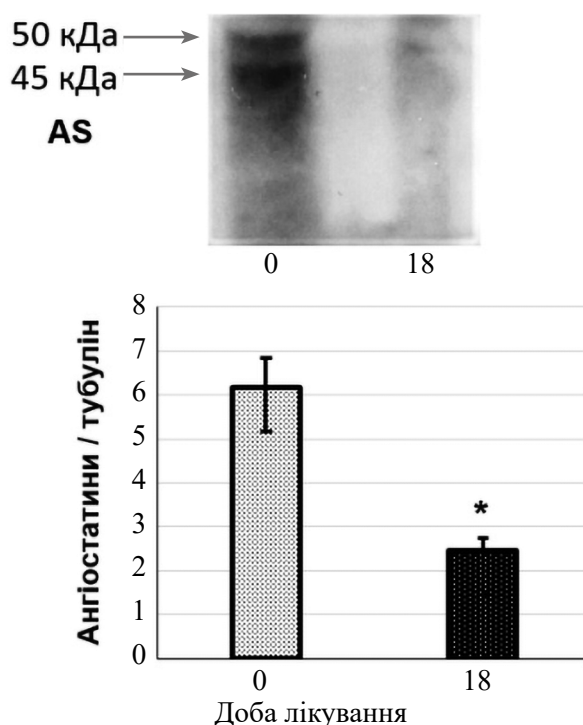


Рис. 4. Репрезентативна блотограма ангіостатинів (AS) у біоптатах хронічних ран та результати денситометричного аналізу (* - $P < 0,01$, U-тест Манна-Уїтні, $n = 20$)

Отримані результати імунохімічного аналізу біомаркерів свідчать, що плазміноген сприяє зменшенню ступеня гіпоксії в ушкодженій тканині та підсилює проангіогенне сигналювання (Diaz-Gonzalez JA, Russell J, Rouzaut A, Gil-Bazo I, Montuenga L.2005; Li L, Madu CO, Lu A, Lu Y. 2010; O'Reilly MS.1997.).

Ріст нових кровоносних судин, що забезпечує транспорт кисню є основою багатьох фізіологічних та патологічних процесів. Загоєння ран супроводжується активним ростом судин. Як відомо, головним регулятором ангіогенезу є вивільнення ангіогенних факторів, під дією яких відбувається активація ендотеліоцитів та міграція за межі базальної мембрани із формуванням гілок основних судин. Ріст нових судин детерміновано балансом між стимуляторами та інгібіторами (Keragala CB, Medcalf RL.2021). Значну роль в регуляції ангіогенезу відіграє фактор росту ендотелія судин VEGF (Vascular endothelial growth factor) та його рецептори. VEGF – потенційний мітоген для епітеліальних клітин судин, для мікро та макроvasкулярних клітин кровеносних та лімфатичних

судин. Він впливає на проникність судин, є потужним ангіогенним білком та приймає участь у процесах неоваскуляризації у патологічних станах (Arcondéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. 2013). Враховуючи той факт, що VEGF – це стрес-індукований білок, його регуляція порівнюється з іншими киснево- та глюкозорегулюєними білками; тому фізіологічний та ростовий ангіогенез слід розглядати як адаптивну відповідь на дефіцит кисню. У нашому дослідженні було встановлено, що на початку лікування рівень VEGF був виражений слабо та росту нових судин відмічено не було. Перетворення плазміногену на активну протеазу забезпечує очищення рани від фібрину, нейтрофілів, а також призводить до активації факторів росту та MMP, ремоделювання і формування нової сполучної тканини та судин (Shibuya M.2008). Слід зазначити, що згідно результатів досліджень (Brubaker AL, Rendon JL, Ramirez L, Choudhry MA, Kovacs EJ. 2013), у хронічних ранах активується інгібітор активатора плазміногену 1-го типу (plasminogen activator inhibitor, PAI1), який є важливим компонентом системи гемостазу та пригнічує дію активаторів плазміногену (Kolosovych, I.V., & Hanol, I.V. 2022). Під дією зовнішнього плазміногену даний фактор інактивується, що призводить до загоєння ран. Механізм даного процесу реалізується через активацію VEGF-індукованого ангіогенезу, опосередкованого фібробластами.

Ангіостатини (AS^o) – протеолітичні кринглівмісні фрагменти важкого ланцюга (Pg/Pm), які утворюються у міжклітинному матриксі та на поверхні клітин за участі матриксних металопротеїназ, катепсинів, еластази нейтрофілів та внаслідок аутопротеолізу Pm. Реалізація біологічної активності AS^o відбувається завдяки їх здатності специфічно пригнічувати проліферацію та міграцію ендотеліоцитів, індукувати апоптоз цих клітин та інгібувати синтез ендотеліального фактора росту (VEGF) (Cao Y., Xue L. 2004; Wahl M.L., Kenan D.J., Gonzalez-Gronow M, Pizzo S.V.2005.; Aulakh GK, Balachandran Y, Liu L, Singh B. 2014). В досліджуваних зразках діабетичних ран було відмічено значну активність AS, яка достовірно знижувалась під дією плазміногену у 2,5 рази ($p < 0,05$) (Рис. 5).

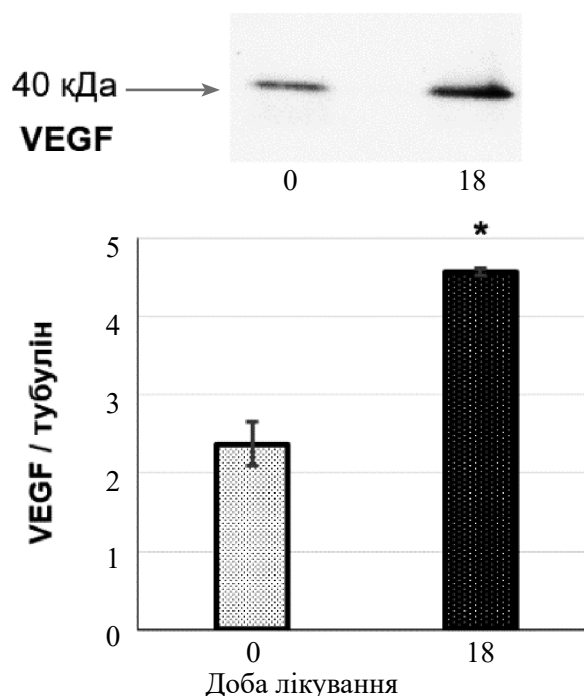


Рис. 5. Репрезентативна блотограма VEGF у біоптатах хронічних ран та результати денситометричного аналізу (* - $P < 0,01$, U-тест Манна-Уїтні, $n = 20$)

Таким чином, біохімічне дослідження тканин діабетичних ран засвідчило низьку проліферативну здатність тканин до регенерації. На це вказують низький рівень проангіогенних факторів (VEGF), з високою експресією HIF-1 та AS факторів (Rashid M, et all. 2021). В той же час, застосування аплікацій автологічного плазміногену дозволило реалізувати запальні процеси у хронічних ранах за рахунок активації прозапальних цитокінів, які дозволяють розірвати «порочне коло» хронічного запалення та перейти до наступної фази загоєння ран.

Висновки

В даному дослідженні нами показано, що місцеве застосування Pg, отриманого з плазми, має виражений сприятливий ефект у сприянні загоєнню виразки стопи у пацієнтів з діабетом. Pg може прискорити швидкість загоєння ран шляхом запобігання шкірної гіпоксії та посилення ангіогенної відповіді в тканині ранової області. Застосування аплікацій автологічного Pg дозволяє зменшити активність ангіостатинів, що дозволило підвищити рівень проангіогенних факторів. Місцеві добавки Pg представляють собою багатообіцяючу

стратегію для розробки нових терапевтичних підходів, які покращують загоєння ран у пацієнтів з діабетом, тоді як необхідні подальші тестування P_g для розробки засобів лікування дефектів шкіри іншого патогенезу.

Фінансування

Дослідження проведено за власні кошти

Конфлікт інтересів

Конфлікт інтересів відсутній

Згода на публікацію

Згода на публікацію отримано від усіх співавторів

ORCID ID та внесок авторів

[0000-0002-3175-1208](https://orcid.org/0000-0002-3175-1208) (A, C, D) Sergiy Badziukh

[0000-0002-4024-5438](https://orcid.org/0000-0002-4024-5438) (E, F) Oleg Petrenko

[0000-0002-7115-5339](https://orcid.org/0000-0002-7115-5339) (B, E) Boris Bezrodnyi

[0000-0003-2063-4636](https://orcid.org/0000-0003-2063-4636) (A, C, D) Artem

Tykhomyrov

A – Research concept and design, B – Collection and/or assembly of data, C – Data analysis and interpretation, D – Writing the article, E – Critical revision of the article, F – Final approval of article

ЛІТЕРАТУРА

- Aurandéguy T, Lacazette E, Millevoi S, Prats H, Touriol C. VEGF-A mRNA
Aulakh GK, Balachandran Y, Liu L, Singh B. Angiostatin inhibits activation and migration of neutrophils. *Cell Tissue Res.* 2014 Feb;355(2):375-96.
- Brubaker AL, Rendon JL, Ramirez L, Choudhry MA, Kovacs EJ. Reduced
Cao Y, Xue L. Angiostatin. *Semin Thromb Hemost.* 2004 Feb;30(1):83-93. complications in acute pancreatitis. *Fiziol. Zh.*, 2022; 68(1),56-61. <https://doi.org/10.15407/fz68.01.056>
- Diaz-Gonzalez JA, Russell J, Rouzaut A, Gil-Bazo I, Montuenga L. Targeting
Fallah M, Viklund E, Bäckman A, Brodén J, Lundskog B, Johansson M, Blomquist M, Wilczynska M, Ny T. Plasminogen is a master regulator and a potential drug candidate for the healing of radiation wounds. *Cell Death Dis.* 2020 Mar 23;11(3):201.
hypoxia and angiogenesis through HIF-1 α inhibition. *Cancer Biol Ther.* 2005 Oct;4(10):1055-62.
- International Working Group on the Diabetic F, the European Wound Management A. Reporting standards of studies and papers on the prevention and management of foot ulcers in diabetes: required details and markers of good quality. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016. 4(9):781-788.
- Jaap J. van Netten, Sicco A. Bus, Jan Apelqvist, Pam Chen, Vivienne Chuter, Robert Fritridge, Frances Game, Robert J. Hinchliffe, Peter A. Lazzarini, Joseph Mills ... See all authors Definitions and criteria for diabetes-related foot disease (IWGDF 2023 update)15 May 2023 <https://doi.org/10.1002/dmrr.3654>
- Jeffcoate WJ, Bus SA, Game FL, Hinchliffe RJ, Price PE, Schaper NC,
Keragala CB, Medcalf RL. Plasminogen: an enigmatic zymogen. *Blood.* 2021 May 27;137(21):2881-2889.
- Kolosovych, I.V., & Hanol, I.V. Hemocoagulation factors of hemorrhagic
Kuttikrishnan S, Tsakou M, Alali FQ, Dermime S, Mohammad RM, Uddin S.
Li L, Madu CO, Lu A, Lu Y. HIF-1 α Promotes A Hypoxia-Independent Cell
Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M,
Migration. *Open Biol J.* 2010 Jan 1;3:8-14.
- Moldovan IM, Roman AL, Mişu CM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455-467. neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age. *J Immunol.* 2013; 190(4): 1746-1757.
- O'Reilly MS. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS.* 1997;79:273-94. PMID: 9002223. processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. *Nucleic Acids Res.* 2013 Sep;41(17):7997-8010.
- Rashid M, Zadeh LR, Baradaran B, Molavi O, Ghesmati Z, Sabzichi M, Ramezani F. Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression. *Gene.* 2021 Sep 25;798.
- Sanderson-Smith ML, De Oliveira DM, Ranson M, McArthur JD. Bacterial plasminogen receptors: mediators of a multifaceted relationship. *J Biomed Biotechnol.* 2012
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor-dependent and -independent regulation of angiogenesis. *BMB Rep.* 2008 Apr 30;41(4):278-86.
- Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 1990; 182: 50-68.
- Tykhomyrov AA, Yusova EI, Diordieva SI, Corsa VV, Grinenko TV. Production and characteristics of antibodies against K1-3 fragment of human plasminogen. *Biotechnol Acta.* 2013; 6(1): 86-96.
- Vas PRJ, Rayman GA, Dhatariya K, Hartemann A, Driver VR, Piaggese A, Londahl M, Apelqvist J, Attinger C, Game F, International Working Group on the Diabetic F. Effectiveness of interventions to enhance healing of chronic ulcers of the foot in diabetes: a systematic review. *Diabetes/Metabolism Research Reviews* 2019. In Press

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges. *Curr Vasc Pharmacol.* 2017;15(4):339-351.

Wahl ML, Kenan DJ, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. *J Cell Biochem.* 2005 Oct 1;96(2):242-61.

The effect of autologous plasminogen on the rate of healing of chronic skin ulcers in patients with diabetes mellitus and the level of proteins - markers of hypoxia and angiogenesis

Badziukh Sergiy¹, Petrenko Oleg¹, Bezrodnyi Boris¹, Tykhomyrov Artem²

¹Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

²Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

Address for correspondence:

Badziukh Sergiy

E-mail: serhiybadzyuh@ukr.net

Abstract: *chronic diabetic wounds are a complication of diabetes mellitus that develop as a result of the toxic effects of hyperglycemia, which leads to metabolic disorders with the development of immunosuppression, angiopathy, and neuropathy. A considerable amount of experimental data has been accumulated, which indicates that the participation of the plasminogen-plasmin system in wound healing is not only to clear wounds of fibrin clots, but also to fine-tune the activity of cells that ensure an adequate course of all stages of healing. This study was conducted to investigate the effect of autologous plasminogen on the rate of chronic wound healing in patients with diabetic foot syndrome. The study involved 45 patients with purulent necrotic form of diabetic foot. The efficacy of topical application of standard medications was compared with the application of autologous plasminogen. The wound area was measured once every two days until complete healing. To study the molecular mechanisms of plasminogen effect on wound healing, the level of marker proteins of key physiological processes associated with healing, namely hypoxia and angiogenesis, was determined. The levels of protein regulators of angiogenesis (vascular endothelial cell growth factor (VEGF), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and angiostatins) in the skin tissue of wounds at the beginning and end of treatment with autologous plasminogen in patients with chronic diabetic wounds with neuropathic diabetic foot were evaluated. The levels of VEGF, HIF-1 α and angiostatins were determined by Western blotting. We have found that wound tissue in patients with chronic diabetic wounds before treatment is characterized by a reduced level of VEGF, which represents the inability of these wounds to regenerate. At the same time, an increased level of HIF-1 α and angiostatins is detected. After treatment with autologous plasminogen applications, a significant increase in VEGF expression was observed against the background of a progressive decrease in HIF-1 α and angiostatin activity. The results indicate that increased production of angiogenic inhibitors may counteract angiogenesis and contribute to the failure of chronic wound healing. The use of plasminogen applications reduces the level of angiostatins in wound biopsies, which allowed to increase the level of proangiogenic factors. Treatment with plasminogen demonstrated an improvement in the condition of the wound surface and the transition of healing to the proliferative phase due to the initiation of the inflammatory process in wounds. The results of planimetric measurement of the wound area indicate a 5-fold reduction in the time required for complete wound healing in the group receiving plasminogen applications compared to this parameter in the comparison group.*

Keywords: [diabetes mellitus](#), [skin](#), [plasminogen](#), [vascular endothelial growth factor \(VEGF\)](#), [angiostatins](#).



Copyright: © 2022 by the authors; licensee USMYJ, Kyiv, Ukraine.

This article is an **open access** article distributed under the terms

and conditions of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)