



УДК 616-001.1-07:611.018.21:57  
DOI: 10.35693/2500-1388-2022-7-4-232-238



## Продукция факторов роста фибробластами в условиях раневого процесса и при воздействии матрикса бактериальной биопленки

© Ю.И. Ярец

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (Гомель, Республика Беларусь)

### Аннотация

**Цель** – проанализировать продукцию фибробластами факторов роста в условиях раневого процесса и при воздействии матрикса бактериальной биопленки.

**Материал и методы.** Оценивали уровни факторов роста: VEGF, TGF-1 $\beta$ , GM-CSF, FGF, продуцируемых фибробластами грануляционной ткани ОР (группа 1, n=9) и ХР (группа 2, n=17). Для сопоставления данных использовали фибробласты кожи (n=5). Первичные культуры получали методом экплантатов. В эксперименте применяли матрикс биопленки *S. aureus*, *E. faecalis*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* (по 5 каждого вида).

**Результаты.** Повышенные уровни TGF-1 $\beta$  и VEGF, секретируемые первичными культурами фибробластов, на фоне отсутствия изменений со стороны значений FGF и GM-CSF, являются критериями дисбаланса факторов роста, характерного для ХР. Воздействие матрикса биопленки *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. mirabilis* на фибробласты кожи сопровождалось увеличением продукции VEGF и GM-CSF, снижением синтеза TGF-1 $\beta$  и FGF. В опытах с *S. aureus* и *E. faecalis* регистрировалась аналогичная направленность изменений, однако степень ее выраженности была ниже, чем для опытов с грамотрицательными бактериями.

**Заключение.** Полученные результаты демонстрируют различные эффекты матрикса биопленки на выработку фибробластами факторов роста и дополняют информацию о патогенезе формирования ХР. Выявленный дисбаланс в синтезе факторов роста фибробластами грануляционной ткани ран, имеющих «пограничные» сроки существования (22–28 сут), определяет необходимость использования тактических подходов, применяемых в лечении ХР.

**Ключевые слова:** фибробласты, биопленка, факторы роста, острая рана, хроническая рана.

**Конфликт интересов:** не заявлен.

### Для цитирования:

Ярец Ю.И. Продукция факторов роста фибробластами в условиях раневого процесса и при воздействии матрикса бактериальной биопленки. *Наука и инновации в медицине*. 2022;7(4):232-238. doi: 10.35693/2500-1388-2022-7-4-232-238

**Этическая экспертиза.** Исследование одобрено локальным комитетом по этике ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», протокол № 3 от 06.06.2019.

### Сведения об авторах

**Ярец Ю.И.** – канд. мед. наук, доцент, заведующая клинико-диагностической лабораторией.

ORCID: 0000-0001-8879-5079

E-mail: artyut@mail.ru

### Автор для переписки

**Ярец Юлия Игоревна**

Адрес: Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека (клинико-диагностическая лаборатория), ул. Ильича, 290, г. Гомель, Республика Беларусь, 246040.

E-mail: artyut@mail.ru

ОР – острая рана; ХР – хроническая рана; VEGF – эндотелиальный сосудистый фактор роста; TGF-1 $\beta$  – трансформирующий фактор роста 1 $\beta$ ; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; FGF – фактор роста фибробластов.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований в рамках темы НИР «Жизнеспособность и функциональная активность фибробластов при взаимодействии с матриксом бактериальных биопленок» (договор № M19-007 от 02.05.2019), № госрегистрации 20191399 от 19.06.2019.

**Рукопись получена:** 23.08.2022

**Рецензия получена:** 03.10.2022

**Решение о публикации принято:** 24.10.2022

## Production of growth factors by fibroblasts in the conditions of the wound process and under the exposure of a bacterial biofilm matrix

© Yuliya I. Yarets

Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology (Gomel, Belarus)

### Abstract

**Aim** – to analyze the production of growth factors by fibroblasts in the wound process and under the influence of the bacterial biofilm matrix.

**Material and methods.** We assessed the levels of such growth factors as: VEGF, TGF-1 $\beta$ , GM-CSF, FGF produced by granulation tissue fibroblasts of acute wound (AW) (group 1, n=9) and chronic wound (CW) (group 2, n=17). Skin fibroblasts (n=5) were used for reference. The primary cultures were obtained by the method of explants. The experimental biofilm matrix included *S. aureus*, *E. faecalis*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* (5 of each species).

**Results.** The elevated levels of TGF-1 $\beta$  and VEGF, secreted by the primary cultures of fibroblasts, against the absence of changes in the values of FGF and GM-CSF, are the criteria for the imbalance of growth factors characteristic of CW. The impact of the biofilm matrix *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. mirabilis* on skin fibroblasts was accompanied by an increase in the production of VEGF and GM-CSF and a decrease in the synthesis of TGF-1 $\beta$  and FGF. In the experiments with *S. aureus* and *E. faecalis*, a similar direction of changes was recorded, but the degree of its severity was lower than for experiments with the gram-negative bacteria.

**Conclusion.** The obtained results have demonstrated various effects of the biofilm matrix on the production of growth factors by fibroblasts and updated the information on the pathogenesis of CW formation. The revealed imbalance in the synthesis of growth factors by fibroblasts in the granulation tissue of wounds with “borderline” lifetimes (22–28 days) determines the need for tactical approaches in the treatment of CW.

**Keywords:** fibroblasts, biofilm, growth factors, acute wound, chronic wound.

**Conflict of interest:** nothing to disclose.

#### Citation

Yarets Yul. **Production of growth factors by fibroblasts in the conditions of the wound process and under the exposure of a bacterial biofilm matrix.** *Science & Innovations in Medicine.* 2022;7(4):232-238. doi: 10.35693/2500-1388-2022-7-4-232-238

**Ethical expertise.** The study was approved by the local ethics committee of the Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Protocol No. 3 dated 06.06.2019.

#### Information about the author

**Yuliya I. Yarets** – PhD, Associate Professor, Head of the Clinical Laboratory Medicine Department. ORCID: 0000-0001-8879-5079  
E-mail: artyut@mail.ru

#### Corresponding author

**Yuliya I. Yarets**  
Address: Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Clinical Laboratory Medicine Department, 290 Ilyicha st., Gomel, Belarus, 246040.  
E-mail: artyut@mail.ru.

AW – acute wound, CW – chronic wound; VEGF – vascular endothelial growth factor; TGF-1 $\beta$  – transforming growth factor 1 $\beta$ ; GM-CSF – granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor; FGF – fibroblast growth factor.

**Source of funding.** The study was supported by the Belarusian republican foundation for fundamental research within the framework of the research topic “Viability and functional activity of fibroblasts when interacting with the matrix of bacterial biofilms” (No. M19-007 dated 02.05.2019), registration No. 20191399 dated 06.19.2019.

**Received:** 23.08.2022

**Revision Received:** 03.10.2022

**Accepted:** 24.10.2022

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Фибробласты являются главными эффекторами пролиферативной фазы раневого процесса, синтезируют факторы роста (эндотелиальный сосудистый фактор роста, трансформирующий фактор роста 1 $\beta$ , фактор роста фибробластов, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор и др.), субстраты временного внеклеточного матрикса (фибронектин, гиалуроновую кислоту, протеогликаны, коллаген), что необходимо для последующих восстановительных процессов и поддержания дальнейшего роста клеток. Финалом пролиферативной фазы является формирование фибробластами грануляционной ткани. Во время фазы ремоделирования фибробласты продолжают секретировать белки внеклеточного матрикса и факторы роста, которые обеспечивают миграцию и функционирование других клеток репарации. Нарушение физиологического баланса в клеточной популяции фибробластов приводит к значительным изменениям нормального процесса репаративной регенерации и нарушает заживление раневого дефекта.

Доказанной причиной нарушения заживления является микробный фактор, который, негативно воздействуя на иммунные механизмы, способствует развитию пролонгированного патологического воспаления и формированию длительно не заживающего раневого дефекта. В реализацию воспалительного процесса вовлекаются как клеточные, так и гуморальные иммунные механизмы. Среди изменений со стороны гуморальных факторов выделяют дисбаланс продукции ростовых факторов, цитокинов, матриксных металлопротеиназ [1]. Особое значение для развития нарушений репаративного процесса имеет способность бактерий, колонизирующих рану, к формированию биопленки. Важнейшая структура биопленки – внеклеточный матрикс, который, с одной стороны, выполняет защитную и структурообразующую функцию, а с другой стороны – представляет собой биохимически активную систему. Внутри матрикса накапливаются различные факторы агрессии бактериальной биомассы, которые оказывают повреждающее воздействие на иммунные механизмы макроорганизма, создавая тем самым патогенный

потенциал биопленки [2]. Кроме того, в составе биопленки бактерии проявляют более низкую метаболическую активность, чем планктонные формы, что дополнительно подтверждает преимущественное значение биопленки в поддержании состояния хронического воспаления и развитии нарушений пролиферативной фазы раневого процесса [2, 3].

Учитывая доказанный вклад бактерий – продуцентов биопленки в патогенез нарушения процесса заживления, актуальным является экспериментальное исследование эффектов матрикса бактериальной биопленки на культуру фибробластов, что позволит расширить представления о механизмах формирования хронической раны. В свою очередь, анализ продукции ростовых факторов первичными культурами фибробластов, выделенными из грануляционной ткани ран на различных сроках давности, даст дополнительную информацию о временном моменте возникновения гуморальных иммунных нарушений.

## ■ ЦЕЛЬ

Проанализировать уровни факторов роста, продуцируемых фибробластами в условиях раневого процесса и при воздействии матрикса бактериальной биопленки.

## ■ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования были уровни факторов роста – эндотелиальный сосудистый фактор роста (vascular endothelial growth factor – VEGF), трансформирующий фактор роста 1 $\beta$  (transforming growth factor – TGF-1 $\beta$ ), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor – GM-CSF), фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor – FGF), определение которых выполнялось в пробах питательной среды после культивирования фибробластов. Концентрацию факторов роста определяли методом иммуноферментного анализа, использовали наборы DRG Instruments (GmbH, Germany), результат выражали в пг/мл.

Продукцию факторов роста оценивали у фибробластов, выделенных из образцов грануляционной ткани локальных раневых дефектов пациентов. Пациенты

находились на лечении в ожоговом отделении ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница №1» в период 2019–2020 гг. В зависимости от срока существования раны все пациенты были разделены на 2 группы. В группу 1 (n=9) были включены пациенты с острыми ранами (ОР), со сроком существования раны от 11 до 21 суток. Группу 2 (n=17) составили пациенты с хроническими ранами (ХР) со сроком существования раны более 22 суток. Раны пациентов не проявляли клинических признаков инфекции. Для сопоставления данных и проведения экспериментального исследования, которое заключалось в оценке влияния компонентов бактериальной биопленки на продукцию факторов роста, использовались фибробласты из образцов здоровой кожи (группа сравнения, n=5), утилизированных в процессе проведения пластических операций (блефароластика).

В эксперименте применялись клинические изоляты бактерий (по 5 каждого вида) *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, на основании чего были сформированы опытные подгруппы по видам бактерий. Выбор видов определялся вкладом в общую структуру микробиоты ОР и ХР [4], а также их установленным клиническим значением в качестве ESKAPE-патогенов [5]. Изоляты были получены из отделяемого ОР и ХР пациентов: на момент поступления (ОР, имеющие клинические признаки воспаления; ХР на различных стадиях инфекционного процесса – колонизация, критическая колонизация, инфекция), на фоне лизиса аутодермотрансплантата. По результатам микробиологического исследования изоляты характеризовались умеренной или выраженной способностью к образованию основного вещества биопленки.

Протокол исследования одобрен локальным комитетом по этике ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» (протокол № 3 от 06.06.2019), у пациентов получали информированное согласие. Культивирование фибробластов выполнялось в условиях клинико-диагностической лаборатории ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». Для получения первичных культур использовали метод механической дезагрегации (метод эксплантатов).

Образцы ткани, измельченные скальпелем до размеров примерно 1–3 мм<sup>2</sup>, переносили на культуральные чашки Петри размером 35 мм, накрывали покровным стеклом и культивировали в 1 мл среды, состоящей из 90% DMEM, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, с добавлением раствора антибиотиков (концентрации 100 мг/л гентамицина, 100 мг/л ванкомицина, 50 мг/л амфотерицина В). Смена среды проводилась каждые 2–3 суток. После получения радиального роста фибробластов по периметру кожных фрагментов и образцов грануляционной ткани с формированием монослоя проводили субкультивирование фибробластов в новые чашки Петри. Для перевода клеток в суспензию монослой обрабатывали раствором трипсина (2,5 г/л) с раствором Версена (0,25 г/л) (в соотношении 1:3). Для пересева культуры применяли суспензию с концентрацией



**Рисунок 1.** Устройство для фильтрации растворов, содержащих клетки микроорганизмов.

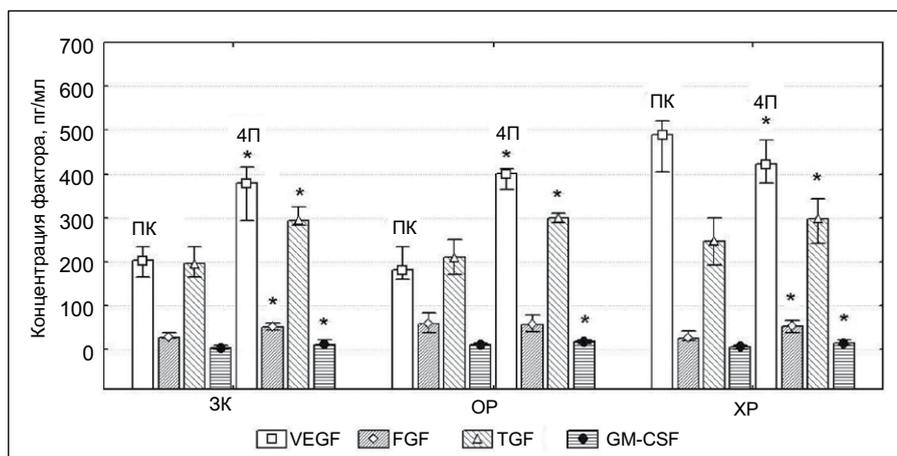
**Figure 1.** Device for filtering solutions containing microorganism cells.

клеток  $5 \times 10^4$ /мл. Пассаж проводили при достижении клетками 75–100%-й конfluence.

Для моделирования формирования биопленки использовали стерильные покровные стекла, которые помещали вертикально во флаконы с питательной средой. Во флакон вносили 1 мл бульонной культуры в концентрации  $5 \times 10^8$  КОЕ/мл, инкубировали 3 часа при температуре 37°C и после этого добавляли питательную среду в объеме 40 мл. Биопленку выращивали в течение 72 часов. После окончания культивирования стекла из флаконов извлекали пинцетом, трижды промывали от неприкрепившихся клеток в буферном растворе. Для получения внеклеточного матрикса биопленку соскабливали с поверхности покровного стекла с помощью скребка для клеточных культур, добавляли изотонический раствор NaCl. Полученную суспензию фильтровали через мембранные фильтры, с размером пор 0,2 мкм. Для облегчения процедуры фильтрации использовали разработанное устройство (патент на полезную модель ВУ №12554 от 28.02.2021 г.) [6] (рисунок 1).

Фильтрат матрикса биопленки в количестве 0,150 мл добавляли в питательную среду для фибробластов (4 пассажа), выращенных из образцов здоровой кожи (группа сравнения). Результаты оценки влияния компонентов матрикса биопленки представляли на третьи сутки культивирования. В качестве контроля использовали фибробласты из группы сравнения такого же пассажа, но без добавления матрикса биопленки.

В работе были применены общепринятые методы выражения результатов с использованием встроенных модулей лицензионной программы STATISTICA



**Примечание.** \* – отмечены значимые различия в динамике изменения факторов роста в процессе пересевов от первичной культуры (ПК) к культуре 4 пассажа (4П) по результатам расчета W-критерия Вилкоксона; ЗК, ОР, ХР – фибробласты, полученные из здоровой кожи (n=5), острых ран (n=9) и хронических ран (n=17) соответственно; различия по показателям факторов роста были значимы между группами по результатам расчета H-критерия Краскела – Уоллиса: VEGF H=25,31; FGF H=19,82; TGF H=13,86; GM-CSF H=14,99, p<0,001 в первичных культурах; VEGF H=9,5, p=0,009; FGF H=4,00, p<0,13 в культурах 4 пассажа.

**Рисунок 2.** Уровень факторов роста, продуцируемых фибробластами кожи и грануляционной ткани ран.

**Figure 2.** The level of growth factors produced by fibroblasts of the skin and granulation tissue of wounds.

6.1 (StatSoft Inc., США, регистрационный номер GS-35F-589). Результаты представляли в виде медианы и интерквартильного размаха и  $\pm 95\%$  доверительного интервала (Me [25-й; 75-й квартили] ( $\pm 95\%$  ДИ). Для сравнения показателей независимых выборок использовался ранговый U-критерий Манна – Уитни. Для проверки равенства медиан нескольких выборок применяли H-критерий Краскела – Уоллиса. Анализ различий по количественным показателям во взаимосвязанных выборках проводили с использованием W-критерия Вилкоксона.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Установлены различия между продукцией факторов роста первичными культурами фибробластов кожи (группа сравнения) и грануляционной ткани ОР и ХР (группы 1 и 2) (значимость различий по H-критерию Краскела – Уоллиса p<0,001). В группе 2 регистрировались наиболее высокие значения VEGF и TGF-1 $\beta$ , составляющие 489,17 [450,0; 504,0] ( $\pm 95\%$  ДИ: 459,37–495,20) пг/мл и 247,56 [232,76; 274,02] ( $\pm 95\%$  ДИ: 233,99–266,30), (значимость различий по тесту Манна – Уитни между группой 1 и группой сравнения: Z=4,12 и Z=3,96; p<0,001 для VEGF, Z=2,39; p=0,016 и Z=3,32; p<0,001 для TGF-1 $\beta$  соответственно). По уровням VEGF и TGF-1 $\beta$  между группой 1 и группой сравнения различий не было выявлено. Продукция FGF и GM-CSF в группе 2 не отличалась от таковой в группе сравнения, но была максимальной в группе 1: 59,18 [48,19; 63,33] ( $\pm 95\%$  ДИ: 47,08–75,93) пг/мл и 11,16 [10,78; 13,35] ( $\pm 95\%$  ДИ: 9,04–14,76) пг/мл (Z=4,07 и Z=3,63; Z=3,46 и Z=3,03; p<0,001 соответственно для группы 2 и группы сравнения).

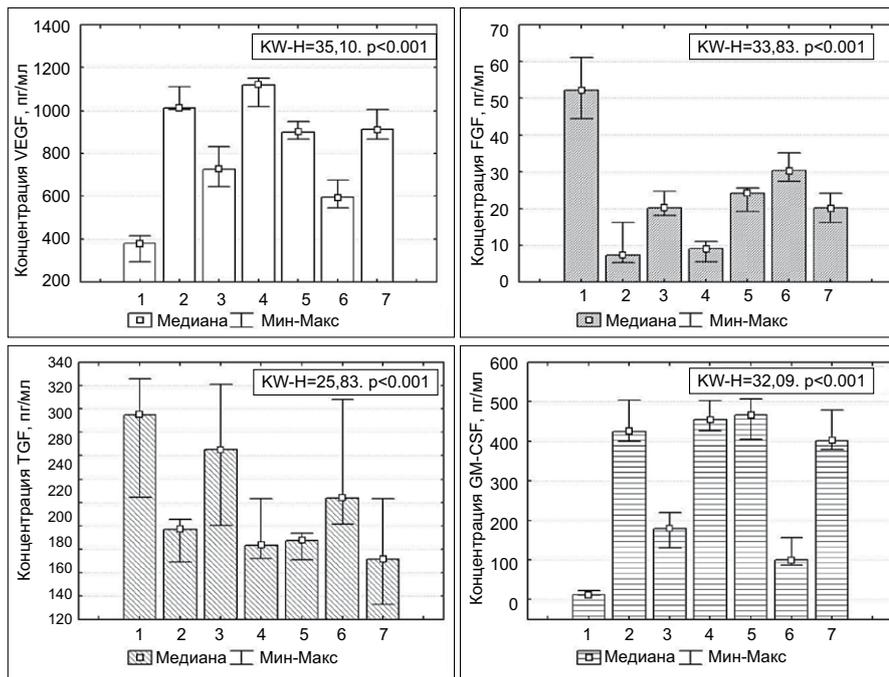
К 4 пассажу во всех группах происходили значимые изменения в уровнях продукции фибробластами факторов роста. В группе сравнения

регистрировалось увеличение концентрации всех факторов относительно показателей в первичных культурах (W=2,52; p=0,012). В группе 1 не изменялся только уровень FGF, остальные показатели увеличивались (W=2,67; p=0,007). В группе 2 повышались значения TGF-1 $\beta$ , FGF и GM-CSF, уровень VEGF, наоборот, снижался (W=3,62; p<0,001). В результате произошедших изменений к 4 пассажу межгрупповые различия по показателям факторов роста у фибробластов практически не наблюдались, что можно объяснить возможностью восстановления функциональных свойств фибробластов в процессе пересевов. Исключение составил уровень VEGF, который оставался наиболее высоким в группе 2 (H=9,5; p=0,009) (рисунок 2).

В результате воздействия компонентов матрикса бактериальной биопленки происходило изменение продукции факторов роста фибробластами. На третьи сутки экспериментального исследования в образцах культуральной среды регистрировалось увеличение концентрации VEGF и GM-CSF, снижение концентрации TGF-1 $\beta$  и FGF относительно показателей контрольной пробы. Степень выраженности изменений различалась в зависимости от вида бактерии – продуцента биопленки (значимость различий по критерию Краскела – Уоллиса p<0,001) (рисунок 3). Наиболее высокие значения VEGF и GM-CSF определялись в опытах с матриксом биопленки грамотрицательных бактерий. Уровень VEGF не отличался в подгруппах с *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*, составляя в целом 1049,62 [1012,89; 1120,80] ( $\pm 95\%$  ДИ: 1023,60–1107,344) пг/мл, но был значимо выше по сравнению с таковым в подгруппах с *A. baumannii* и *P. mirabilis*: 905,52 [870,15; 926,73] ( $\pm 95\%$  ДИ: 879,29–941,89) пг/мл (Z=2,61; p=0,009 и Z=2,40; p=0,016). Степень увеличения GM-CSF была одинаковой во всех подгруппах с грамотрицательными бактериями – 447,15 [408,66; 479,21] ( $\pm 95\%$  ДИ: 426,91–464,45) пг/мл.

В меньшей степени активирующее влияние на продукцию фибробластами VEGF и GM-CSF оказывали компоненты биопленки грамположительных бактерий. При этом в подгруппе с *S. aureus* уровень VEGF и GM-CSF был значимо выше, чем в подгруппе с *E. faecalis* (Z=2,09; p=0,03 и Z=2,19; p=0,02). После воздействия матрикса биопленки *E. faecalis* уровень VEGF и GM-CSF увеличивался до 593,40 [588,24; 659,15] ( $\pm 95\%$  ДИ: 545,53–678,89) пг/мл и 99,20 [92,11; 105,18] ( $\pm 95\%$  ДИ: 72,92–142,52) пг/мл.

Компоненты биопленки грамположительных и грамотрицательных бактерий угнетали продукцию TGF-1 $\beta$  и FGF фибробластами. В подгруппах с грамотрицательными бактериями значимые различия



**Примечание.** 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 – результаты, представленные для контрольных проб (1) и опытных проб после воздействия компонентов матрикса биопленки *P. aeruginosa* (2), *S. aureus* (3), *K. pneumoniae* (3), *A. baumannii* (4), *E. faecalis* (5), *P. mirabilis* (6); KW-H – H-критерий Краскела – Уоллиса. Для каждого вида микроорганизма проводили по 5 экспериментов в контрольной и опытной группах.

**Рисунок 3.** Уровень продукции фибробластами факторов роста по результатам эксперимента с компонентами матрикса биопленки

**Figure 3.** The level of production of growth factors by fibroblasts according to the results of the experiment with biofilm matrix components

были выявлены для уровня FGF, который был минимальным в подгруппах с *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*: 8,13 [5,50; 10,15] ( $\pm 95\%$  ДИ: 6,05–10,96) пг/мл. После трехдневной инкубации с компонентами матрикса биопленки *A. baumannii* и *P. mirabilis* продукция FGF фибробластами снижалась в меньшей степени, составляя в целом 22,14 [19,60; 24,19] ( $\pm 95\%$  ДИ: 19,66–24,06) пг/мл ( $Z=2,40$ ;  $p=0,016$  и  $Z=2,61$ ;  $p=0,009$ ). Уровень TGF- $1\beta$  был одинаковым во всех подгруппах с грамотрицательными бактериями – 185,71 [171,62; 197,20] ( $\pm 95\%$  ДИ: 175,16–194,76) пг/мл.

Грамположительные бактерии отличались по степени воздействия на продукцию факторов роста фибробластами. В подгруппе с *S. aureus* уровень FGF был ниже, чем в подгруппе с *E. faecalis*: 20,21 [19,45; 21,19] ( $\pm 95\%$  ДИ: 17,71–23,77) пг/мл vs 30,21 [28,62; 34,90] ( $\pm 95\%$  ДИ: 26,77–35,70) пг/мл ( $Z=2,61$ ;  $p=0,009$ ). Продукция фибробластами TGF- $1\beta$  в опытных подгруппах с грамположительными бактериями не отличалась и составляла в целом 244,55 [210,12; 305,16] ( $\pm 95\%$  ДИ: 219,74–289,62) пг/мл.

## ■ ОБСУЖДЕНИЕ

Факторы роста играют роль в клеточном делении, миграции, дифференцировке, экспрессии белков и продукции ферментов. Факторы роста потенцируют заживление ран, стимулируя ангиогенез и клеточную пролиферацию, одновременно являются хемоаттрактантами для лейкоцитов и моноцитов. Дисбаланс продукции факторов роста является одним из признаков задержки раневого заживления [7].

TGF- $1\beta$  представляет собой основной ингибитор миграции и пролиферации эндотелиоцитов, кератиноцитов и частично ангиогенеза. В норме TGF- $1\beta$  обеспечивает фазу ремоделирования и эпителизации, когда этот фактор синтезируется в повышенной концентрации. При нарушении процесса заживления, хронизации раневого процесса TGF- $1\beta$  обуславливает развитие фибропролиферативных расстройств и образование гипертрофического рубцевания [8]. TGF- $1\beta$  является стимулом для выработки VEGF – основного митогена для эндотелиальных клеток и ключевого фактора ангиогенеза. С другой стороны, VEGF имеет провоспалительный потенциал, который определяется наличием вазодилатирующего действия и повышения проницаемости микрососудов для проникновения клеток воспаления. Дальнейшее повышение уровня VEGF в условиях ХР стимулируется состоянием гипоксии, которое возникает из-

за потребления кислорода полиморфноядерными нейтрофилами в процессе респираторного взрыва. Кроме того, бактерии, колонизирующие ХР, также потребляют кислород в процессе жизнедеятельности [1, 9]. Вышесказанное объясняет факт повышенных концентраций TGF- $1\beta$  и VEGF, синтезируемых первичными культурами фибробластов грануляционной ткани ХР (группа 2). Уровень TGF- $1\beta$  и VEGF превышал таковой в первичных культурах группы сравнения (фибробласты кожи) и группы 1 (ОР), что согласовывалось с данными других авторов [10, 11, 12]. Первичные культуры фибробластов ОР характеризовались более высокими уровнями продукции FGF и GM-CSF, чем фибробласты ХР, показатели которых не отличались от группы сравнения (рисунок 2). FGF играет роль в процессах формирования грануляционной ткани, эпителизации и ремоделирования, увеличение его уровня характерно для ОР, снижение – для ХР [13]. Важным фактором воспалительной фазы является GM-CSF, который способствует миграции полиморфноядерных нейтрофилов, облегчает их функционирование в очаге воспаления. Кроме того GM-CSF стимулирует рост кератиноцитов и миграцию моноцитов и, как следствие, очищение раны и ее заживление [13]. Повышенные уровни TGF- $1\beta$  и VEGF на фоне отсутствия изменений со стороны значений FGF и GM-CSF являются критериями дисбаланса факторов роста, характерного для ХР. Необходимо отметить, что указанные показатели регистрировались в культурах фибробластов ран сроком более 22 суток, что смещает существующее

временное определение термина «хроническая рана» – более 4 недель [14]. Предположение подтверждается ранее полученными результатами, согласно которым в ранах «пограничных сроков» от 22 до 28 суток были установлены клинические признаки нарушений состояния грануляционной ткани и морфологические признаки нарушения пролиферации в сочетании с воспалительными явлениями [15].

В предварительных исследованиях нами показано, что компоненты бактериальной биопленки проявляют цитотоксичность, вызывая морфологические изменения фибробластов, снижение их жизнеспособности и активацию апоптоза [16]. В настоящем исследовании установлено изменение продукции факторов роста фибробластами под действием матрикса биопленки, представленное стимулирующим эффектом для VEGF и GM-CSF и угнетающим эффектом для TGF-1 $\beta$  и FGF, наиболее выраженных для опытов с грамотрицательными бактериями, в частности для *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. Среди грамположительных бактерий аналогичные эффекты регистрировались для опытов с *S. aureus*, минимальная степень изменений отмечена для опытов с *E. faecalis*. Отмечено, что среди патогенетически значимых бактерий – продуцентов биопленки особый вклад в задержку заживления и поддержания в ране состояния хронического воспаления вносит *P. aeruginosa* [1, 17]. Биопленка *P. aeruginosa* приводит к нарушению профиля синтезируемых факторов роста. В экспериментальном исследовании Н. Trøstrup. и соавт. (2018) на модели кожной раны выявлено стимулирующее влияние биопленки *P. aeruginosa* на выработку VEGF в периферических отделах раны, где протекал процесс заживления. В центре раны, в области некроза, уровень VEGF, наоборот, снижался [18]. Повышение продукции VEGF и GM-CSF фибробластами кожи в ответ на действие бактериальной биопленки, возможно, является компенсаторной реакцией, когда VEGF выполняет функцию хемоаттрактанта для клеток воспаления, а GM-CSF способствует их нормальному функционированию. В экспериментальном исследовании К.Р. Kirker и соавт. (2012) также выявлено стимулирующее действие растворимых компонентов биопленки *S. aureus* на продукцию VEGF фибробластами кожи [3].

Различие в степени влияния на синтез факторов роста у грамположительных и грамотрицательных видов бактерий – продуцентов биопленки может дополнительно зависеть от патогенных и персистентных свойств – способности к секреции защитных протеаз, присутствия генов, регулирующих вирулентность, образование биопленки, коммуникацию бактерий в рамках системы quorum sensing. Особое значение это будет иметь для клинических штаммов

бактерий, способных изменять свой патогенный потенциал и метаболическую активность в стрессовых условиях (например, при действии антибактериальных средств, физических методов лечения). Формирование биопленки является важнейшим адаптационным механизмом бактерий, который проявляется снижением уровня вирулентности и повышением способности к персистенции [19]. Протеомный и транскриптомный анализ биопленки и планктонной формы *S. aureus* показал, что в биопленке клетки экспрессируют факторы, необходимые для колонизации и персистенции, тогда как планктонные клетки – факторы вирулентности, ассоциированные с развитием острой инфекции [20].

Полученные результаты демонстрируют различные эффекты матрикса биопленки на выработку фибробластами факторов роста и дополняют информацию о патогенезе формирования ХР. Выявленный дисбаланс в синтезе факторов роста фибробластами грануляционной ткани ран, имеющих «пограничные» сроки существования (от 22 до 28 суток), определяет необходимость использования тактических подходов, применяемых в лечении ХР.

## ■ ВЫВОДЫ

1. Первичные культуры фибробластов, полученные из грануляционной ткани ХР, в том числе из ран «пограничных» сроков существования (22–28 суток), характеризовались наиболее высоким уровнем продукции VEGF и TGF-1 $\beta$  по сравнению с фибробластами ОР и фибробластами кожи. Для фибробластов ОР определялись максимальные показатели FGF и GM-CSF. Повышенные уровни TGF-1 $\beta$  и VEGF на фоне отсутствия изменений со стороны значений FGF и GM-CSF являются дополнительными критериями дисбаланса факторов роста, характерного для ХР.

2. К четвертому пассажу межгрупповые различия по показателям продукции факторов роста у фибробластов практически не наблюдались, что можно объяснить возможностью восстановления функциональных свойств фибробластов в процессе пересевов.

3. Воздействие матрикса биопленки грамотрицательных бактерий (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. mirabilis*) на фибробласты кожи в эксперименте сопровождалось увеличением продукции VEGF и GM-CSF, снижением синтеза TGF-1 $\beta$  и FGF. В опытах с грамположительными бактериями (*S. aureus* и *E. faecalis*) регистрировалась аналогичная направленность изменений, однако степень ее выраженности была ниже, чем для опытов с грамотрицательными бактериями. ■

**Конфликт интересов:** автор заявляет об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Trøstrup H, Boe Laulund AS, Moser C. Insights into host–pathogen interactions in biofilm-Infected wounds reveal possibilities for new treatment strategies. *Antibiotics*. 2020;9(7):396. doi: 10.3390/antibiotics9070396
2. Tchebotar IV, Mayanskiy AN, Mayanskiy NA. Matrix of Microbial Biofilms. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;18(1):9-19. (In Russ.). [Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Маянский Н.А. Матрикс микробных биопленок. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2016;18(1):9-19].
3. Kirker KR, James GA, Fleckman P, et al. Stewart Differential effects of planktonic and biofilm MRSA on human fibroblasts. *Wound Repair Regen*. 2012;20:253-61. doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00769.x
4. Yarets YuI, Shevchenko NI, Eremin VF. Methodology of microbiological analysis of wound swabs within the framework of modern concepts of wound infection process. *Laboratory Service*. 2021;10(3):33-42. (In Russ.). [Ярец Ю.И., Шевченко Н.И., Еремин В.Ф. Методология микробиологического посева раневого отделяемого в рамках современных представлений о диагностике инфекционного процесса. *Лабораторная служба*. 2021;10(3):33-42]. doi: 10.17116/labs20211003133
5. Dinesh K, Karthick M. A study on ESKAPE pathogens the bad bug with no drug. *Tropical Journal of Pathology & Microbiology*. 2018;4(2):134-138. doi: 10.17511/jopm.2018.i02.02
6. Yarets YuI, Loginova OP. A device for filtering solutions containing microorganism cells. Patent BY № 12554. Minsk, 2021. [Ярец Ю.И., Логинова О.П. Устройство для фильтрации растворов, содержащих клетки микроорганизмов. Патент ВУ на полезную модель № 12554. Минск, 2021]. Available at: <https://www.ncip.by/upload/iblock/8d4/8d43869ddf105b68f022f4b20713f564.pdf>
7. Murray RZ, West ZE, McGuinness W The multifactorial formation of chronic wounds. *Wound Practice and Research*. 2018;26(1):38-46.
8. Dos Santos LC, César PO, Henrique AP, et al. Molecular mediators involved in skin healing: a narrative review. *F1000Research*. 2022;11:465. doi: 10.12688/f1000research.111159.1
9. Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, et al. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. *J Surg Res*. 2009;153:347-58. doi: 10.1016/j.jss.2008.04.023
10. Tarnuzzer RW, Schultz GS. Biochemical analysis of acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen*. 1996;4:321-325. doi: 10.1046/j.1524-475X.1996.40307.x
11. Lauer G, Sollberg S, Cole M, et al. Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol*. 2000;115:12-18. doi: 10.1046/j.1523-1747.2000.00036.x
12. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005;9(4):777-794. doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00379.x
13. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, et al. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*. 2008;16:585-601. doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x
14. Obolenskiy VN. Modern treatment methods of the chronic wounds. *Russian Medical Journal*. 2013;5:282-290. (In Russ.). [Оболенский В.Н. Хроническая рана: обзор современных методов лечения. *Русский медицинский журнал*. 2013;5:282-290]. doi: 10.21518/2079-701X-2016-10-148-154
15. Yarets YuI, Slavnikov IA, Dundarov ZA. Colonized, critically colonized and infected wounds: differentiation using clinical and microbiological and morphological methods of investigation. *Health and Ecology Issues*. 2022;19(2):63-75. (In Russ.). [Ярец Ю.И., Славников И.А., Дундаров З.А. Колонизированные, критически колонизированные и инфицированные раны: дифференциация с использованием клинико-микробиологических и морфологических методов исследования. *Проблемы здоровья и экологии*. 2022;19(2):63-75]. doi: 10.51523/2708-6011.2022-19-2-08
16. Yarets YuI. Significance of studying the cytotoxicity of bacterial biofilm for assessing the potential ability of the microbiota to prolong the inflammatory phase of the wound process. *Laboratory Diagnostics. Eastern Europe*. 2022;11(2):198-213. (In Russ.). [Ярец Ю.И. Значимость исследования цитотоксичности бактериальной биопленки для оценки потенциальной способности микробиоты пролонгировать воспалительную фазу раневого процесса. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа*. 2022;11(2):198-213]. doi: 10.34883/PI.2022.11.2.017
17. Bjarnsholt T, Kirketerp-Møller KK, Jensen PØ, et al. Why chronic wounds will not heal: A novel hypothesis. *Wound Repair Regen*. 2008;16:2-10. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00283.x
18. Trøstrup H, Lerche CJ, Christophersen LJ, et al. Pseudomonas aeruginosa biofilm hampers murine central wound healing by suppression of vascular endothelial growth factor. *Int Wound J*. 2018;15:123-132. doi: 10.1111/iwj.12846
19. Secor PR, James GA, Fleckman P, et al. Staphylococcus aureus biofilm and planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes. *BMC Microbiol*. 2011;11:153-156. doi: 10.1186/1471-2180-11-143
20. Resch A, Leicht S, Saric M, et al. Comparative proteome analysis of Staphylococcus aureus biofilm and planktonic cells and correlation with transcriptome profiling. *Proteomics*. 2006;6:1867-77. doi: 10.1002/pmic.200500531