

# OCENA STĘŻENIA NACZYNIOWO-ŚRÓDBŁONKOWEGO CZYNNIKA WZROSTU VEGF W PROCESIE GOJENIA SIĘ RAN PO ZABIEGACH NEUROCHIRURGICZNYCH – DONIESIENIA WSTĘPNE

## Assessment of VEGF concentration in the wound healing process after neurosurgical procedures – early reports



Robert Ślusarz<sup>1</sup>, Wojciech Beuth<sup>1</sup>, Danuta Rość<sup>2</sup>, Lech Grzelak<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Zakład Pielęgniarstwa Neurologicznego i Neurochirurgicznego, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

<sup>2</sup>Katedra i Zakład Patofizjologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

<sup>3</sup>Katedra i Klinika Neurochirurgii i Neurotraumatologii, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

Pielęgniarstwo Chirurgiczne i Angiologiczne 2007; 4: 146–149

Adres do korespondencji:

dr n. med. Robert Ślusarz, Zakład Pielęgniarstwa Neurologicznego i Neurochirurgicznego, Collegium Medicum im. L. Rydygiera, ul. Techników 3, 85-801 Bydgoszcz, tel./faks +48 52 585 21 93, e-mail: zpielnin@cm.umk.pl

### Streszczenie

**Wstęp:** Naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor* – VEGF), zwany również czynnikiem przepuszczalności naczyń (ang. *vascular permeability factor* – VPF) lub waskulotropiną (ang. *vasculotropin*), jest obecnie uważany za kluczowy czynnik regulujący fizjologiczną i patologiczną angiogenezę. Rola VEGF w procesie gojenia się ran nie jest dokładnie poznana.

**Cel pracy:** Celem pracy była ocena stężenia naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w surowicy krwi pacjentów po zabiegach neurochirurgicznych z raną pooperacyjną, mierzonego przed zabiegiem operacyjnym i po nim.

**Materiał i metody:** Badania przeprowadzono w Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii Collegii Medicii UMK w grupie 20 dorosłych chorych, poddanych leczeniu operacyjnemu z powodu zmiany zwyrodnieniowej kręgosłupa. Badanie polegało na 3-krotnym pobraniu krwi żyłnej – przed zabiegiem (pomiar 1.), w 1. dobie po zabiegu (pomiar 2.) oraz między 5. a 7. dobą po zabiegu operacyjnym (pomiar 3.), u tego samego pacjenta hospitalizowanego w Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii. Następnie próbówki z materiałem przekazano do Katedry i Zakładu Patofizjologii CM w celu oznaczenia stężenia VEGF za pomocą metody immunoenzymatycznej (ELISA). Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników, dobranych pod względem płci i wieku do grupy badanej.

#### Wnioski:

1. W badaniach nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu VEGF w surowicy krwi osób w poszczególnych pomiarach przed zabiegiem operacyjnym i po nim, jak również w porównaniu z grupą kontrolną.

### Abstract

**Introduction:** Vascular endothelial growth factor (VEGF), or vascular permeability factor (VPF) or vasculotropin, is considered to be a key factor that regulates physiological and pathological angiogenesis. The role of VEGF in the process of wound healing is not well understood.

**Aim:** The aim of the study was to assess the VEGF concentration in the blood serum of patients after a neurosurgical procedure, in consecutive measurements before and after the operation.

**Material and methods:** The study was conducted in the Neurosurgery and Neurotraumatology Department, CM UMK and included 20 adult patients after surgical treatment of degenerative changes in the spine. Each patient's venous blood samples were obtained three times: before the surgery (measurement 1), on day 1 after surgery (measurement 2) and between the 5th and 6th day after the operation (measurement 3). The samples were sent to the Pathophysiology Department, CM UMK where the VEGF concentration was assessed using the immunoenzymatic method (ELISA). The control group included 20 healthy volunteers similar in age and gender to the patients included in the study.

#### Conclusions:

1. The study showed no statistically significant differences in the VEGF concentration in blood serum between consecutive measurements before and after the surgery and between the control group and the group of patients included in the study.
2. Further studies should focus on a bigger sample of patients and show correlations between selected wound healing factors and angiogenesis stimulants.

**Key words:** VEGF, angiogenesis, wound, neurosurgery.

2. Dalsze badania powinny być ukierunkowane na zwiększenie grupy badanej oraz przedstawienie korelacji wybranych czynników procesu gojenia się rany ze stymulatorami angiogenezy.

**Słowa kluczowe:** VEGF, angiogeneza, rana, neurochirurgia.

## Wstęp

W procesie gojenia się rany biorą udział miejscowo wydzielane przekaźniki. Zaliczają się do nich:

- powstające z lipidów błon komórkowych pochodne kwasu arachidonowego,
- cytokiny,
- czynniki wzrostu,
- tlenek azotu,
- peptydy,
- aminy,
- czynnik aktywujący płytki (ang. *platelet activating factor* – PAF).

Do najbardziej znanych czynników wzrostu biorących udział w procesie gojenia się ran należą [1–6]:

- płytkowopochodny czynnik wzrostu (ang. *platelet derived growth factor* – PDGF),
- naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (ang. *vascular endothelial growth factor* – VEGF),
- czynnik wzrostu naskórka (ang. *epidermal growth factor* – EGF),
- czynnik wzrostu fibroblastów (ang. *fibroblast growth factor* – FGF),
- czynnik wzrostu keratynocytów (ang. *keratinocyte growth factor* – KGF),
- transformujący czynnik wzrostowy  $\alpha$  i  $\beta$  (ang. *transforming growth factor* – TGF),
- insulinopochodny czynnik wzrostu (ang. *insulin-like growth factor* – IGF).

Wśród wymienionych czynników wzrostu decydującą rolę wydaje się odgrywać zaliczany do czynników proangiogennych VEGF [7, 8] – cytokina o udowodnionym znaczeniu w różnorodnych procesach biologicznych. Największą aktywność wykazuje jednak jako czynnik wzrostowy śródbłonna i czynnik zwiększający przepuszczalność naczyń. Stwierdzono, że pod wpływem VEGF są aktywowane niemal wszystkie znane szlaki sygnałowe w hodowlach komórek śródbłonkowych; jest on jednym z podstawowych regulatorów angiogenezy [7, 9].

Większość badań z zakresu angiogenezy i roli VEGF przeprowadza się u dorosłych z chorobami nowotworowymi, w celu oceny udziału tego czynnika w procesie transformacji nowotworowej i w powstawaniu guzów. Niewiele jest doniesień na temat stężenia, jak również udziału VEGF w surowicy krwi u chorych z raną po zabiegu operacyjnym.

## Cel pracy

Celem pracy była ocena stężenia naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (VEGF) w surowicy krwi pacjentów po zabiegach neurochirurgicznych z raną po-

operacyjną, w poszczególnych pomiarach przed zabiegiem operacyjnym i po nim. Szczegółowe problemy badawcze przedstawiono w postaci pytań:

1. Czy stężenie VEGF w surowicy krwi różni się istotnie w poszczególnych pomiarach przed zabiegiem operacyjnym i po nim?
2. Czy stężenie VEGF w surowicy krwi osób z raną pooperacyjną różni się istotnie w porównaniu z grupą kontrolną?

## Materiał i metody

### Grupa badana

Badania przeprowadzono w Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii CM UMK w grupie 20 dorosłych chorych (9 mężczyzn i 11 kobiet) w wieku 27–54 lat (średnia  $44 \pm 8$ ), poddanych leczeniu operacyjnemu z powodu zmiany zwyrodnieniowej kręgosłupa. Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników, dobranych pod względem płci i wieku do grupy badanej.

Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy *Collegium Medicum* im. L. Rydygiera w Bydgoszczy (nr grantu UMK – 45/2007, nr zgody – KB/126/2007). Osoby zakwalifikowane do badania w dniu przyjęcia na oddział wyraziły pisemną zgodę na udział w nim.

### Przebieg badań

Badanie polegało na 3-krotnym pobraniu krwi żyłnej ( $5 \text{ cm}^3$  krwi) z żyły łokciowej – przed zabiegiem (pomiar 1.), w 1. dobie po zabiegu (pomiar 2.) oraz między 5. a 7. dobą po zabiegu operacyjnym (pomiar 3.) u tego samego pacjenta hospitalizowanego w Klinice Neurochirurgii i Neurotraumatologii CM, a następnie przekazaniu próbek z materiałem do Katedry i Zakładu Patofizjologii CM w celu oznaczenia stężenia VEGF za pomocą metody immunoenzymatycznej (ELISA), przy użyciu zestawów human VEGF-A BioLISA BMS277BL (firmy Bender MedSystems).

### Analiza statystyczna

Materiał opracowywano, wykorzystując elementy statystyki opisowej (średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe, mediana, minimum, maksimum). Do porównania danych zebranych w poszczególnych pomiarach zastosowano test Friedmana. Do statystycznego porównania średnich z dwóch grup (badanej i kontrolnej) zastosowano test U Manna-Whitneya (Z). Hipotezy statystyczne weryfikowano na poziomie istotności  $p=0,05$ .

Tab. 1. Stężenie VEGF w poszczególnych pomiarach

Pomiar	Średnia	Odchylenie standardowe (SD)
1.	60,37500	32,40161
2.	65,86649	37,07406
3.	79,11651	64,11526

$\chi^2(n=20, df=2)=1,350649; p<0,50900$

## Wyniki

Mimo że w badanej grupie osób (n=20) średnie stężenie VEGF rosło w kolejnych pomiarach z 60,38±32,40 pg/ml (pomiar 1. przed zabiegiem operacyjnym), przez 65,87±37,07 pg/ml (pomiar 2. po zabiegu operacyjnym), aż do 79,12±64,12 pg/ml (pomiar 3. po zabiegu operacyjnym), to wzrost ten nie był znaczący i średnie stężenia VEGF w poszczególnych pomiarach nie różniły się między sobą istotnie statystycznie  $\chi^2 (n=20, df=2)=1,35; p=0,51$  (NS) (tab. 1). Należy jednak zwrócić uwagę na pomiar 3., charakteryzujący się odstępstwem od rozkładu normalnego i dużą zmiennością wyników (duże odchylenie standardowe 64,12 pg/ml) (ryc. 1). Przypuszcza się, że na dużą zmienność wyników wpływać mogą takie czynniki, jak lokalizacja rany, jej rodzaj, sposób gojenia, czynniki towarzyszące (np. proces zapalny rany – zakażenia, zaburzenia ukrwienia – martwica, zaburzenia metaboliczne – rozpoznana cukrzyca itp.).

Stężenia VEGF nie różniły się istotnie statystycznie w grupie osób badanych z raną pooperacyjną w porównaniu z grupą kontrolną. W pomiarze 1. stężenia VEGF w grupie osób badanych wynosiły 9,99–128,62 pg/ml (średnia 60,38 pg/ml; SD 32,40), w grupie kontrolnej 23,72–261,12 pg/ml (średnia 73,32 pg/ml; SD 55,25) (p=0,71) (ryc. 2.). W pomiarze 2. stężenia VEGF w grupie osób badanych wynosiły 6,94–128,62 pg/ml (średnia

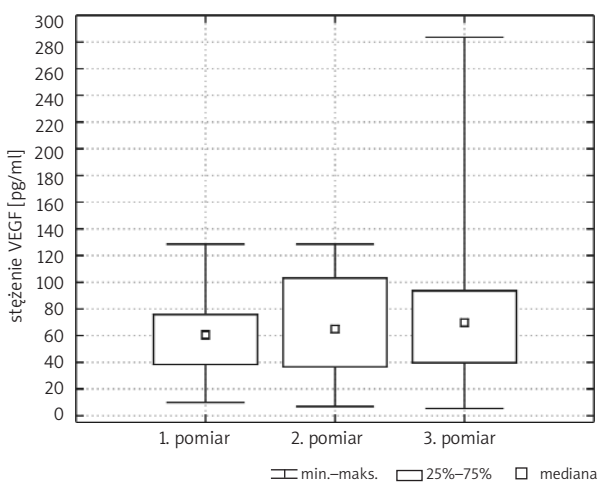
65,87 pg/ml; SD 37,07), w grupie kontrolnej 23,72–261,12 pg/ml (średnia 73,32 pg/ml; SD 55,25) (p=0,89) (ryc. 3.) i w pomiarze 3. stężenia VEGF w grupie osób badanych wynosiły 5,42–283,53 pg/ml (średnia 79,12 pg/ml; SD 64,12), w grupie kontrolnej 23,72–261,12 pg/ml (średnia 73,32 pg/ml; SD 55,25) (p=0,64) (ryc. 4.).

## Omówienie wyników

Angiogeneza jest procesem tworzenia nowych naczyń krwionośnych z istniejącej już sieci naczyń. Towarzyszy zarówno procesom fizjologicznym, takim jak rozwój embryonalny, proces gojenia ran, cykl miesięczkowy, jak i patologicznym – wzrostowi i ekspansji guza, powstawaniu przerzutów, patologii w niedokrwieniu, procesom zapalnym oraz chorobom układu nerwowego [7–11].

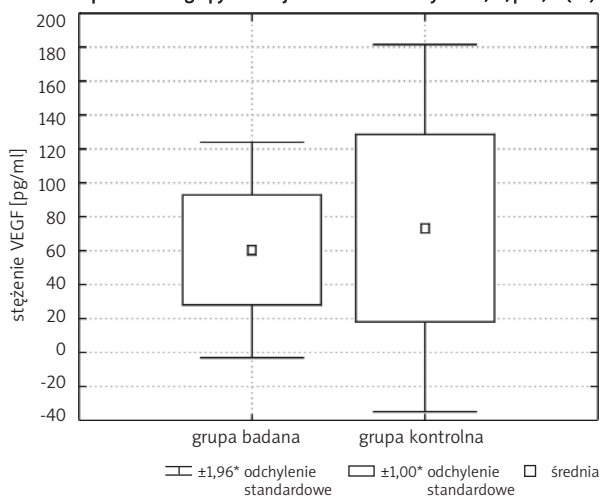
W procesie gojenia się rany można wyróżnić szereg faz, które mogą nakładać się na siebie lub przebiegać jednocześnie, np.:

- hemostazę (pierwotną, wtórną),
- zapalenie,
- fazę proliferacji (regeneracja naskórka, synteza substancji międzykomórkowej, odrost naczyń krwionośnych, wytwarzanie tkanki łącznej),
- fazę przebudowy (obkurczanie rany, remodelowanie macierzy pozakomórkowej, tworzenie blizny) [6, 12].

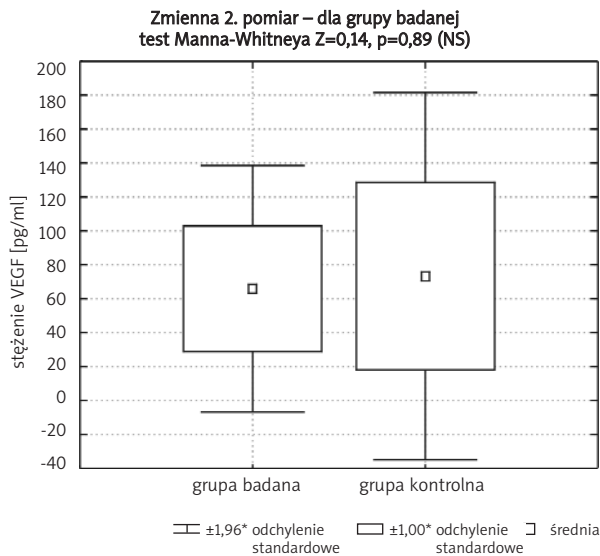


Ryc. 1. Stężenie VEGF w surowicy krwi pacjentów w poszczególnych pomiarach

Zmienna 1. pomiar – dla grupy badanej test Manna-Whitneya  $Z=-0,36, p=0,71$  (NS)



Ryc. 2. Porównanie stężenia VEGF w surowicy krwi w grupie badanej (pomiar 1.) i kontrolnej



**Ryc. 3.** Porównanie stężenia VEGF w surowicy krwi w grupie badanej (pomiar 2.) i kontrolnej

Mówiąc o pooperacyjnej ranie neurochirurgicznej, autorzy mają na myśli ranę powstałą w wyniku cięcia mechanicznego w trakcie zabiegu operacyjnego, która goi się w sposób doraźny (rychłozrost). Rana zszyta wytwarza na ogół bliznę o znikomych rozmiarach. Gojenie takiej rany trwa ok. 7–14 dni.

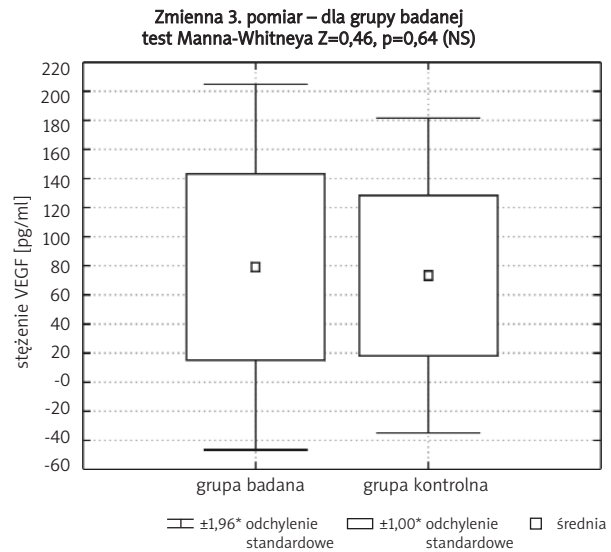
Rola VEGF w procesie gojenia się ran nie jest dokładnie poznana. Dotychczas udowodniono, że VEGF bierze udział w fazie zapalenia (przy gojeniu się ran) oraz w fazie proliferacji przy odróżeniu naczyń krwionośnych.

Przeprowadzone badania wskazują, iż stały wzrost poziomów VEGF jest charakterystyczny dla wczesnego okresu gojenia się rany zarówno w serum, jak i w płynie z drenażu rany [5]. Wyniki badań sugerują taki model angiogenezy, w którym początkowy bodziec angiogeniczny jest zaopatrzony w czynnik wzrostu fibroblastu (bFGF), a następnie pojawia się angiogeniczny bodziec o wydłużonym działaniu, przekazywany przez VEGF [4]. Stwierdzono również zależność między VEGF i pozostałymi czynnikami wzrostu a zdolnością (dobrą, słabą) gojenia się rany [3]. W przypadku ran przewlekłych wykazano również, że enzymy proteolityczne znajdujące się w płynie wysiękowym z ran przewlekłych (szczególnie plazmina) mogą rozkładać VEGF. Inaktywacja VEGF może być ważnym elementem patofizjologii ran przewlekłych [13].

Badania wymagają kontynuacji, ze zwiększeniem grupy badanej i z uszczegółowieniem analizy czynników mogących wpływać na proces gojenia się rany w korelacji ze stymulatorami angiogenezy (np. bFGF, HGF) i hemostazy (np. TF, TFPI, TAFI).

## Wnioski

1. W badaniach nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu VEGF w surowicy krwi w poszczególnych



**Ryc. 4.** Porównanie stężenia VEGF w surowicy krwi w grupie badanej (pomiar 3.) i kontrolnej

porównaniach przed zabiegiem operacyjnym i po nim, jak również w porównaniu z grupą kontrolną.

2. Dalsze badania powinny być ukierunkowane na zwiększenie grupy badanej oraz przedstawienie korelacji wybranych czynników procesu gojenia się rany ze stymulatorami angiogenezy.

Praca została sfinansowana przez Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu w ramach grantu UMK nr 45/2007 (*Collegium Medicum*).

## Piśmiennictwo

1. Nissen NN, Polverini PJ, Gamelli RL, DiPietro LA. Basic fibroblast growth factor mediates angiogenic activity in early surgical wounds. *Surgey* 1996; 4: 457-65.
2. Servold SA. Growth factor impact on wound healing. *Clin Pediatr Med Surg* 1991; 4: 937-53.
3. Walner DL, Heffelfinger SC, Stern Y, et al. Potential role of growth factors and extracellular matrix in wound healing after laryngotracheal reconstruction. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000; 3: 363-6.
4. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, et al. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998; 6: 1445-52.
5. Karayiannakis AJ, Zbar A, Polychronidis A, Simopoulos C. Serum and drainage fluid vascular endothelial growth factor levels in early surgical wounds. *Eur Surg Res* 2003; 6: 492-6.
6. Majewski W. Gojenie się ran. W: *Leczenie ran trudno gojących się*. Oszkinnis G, Gabriel M, Pukacki F, Majewski W (red.). Blackhorse, Warszawa 2006; 17-29.
7. Kozia K. Angiogeneza terapeutyczna. W: *Angiologia*. Pasierski T, Gacingski Z, Torbicki A, Szmidt J (red.). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2004; 183.
8. Zadeh G, Guha A. Angiogenesis in nervous system disorders. *Neurosurgery* 2003; 53: 1362-76.
9. Bates DO, Harper SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vasc Pharmacol* 2003; 39: 225-37.
10. Harrington MR. Angiogenic factors in the central nervous system. *Neurosurgery* 2003; 53: 639-61.
11. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* 2000; 50: 1-15.
12. Szewczyk MT, Cwajda J, Brazis P. Proces gojenia ran. W: *Owrodzenia żyłne goleni*. Jawień A, Szewczyk MT (red.). Twoje Zdrowie, Warszawa 2005; 58-68.
13. Eming SA, Krieg T. Molecular mechanisms of VEGF-A action during tissue repair. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2006; 11: 79-86.