

УДК 616-092:577.15

О. М. Петренко<sup>1</sup>, Б. Г. Безродний<sup>1</sup>, А. О. Тихомиров<sup>2</sup><sup>1</sup> Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ<sup>2</sup> Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, Київ

## МОНІТОРИНГ ПЕРЕБІГУ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ У ГНІЙНИХ РАНАХ

**Мета роботи** — дослідити динаміку змін активності желатинази у тканинах ранової поверхні на різних етапах загоєння гнійних ран.

**Матеріали і методи.** Проведено комплексне дослідження перебігу ранового процесу у 35 пацієнтів з гнійними ранами шкіри та підшкірної клітковини. Серед них було 18 чоловіків та 17 жінок. Середній вік пацієнтів становив  $(30,0 \pm 2,3)$  року. Всім пацієнтам здійснили оперативне лікування — адекватне розкриття та санацію гнійного вогнища з дренованям. Під час загоєння проводили скринінг традиційних бактеріологічних та цитологічних показників, а також визначали активність матриксних металопротеїназ (ММП) у тканинах ранової поверхні.

**Результати та обговорення.** Встановлено, що у пацієнтів з гнійними захворюваннями шкіри відбувалося поетапне загоєння ран, про що свідчили результати цитологічних та мікробіологічних досліджень. Поряд зі змінами бактеріального пейзажу рани та цитологічної картини відбувалася зміна активності ММП, яка відповідала певному періоду загоєння ран.

**Висновки.** Установлено, що особливості динаміки змін активності ММП характерні для певних фаз загоєння. Активність ММП може бути чутливим маркером репаративних процесів при ранових пошкодженнях шкіри та використовуватися як прогностичний критерій при їх лікуванні.

■

**Ключові слова:** загоєння ран, матриксні металопротеїнази, зимографія, цитограми.

Рановий процес — це сукупність молекулярних та клітинних процесів, які послідовно відбуваються в рані і спрямовані на репарацію пошкодженої тканини з відновленням її цілісності. При оцінці перебігу ранового процесу принципове значення має об'єктивна оцінка ефективності репаративних процесів на певних стадіях загоєння. Крім традиційної топографо-анатомічної і морфологічної характеристики рани, для діагностики і прогнозування перебігу ранового процесу застосовують мікробіологічні та біохімічні дослідження [4]. Коректна діагностика ранового процесу, яка ґрунтується на використанні об'єктивних критеріїв, допомагає обрати стратегію лікування проблемних ран. Вважається, що швидкість загоєння ран не просто є функцією часу, а відбиває стадійність ранового процесу та ступінь реалізації його механізмів. Повнота участі певних молекулярних та клітинних компонентів визначає швидкість загоєння, тому аналіз ключових учасників цього про-

цесу дає змогу кількісно оцінити ефективність репаративних процесів [7].

Один із напрямів дослідження ранових процесів — вивчення молекулярних систем, які відповідають за ремоделювання екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ). У регуляції стану ЕЦМ бере участь значна кількість літичних ензимів [1, 3]. Особливу роль у метаболізмі компонентів ЕЦМ відіграють ензими родини матриксних металопротеїназ (ММП). Так, саме завдяки їм забезпечується реепітелізація під час загоєння шкірних ран [8, 14]. ММП належать до родини  $Zn^{2+}$ -залежних ендopeптідаз. За первинною структурою, субстратною специфічністю та клітинною локалізацією ці ензими класифікують на чотири основні підгрупи: колагенази, желатинази, стромелізини та мембранозв'язані ММП [5]. Підгрупи ММП локалізуються в певних зонах ран, їх активація припадає на різні періоди процесу загоєння, а ізоформний спектр та кількісний вміст залежать від

Петренко Олег Миколайович, к. мед. н., асистент кафедри  
E-mail: olegnpetrenko@ukr.net

© О. М. Петренко, Б. Г. Безродний, А. О. Тихомиров, 2014

клітинного наповнення рани. ММП-2 і ММП-9, активність яких досліджували у цій роботі, належать до підродини желатиназ. Ці ензими деградують колагени типів 4 та 5, еластин у складі базальних мембран та денатурований колаген (желатин), доповнюючи функції колагеназ у процесах деградації фібрилярних колагенів. З огляду на ключову роль, яку відіграють ММП у ремоделюванні ЕЦМ у локусі пошкодження, активність цих ензимів може бути адекватним молекулярним критерієм ефективності процесу загоєння [6]. Активність ММП визначали переважно у післяопікових та післяопераційних ранах, рановому ексудаті, витяжках з перев'язувального матеріалу [3, 18], тоді як динаміка змін активності ММП безпосередньо у пошкодженій тканині на різних етапах загоєння досліджена мало.

**Мета роботи** — дослідити динаміку змін активності желатиназ у тканинах ранової поверхні на різних етапах загоєння гнійних ран.

#### **МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ**

Для дослідження відбирали зразки тканин у 35 пацієнтів з гнійними захворюваннями шкіри та м'яких тканин (післяін'єкційні абсцеси сідниць, фурункули, флегмони кінцівок, панариції пальців). Серед них було 18 чоловіків та 17 жінок. Середній вік пацієнтів —  $(30,0 \pm 2,3)$  року. Хворі були працездатні та не мали супутньої патології.

Всім пацієнтам проводили оперативне лікування — адекватне розкриття та санацію гнійного вогнища з дренажуванням. Рани не зашивали. Рани заживали вторинним натягом. Середній ліжко-день становив  $(11,6 \pm 0,8)$  доби. Протягом післяопераційного періоду хворим здійснювали перев'язки з антисептиками та знеболювальними препаратами.

Проводили загальноклінічні та біохімічні аналізи, коагулограму крові, мікробіологічне і цитологічне дослідження ранових відбитків за методом Покровської — Макарова.

Для мікробіологічного аналізу проби відбирали під час санації гнійного вогнища. Кількість мікроорганізмів визначали за кількістю колонієутворювальних одиниць (КУО) на одиницю площі чашки Петрі. У разі КУО від 0 до 25 ріст мікроорганізмів вважали скудним, від 25 до 50 — помірним, понад 50 КУО — рясним.

Перед забором зразків тканини для аналізу ММП із рани видаляли некротичний шар, залишки медикаментів, з однієї й тієї самої ділянки послідовно робили 2—3 відбитки. Після фарбування за Романовським проводили мікроскопію відбитків. Для точнішого уявлення про динаміку процесу клітинний склад виражали у відсотках від загальної кількості клітин, підраховуючи від 100 до 300 клітин у різних місцях препарату залежно від однорідності клітинного складу. Зразки тканин шкіри відбирали під час операції на 1-шу—7-му добу лікування. Екстракцію білків проводили

шляхом гомогенізації тканини у 50 ммоль трис-буфері (рН 7,4) з наступним руйнуванням клітин за допомогою ультразвукової дезінтеграції. Залишки тканинного матеріалу та клітинний дебрис відділяли від рідкої фази за допомогою центрифугування при 12 тис. g протягом 45 хв за температури 4°C. Концентрацію білка в отриманих екстрактах визначали за методом Бредфорд [10].

ММП у пробах виявляли за допомогою желатинової зимографії [16]. Проби готували, змішуючи екстракти білків з буфером за Леммлі, який не містив відновлювальних агентів [11]. Гель для проведення електрофорезу (8% акриламід) полімеризували разом із желатином (5 мг/мл). Проби поміщали на пластину гелю з розрахунку 30 мкг білка на доріжку та проводили електрофоретичне розділення білків за наявності 0,1% додецилсульфату натрію (ДСН). Після закінчення електрофорезу з гелю видаляли надлишок ДСН та проводили інкубацію гелю за температури 37°C протягом 16 год, при цьому желатинази, які містяться у ньому, деградують субстрат. Далі гель зафарбовували у розчині барвника SERVA Blau R, знебарвлення проводили у розчині, який містив етанол та оцтову кислоту. Наявність ММП-2 та ММП-9 визначали за появою світлих смуг на темнозбарвленому тлі. Інтенсивність та площа смуг були пропорційні активності протеїназ, що дає змогу кількісно виразити результати аналізу. Для проведення кількісного аналізу гелі сканували, отримані зображення обробляли із застосуванням денситометричного аналізу. Активність желатиназ виражали у відсотках від оптичної густини проб, відібраних у першу добу.

Статистичну обробку даних проводили з використанням t-критерію Стьюдента. Різницю між середніми величинами вважали вірогідною при  $p < 0,05$  [2].

Дослідження проводили у хірургічному відділенні № 2 Київської міської клінічної лікарні № 4 (клінічна база кафедри хірургії № 2 Національного медичного університету імені О. О. Богомольця).

#### **РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ**

Результати комплексних цитологічних та мікробіологічних досліджень ранового процесу в період з 1-ї до 7-ї доби свідчать про нормальний перебіг загоєння після оперативного лікування. У першу добу після операції в усіх пацієнтів з гнійними процесами відзначено поліпшення загального стану, зменшення болю, нормалізацію температури тіла. Рани були гнійні, гіперемовані, набрякли, вкриті фібрином і детритом. Виділення гнійні, в значній кількості. Для цього етапу ранового процесу характерний дегенеративно-запальний тип цитограми з мало вираженими ознаками запальної реакції. Цитологічні препарати містять значну кількість нейтрофілів у стадії дегенерації та деструкції у вигляді каріопікнозу, каріорексису і

цитолізу. Спостерігаються деякі ознаки фагоцитарної активності. При бактеріологічному дослідженні виявлено штами *Staphylococcus aureus* (зазвичай їх асоціації). Кількість їх переважала 50 КУО на одиницю площі чашки Петрі. Мікроорганізми у значній кількості містилися всередині клітин.

При дослідженні ранових відбитків на другу добу після операції виявлено більш виражений запальний тип цитогам, що свідчить про нормальний перебіг гострого запалення у I фазі ранового процесу. Частка нейтрофілів становила 80–85 % від загальної кількості клітин, на сумарну частку лімфоцитів, моноцитів, макрофагів та полібластів припадало близько 10–15 % (рис. 1А). Мікрофлора визначалася в незначній кількості та містилася внутрішньоклітинно в стані завершеного фагоцитозу. При цьому кількість мікроорганізмів у рані швидко зменшувалася, зокрема, збільшення вмісту *Staphylococcus aureus* у рані було помірним і не перевищувало 50 КУО.

Починаючи з четвертої доби післяопераційного періоду, в пацієнтів відзначено зменшення набряку та гіперемії рани, больовий синдром був не вираженим. При дослідженні ранової поверхні слід зазначити запально-регенераторний тип цитогам, який свідчить про нормальний перебіг процесу загоєння. При цьому відбувається зменшення кількості нейтрофілів до 60–70 %. Частка тканинних недиференційованих полібластів, фібробластів та лімфоцитів становила 20–30 % від загальної кількості клітин, причому половина з них представлена макрофагами (рис. 1Б). Це свідчить про розвиток процесів, спрямованих на очищення рани. Мікрофлора виявлялася у незначній кількості у фазі завершеного фагоцитозу. При бактеріологічному дослідженні росту мікроорганізмів не виявлено.

На сьому добу захворювання у пацієнтів стан нормалізувався до задовільного. Пацієнти практично не скаржилися на болі в рані. При огляді ранової поверхні набряк не спостерігався, гіперемія була незначною, виділення серозні, скудні. У ранових цитологічних відбитках виявлено ознаки регенераторного типу, що характеризує початок II фази ранового процесу. Переважали клітини молодшої грануляційної тканини, про- та фібробласти, макрофаги, ендотелій, полібласти, вміст нейтрофілів зменшується до 40–45 % (рис. 1В), що свідчило про перехід від стадії запалення до проліферативної стадії. Одночасно відбувався процес крайової епітелізації. Епітелій представлений у препараті у вигляді характерних пластів світлих клітин з широкою цитоплазмою. Мікрофлори на цій стадії практично не було. Регенераторний тип цитогам та результати мікробіологічного аналізу свідчили про сприятливий перебіг II фази загоєння та визначали показання для закриття ранової поверхні швами або шкірною пластикою.

Таким чином, результати цитологічних та мікробіологічних досліджень свідчили про нормальний перебіг процесу загоєння, а отже, зміни активності ММП відбивають зрушення на молекулярному рівні, які притаманні активним репаративним процесам. Результати желатинової зимографії ММП у зразках шкіри та підшкірної клітковини наведено на рис. 2. Ензим-форез дав змогу виявити наявність двох груп каталітично активних желатиназ, які за молекулярними масами відповідали ММП-2 і ММП-9.

За допомогою денситометричного аналізу зимограм встановлено, що статистично значуще зростання активності ММП-9 відбувається на четверту добу ранового процесу, перевищуючи вихід-

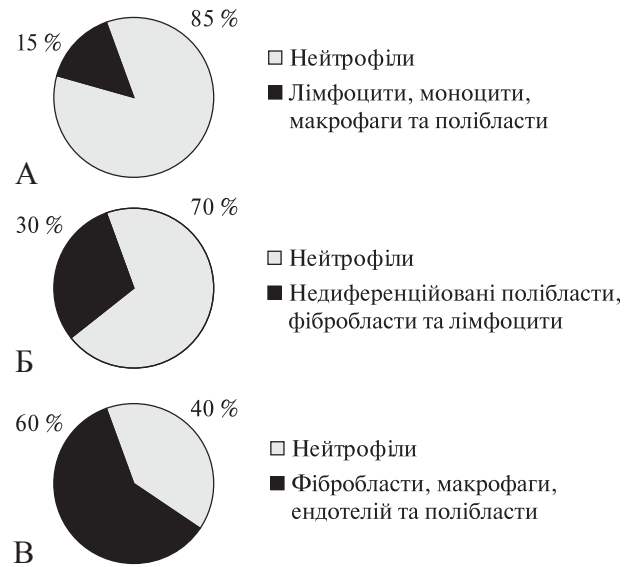


Рис. 1. Зміни співвідношення різних типів клітин у рановій поверхні на другу (А), четверту (Б) та сьому (В) добу після операції (за результатами цитогам)

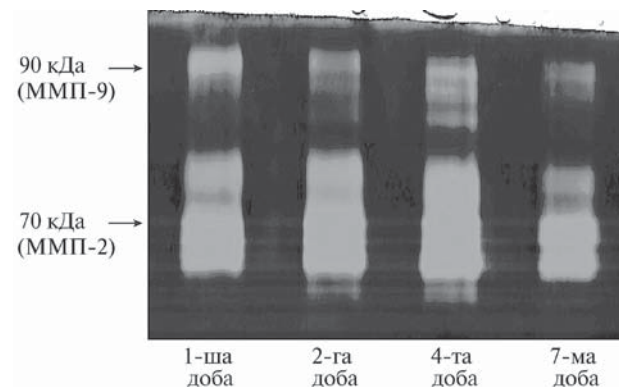


Рис. 2. Репрезентативна зимограма тканин ранової поверхні, відібраних на різних стадіях загоєння (1-ша–7-ма доба). Стрілками позначені молекулярні маси різних ізоформ металопротеїназ, які відповідають желатиназам ММП-9 і ММП-2

ний показник у середньому на 54 % (рис. 3А). На сьому добу загоєння спостерігається різке зниження активності ММП-9 (на 68 %). Це можна пояснити змінами у клітинному наповненні рани під час її загоєння. Відомо, що основне джерело ММП-9 — це нейтрофіли [15]. Оскільки динаміка активності ММП-9 корелює з кількістю нейтрофілів у рановій поверхні, що підтверджують результати цитологічних досліджень, то можна вважати, що зміна активності цього ензиму характеризує перехід від запального до проліферативного фенотипу.

Можливо, що на сьому добу певний внесок у желатиназну активність, яку визначають ММП-9, роблять кератиноцити, які також здатні експресувати ці протеїнази для забезпечення своєї міграції [9, 17].

Більш істотно порівняно з активністю ММП-9 змінюється активність ММП-2 (див. рис. 3Б). Статистично значуще зростання (на 34 %) активності ММП-2 спостерігали вже на другу добу післяопераційного періоду, причому максимальна активність цієї желатинази, як і у випадку ММП-9, спостерігається на четверту добу, перевищуючи на 116 % вихідний рівень. На сьому добу відбувається зниження активності ММП-2, величина якої становить лише 44 % від показника у першу добу дослідження. Можливо, зростання активності ММП-2 на перших етапах загоєння — це необхідна умова для проліферації та міграції кератиноцитів. У дослідженнях [13] встановлено, що інгібування ММП-2 призводило до помітного зниження швидкості збільшення кератиноцитів *in vitro*. Імовірно, що синхронний спалах активності обох желатиназ, зареєстрований на четверту добу ранового процесу, — важливий фактор для забезпечення вивільнення та міграції кератиноцитів через ЕЦМ. Водночас, не менш вирішальним чинником для ефективного загоєння є своєчасне гальмування функціональної активності ММП у міру завершення процесу формування та перебудови гранулярної тканини. На користь цього свідчать результати роботи R. Lobman та співавт. [12], які демонструють, що у рановому субстраті діабетичних виразок нижніх кінцівок спостерігається високий рівень експресії ММП, що може відігравати провідну роль у хронізації ран. Отже, регуляція експресії та активації ММП у ранах, які не загоюються тривалий час, може бути одним зі шляхів підвищення ефективності їх терапії.

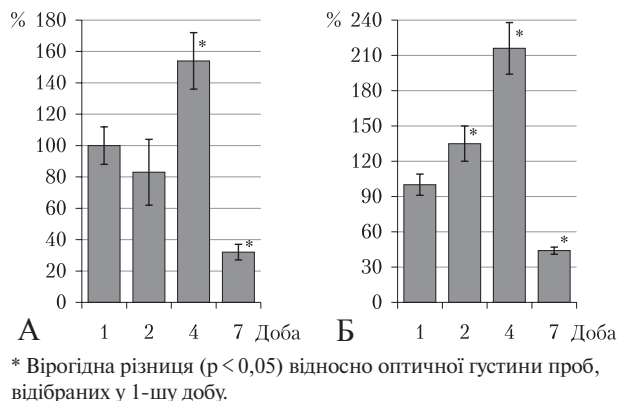


Рис. 3. Результати денситометричного аналізу зимограм, які демонструють динаміку змін активності ММП-9 (А) та ММП-2 (Б) під час процесу загоєння гнійних ран (у відсотках від оптичної густини проб, відібраних у 1-шу добу)

Дані, наведені у роботі, стосуються змін желатиназної активності тканин ранової поверхні та їх зв'язку із цитологічними та мікробіологічними показниками під час нормального загоєння ран. Пропонуємо використовувати моніторинг активності ММП-2 і ММП-9 як прогностичний показник результату загоєння, а також для вибору стратегії лікування проблемних ран.

#### ВИСНОВКИ

Проведено моніторинг активності матриксних металопротеїназ у зразках шкіри та підшкірної клітковини за ранового процесу. Встановлено особливості змін цього показника на різних етапах загоєння.

Максимальна активність желатиназ (ММП-2 та ММП-9) припадає на четверту добу післяопераційного періоду. Зменшення активності матриксних металопротеїназ відбувається на сьому добу перебігу ранового процесу.

Виявлені зміни активності матриксних металопротеїназ характеризують процес нормального загоєння ран.

Визначення динаміки рівня матриксних металопротеїназ може бути адекватним маркером репаративних процесів при ранових пошкодженнях шкіри та застосовуватися як прогностичний критерій при їх лікуванні.

#### Література

1. Андрущенко П. И. Объект изучения клеточной трансплантологии: металлопротеиназы // Трансплантология. — 2005. — Т. 8, № 1. — С. 38—45.
2. Кокунин В. А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Укр. биохим. журн. — 1975. — Т. 47, № 6. — С. 776—790.
3. Протасов М. В., Смагина Л. В., Юдинцева Н. М. Возможность прогнозирования эпителизации ран у крыс по изменению активности матриксных металлопротеиназ в раневом экссудате // Цитология. — 2009. — Т. 51, № 4. — С. 311—314.



4. Раны и раневая инфекция / Под ред М. Н. Кузина, Б. М. Костюченко. — М.: Медицина, 1990. — 592 с.
5. Рогова Л. Н. Матриксные металлопротеиназы, их роль в физиологических и патологических процессах (обзор) // Вестн. новых медицинских технологий. — 2011. — Т. 18, № 2. — С. 86—89.
6. Соловьева Н. И., Рыжакова О. С. Методы определения активности матриксных металлопротеиназ // Клиническая и лабораторная диагностика. — 2010. — № 2. — С. 17—21.
7. Хрупкин В. И., Зубрицкий В. Ф., Ивашкин А. Н. и др. Дерматопластика раневых дефектов. — М.: Гэотар-Медиа, 2009. — 192 с.
8. Armstrong G., Jude E. The role of matrix metalloproteinases in wound healing // J. Am. Podiatr. Med. Assoc. — 2002. — Vol. 92, N 1. — P. 12—18.
9. Arumugam S., Jang Y. C., Chen-Jensen C. et al. Temporal activity of plasminogen activators and matrix metalloproteinases during cutaneous wound repair // Surgery. — 1999. — Vol. 125. — P. 587—593.
10. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72. — P. 248—254.
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680—683.
12. Lobman R., Ambrosch A., Schultz G. et al. Expression of gelatinase (MMP-2) in diabetic and non-diabetic wounds // Diabetologia. — 2001. — Vol. 44 (suppl. e 1). — P. 4.
13. Mäkelä M., Larjava H., Pirilä E. et al. Metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratocytes // Exp. Cell. Res. — 1999. — Vol. 251. — P. 67—78.
14. Martins V. L., Caley M., O'Toole E. A. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair // Cell. Tissue Res. — 2013. — Vol. 351. — P. 255—268.
15. Mirastschijski U., Impola U., Jähkola T. et al. Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds // Human Pathol. — 2002. — Vol. 33. — P. 355—364.
16. Oliver G. W., Stettler-Stevenson W. G., Kleiner D. E. Zymography, casein zymography and reverse zymography: activity assays for proteases and their inhibitors // Handbook of proteolytic enzymes. — San Diego Acad. Press, 1999. — P. 61—76.
17. Sawicki G., Marcoux Y., Sarkhosh K. et al. Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their inhibitors // Mol. Cell Biochem. — 2005. — Vol. 269. — P. 209—216.
18. Wysocki A. B., Staiano-Coico L., Grinnell F. Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 // J. Invest. Dermatol. — 1993. — Vol. 101. — P. 64—68.

О. Н. Петренко<sup>1</sup>, Б. Г. Безродный<sup>1</sup>, А. А. Тихомиров<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца, Киев

<sup>2</sup>Институт биохимии имени А. В. Палладина НАН Украины, Киев

## МОНИТОРИНГ ТЕЧЕНИЯ РАНЕВОГО ПРОЦЕССА В ГНОЙНЫХ РАНАХ

**Цель работы** — исследовать динамику изменений активности желатиназ в тканях раневой поверхности на разных этапах заживления гнойных ран.

**Материалы и методы.** Проведено комплексное исследование течения раневого процесса у 35 пациентов с гнойными ранами кожи и подкожной клетчатки. Среди них было 18 мужчин и 17 женщин. Средний возраст пациентов —  $(30,0 \pm 2,3)$  года. Всем пациентам проводили оперативное лечение — адекватное раскрытие и санацию гнойного очага с дренированием. Во время заживания выполняли скрининг традиционных бактериологических и цитологических показателей, а также определяли активность матриксных металлопротеиназ (ММП) в тканях раневой поверхности.

**Результаты и обсуждение.** Установлено, что у пациентов с гнойными заболеваниями кожи происходило поэтапное заживление ран, о чем свидетельствовали результаты цитологических и микробиологических исследований. Наряду с изменениями бактериального пейзажа и цитологической картины происходило изменение активности ММП, которое соответствовало определенному периоду заживления раны.

**Выводы.** Установлено, что особенности динамики изменений активности ММП характерны для определенных фаз заживления. Активность ММП может служить чувствительным маркером репаративных процессов при раневых повреждениях кожи и использоваться в качестве прогностического критерия при их лечении.

**Ключевые слова:** заживление ран, матриксные металлопротеиназы, зимография, цитограммы.

О. N. Petrenko<sup>1</sup>, B. G. Bezrodnyy<sup>1</sup>, A. A. Tykhomyrov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv

<sup>2</sup>O. V. Palladin's Institute of Biochemistry of NAS of Ukraine, Kyiv

## MONITORING OF WOUND HEALING PROCESS IN PURULENT WOUNDS

**The aim** — to study the gelatinase's activity at wound healing in patients with purulent wound.

**Materials and methods.** A complex assessment of wound healing process in 35 patients with purulent wounds of the skin and subcutaneous tissue was performed. Among them were 18 men and 17 women. The average age of patients —  $30.0 \pm 2.3$  years. All patients underwent surgical treatment — adequate disclosure and sanitation with purulent focus drainage. During healing process, the conventional bacteriological and cytological indexes were monitored and matrix metalloproteinases (MMPs) activity levels in the wound surface tissues were evaluated.

**Results and discussion.** The study found that patients with purulent skin diseases gradually healing took place, as evidenced by the cytological and microbiological studies' results. However, along with changes in the bacterial wound landscape and cytological picture, the MMP activity's changes has been happened corresponding to healing period.

**Conclusions.** It was established that the features of the MMP activity dynamics change is typical for certain phases of healing. MMP activity may serve as a sensitive marker of reparative processes occurring in skin wound and can be used as a prognostic criterion during their treatment.

**Key words:** wound healing, matrix metalloproteinase, zymography, cytograms.