

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ У ХРОНІЧНИХ РАНАХ М'ЯКИХ ТКАНИН У ХВОРИХ НА ЦУКРОВИЙ ДІАБЕТ ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ВАКУУМНОЇ ТЕРАПІЇ

О. М. Петренко, А. О. Тихомиров, О. В. Петренко

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця МОЗ України,
Інститут біохімії імені О. В. Палладіна НАН України, м. Київ
Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України, м. Київ

CHANGES OF ACTIVITY OF THE MATRIX METALLOPROTEINASES IN CHRONIC WOUNDS OF SOFT TISSUES IN PATIENTS, SUFFERING DIABETES MELLITUS WHILE VACUUM—THERAPY APPLICATION

O. M. Petrenko, A. O. Tykhomyrov, O. V. Petrenko

Bogomolets National Medical University, Kyiv
Institute of Biochemistry named after O. V. Palladin, Kyiv
Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv

Дисбаланс між розщепленням та відкладанням компонентів екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ) внаслідок порушення активаторно—інгібіторного балансу протеїназ є основною причиною переходу ран різної етіології в хронічні. За деградацію та ремоделювання ЕЦМ у рані відповідають в основному ферменти родини ММП, що об'єднує Zn—залежні ендопептидази. Клінічні спостереження, а також експериментальні дослідження, проведені на трансгенних тваринах з підвищеною експресією ММП, доводять, що аномальне підвищення активності ММП—1, ММП—2, ММП—8 та ММП—9 на тлі зменшення синтезу їх ендогенних інгібіторів зумовлює порушення епітелізації ран, загострення запальних реакцій, збільшення тривалості загоєння [1]. Надмірну активність ММП спостерігали й у хронічних виразках шкіри хворих на ЦД [2]. З огляду на поширення такого діабетичного ускладнення, як синдром діабетичної стопи (СДС), розробка й впровадження методів лікування, спрямованих на модуляцію протеолітичної активності ферментів у пошкоджених тканинах, є вкрай важливим та перспективним напрямком досліджень. Крім фармакологічних інгібіторів ММП та асеп-

тичних засобів, у хірургічній практиці все ширше застосовують підходи, основані на неспецифічному пригніченні активності протеїназ у рані.

Останнім часом у терапії ран, спричинених СДС, використовують VAC—терапію (Vacuum—Assisted Closure), основу на створенні локального негативного тиску (Topical

Negative Pressure — TNP) [3]. Результати клінічних спостережень свідчать, що VAC—терапія забезпечує позитивну динаміку загоєння ран [4]. Проте, молекулярна складова механізмів, завдяки яким VAC—терапія сприяє нормалізації репаративних процесів, недостатньо вивчена. Найбільш ефективним локальне застосування вакуумних пов'язок вия-

Реферат

Досліджений вплив вакуум (VAC)—терапії на колагенолітичну активність протеїназ у рановому ексудаті та біопсійному матеріалі хронічних ран м'яких тканин у 52 хворих на цукровий діабет (ЦД). Активність матриксних металопротеїназ (ММП) у пробах пошкоджених тканин та ексудатів визначали за даними желатинової зимографії. Нормалізація протеолітичних процесів внаслідок усунення надмірної колагенолітичної активності з тканин рани за допомогою апарата, що створює негативний тиск, корелювала з позитивною динамікою загоєння. Отже, модуляцію активності ММП слід розглядати як один з ключових механізмів лікувального ефекту VAC—терапії хронічних ран м'яких тканин при ЦД.

Ключові слова: цукровий діабет; рани м'яких тканин; активність металопротеїназ; вакуумна терапія.

Abstract

Impact of vacuum—therapy (VAC) on a collagen—lytic activity of proteinases in the wound exudates and biopsy material of chronic wounds of soft tissues, was investigated in 52 patients, suffering diabetes mellitus (DM). Activity of the matrix metalloproteinases (MMP) in specimen of damaged tissues and exudates was determined in accordance to data, obtained using the gelatin zymography. The proteolytic processes normalization due to elimination of excessive collagen—lytic activity from the wound tissues, using apparatus, which creates a negative pressure, had correlated with positive dynamics of healing. Thus, the MMP activity modulation must be regarded as one of the key mechanisms of treatment effect of VAC—therapy on chronic wounds of soft tissues in DM.

Keywords: diabetes mellitus; wound of soft tissues; activity of metalloproteinases; vacuum therapy.

вилосся при лікуванні ексудативних, у тому числі хронічних діабетичних виразок нижніх кінцівок. При цьому VAC—терапія забезпечує зменшення ранової ексудації, підтримуючи помірно вологе середовище в рані, необхідне для нормального перебігу репаративно—регенераторних процесів, сприяє видаленню значної кількості патогенної мікрофлори, покращує ангіогенні процеси, клітинну проліферацію та синтез у рані основних речовин сполучної тканини [5]. Потребує вивчення питання щодо адекватності застосування VAC—терапії для нормалізації колагенолітичної активності в рані й можливості використання цього молекулярного показника як потенційного прогностичного критерію ефективності лікування проблемних ран.

Метою дослідження було вивчення впливу VAC—терапії на колагенолітичну активність протеїназ у матеріалі біопсії та рановому ексудаті хронічних ран м'яких тканин у хворих на ЦД.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Обстежені 52 пацієнти з операційними ранами на тлі СДС, яких лікували у відділенні гнійної хірургії КМКЛ № 4 за період 2014 — 2015 рр. Ведення пацієнтів протягом періоду та відбір матеріалу відповідали етичним нормам, пацієнти дали письмову згоду на участь у дослідженні. Усі пацієнти оперовані. Площа ран становила у середньому $(35,6 \pm 2,5)$ см². Вік пацієнтів у середньому $(60,4 \pm 3,2)$ року. Пацієнти розподілені на дві групи, основну — 32 пацієнти, в тому числі 19 чоловіків та 13 жінок, та контрольну — 20 пацієнтів (жінок — 10, чоловіків — 10). За віком, статтю та супутніми захворюваннями групи були репрезентативні. Усім пацієнтам проведено комплексну нейротропну, дезагрегантну та поліантибактеріальну терапію за деескалаційним типом, а також адекватну медикаментозну терапію, спрямовану на підтримку функціонального стану основних органів і систем організму, корекцію хронічної ішемії тканин нижніх кінцівок. У пацієнтів

контрольної групи під час місцевого лікування ран застосовували мазеві пов'язки, проводили пов'язки з використанням розчинів антисептиків.

У лікуванні пацієнтів основної групи застосовували VAC—терапію, рівень негативного тиску від —50 до —200 мм рт. ст. (оптимальною вважали величину —80... —125 мм рт. ст.) на тлі розвантаження стопи. Вакуумні пов'язки — це гідрофільні поліуретанові губки з розміром пор 400 — 2000 мкм з прозорого адгезивного покриття, з'єднані дренажною трубкою з апаратом—джерелом вакууму, що містить контейнер для збирання ексудату з детритом. Використовували VAC—систему фірми "КСІ" (США). Вакуумний апарат має зовнішній контрольний пристрій, що підтримує різний рівень негативного тиску, здатний забезпечити режим постійної вакуумізації рани. Тривалість накладання однієї пов'язки у середньому від 1 до 3 діб. У цілому тривалість VAC—терапії 10 діб, при цьому двічі замінювали пов'язку. Для оцінки ефективності VAC—терапії визначали прямі показники динаміки ранового процесу, зокрема, дані планіметричного дослідження, проводили візуальну оцінку стану рани та навколишніх тканин, а також мікробіологічне дослідження ран.

Перед відбором зразків тканин для аналізу ММП з рани видаляли некротизовані тканини і залишки лікарських засобів. Біопсію проводили після госпіталізації пацієнта та на 5—ту і 10—ту добу після лікування. Зразки тканин з рани промивали у стерильному ізотонічному розчині натрію хлориду та зберігали при температурі —80 °С. Для проведення біохімічних аналізів зразки тканин гомогенізували у 50 ммоль трис—буфері (рН 7,4), що містив 0,15 моль NaCl, з подальшою ультразвуковою дезінтеграцією з застосуванням прилада Sartorius (Labsonic® M, Гетинген, Німеччина) для екстракції тканинних протеїнів. Ексудат гнійних ран у хворих на ЦД відбирали під час вакуумного дренивання гнійної порожнини. До проведення дослідження матеріал зберігали при температурі —80 °С. Активність

ММП визначали методом ензим—форезу (желатинової зимографії) з подальшим денситометричним аналізом зимограм [6]. Активність ферментів визначали у відсотках від величини, отриманої у 1—шу добу спостереження, виражали у вигляді медіани.

Статистична обробка даних проведена з використанням U—критерію Манна—Уїтні, різницю між середніми величинами вважали вірогідною при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При дослідженні динаміки ранового процесу встановлено, що застосування негативного тиску сприяло ранньому очищенню ран від на шарування фібрину та вогнищ некрозу, видаленню патогенної мікрофлори, зменшенню площі та глибини ран, росту грануляційної тканини, прискоренню крайової епітелізації. Застосування VAC—терапії дозволило значно зменшити тривалість ран до пластичного закриття та обсяг оперативного втручання (рівень ампутації кінцівки).

Результати желатинової зимографії ММП у зразках біоптату тканин ран пацієнтів обох груп свідчили про наявність поліпептидних зон, що відповідали активним ММП, найбільш вираженою з яких виявилася ММП—9 (молекулярна маса 92 кДа).

У пацієнтів як контрольної, так і основної групи спостерігали високу вихідну активність ММП у 1—шу добу дослідження, що підтверджувало хронічний перебіг ранового процесу у пацієнтів обох груп.

У пацієнтів основної групи, у яких до проведення VAC—терапії колагенолітична активність була на рівні такої у контрольній групі, на 5—ту добу спостерігали вірогідне зниження активності ММП—9 на 68% ($p < 0,05$) відносно вихідної, на 10—ту добу — не більше ніж на 45% ($p < 0,05$).

Зміни активності тканинних протеїназ зумовлені модифікацією видів клітин рани при загоєнні. Основним джерелом ММП—9 у рані є нейтрофільні гранулоцити, керати-

ноцити та фібробласти. Дані літератури свідчать про перехід від запального до проліферативного фенотипу саме у ці строки загоєння рани [7]. Отже, зміни активності ММП—9 відбувалися паралельно з зменшенням кількості прозапальних клітин у вмісті рани на 10—ту добу після VAC—терапії, а залишкова колагенолітична активність зумовлена функціонуванням кератиноцитів, що експресують ММП для забезпечення міграції. У хворих контрольної групи протягом 10 діб відзначали високу активність колагенази у біоптатах. Можливо, стабільно висока колагенолітична активність у ранах таких пацієнтів є наслідком рекрутингу до місця ураження значної кількості ММП—продукуючих клітин, відповідальних за гостру фазу запального процесу. Це спостереження підтверджується результатами цитометрії: цитограми відповідали некротичному і дегенеративно—запальному типу. Крім того, відзначали високе мікробне забруднення поверхні ран. У свою чергу, мікробні протеїнази здатні розщеплювати тканинні субстрати, а також активувати ендогенні ММП [8]. Лише на 10—ту добу у пацієнтів контрольної групи спостерігали появу грануляційної тканини та тенденцію до зниження протеолітичної активності (на 12%), проте, ці зміни не достовірні ($p > 0,05$).

За результатами желатинової зимографії зразків ексудату з ран до початку лікування, а також на 5—ту і 10—ту добу виявлене більш виражене підвищення колагенолітичної ак-

тивності ексудату у пацієнтів основної групи, ніж контрольної.

Відмінності активності ММП у різні строки спостереження в ексудаті хронічних ран хворих на ЦД обох груп свідчили про зворотну тенденцію у порівнянні з цим показником у біоптатах тканин.

Так, у пацієнтів контрольної групи колагенолітична активність виділень з ран мала тенденцію до зниження, зокрема, на 5—ту добу спостереження вона зменшилася майже на 40% у порівнянні з вихідною, різниця статистично значуща.

Оскільки у пацієнтів контрольної групи активність тканинних ММП була стабільно високою, можна зробити висновок, що зменшення надмірної колагенолітичної активності за умови стандартного лікування є пасивним. При застосуванні VAC—терапії на 5—ту і 10—ту добу в ексудаті ран виявлене підвищення активності желатинази відповідно на 68 і 85% у порівнянні з вихідною ($p < 0,05$). При порівнянні цих результатів з даними, що характеризують активність ММП у біоптатах, відзначений зворотній взаємозв'язок: зниження активності у тканинах після накладання вакууму супроводжувалося істотним підвищенням її у вмісті рани.

Новий ексудат відіграє критичну роль у гальмуванні загоєння ран у хворих на ЦД [9]. Випіт хронічних ран, у тому числі діабетичних виразок шкіри, за біохімічними та ферментними особливостями відрізняється від такого у гострих ранах, насамперед, характеризується висо-

кою протеолітичною активністю. Такий ексудат пригнічує або блокує проліферацію кератиноцитів, фібробластів та ендотеліальних клітин, що подовжує період загоєння ран. Підвищена активність ММП та серинових протеїназ спричиняє руйнування або патологічні зміни компонентів ЕЦМ, необхідних для реепітелізації. Крім того, макромолекули ексудату хронічної рани здатні зв'язувати та інактивувати фактори росту й цитокіни [10]. Оскільки ММП контролюють функціонування численних регуляторних молекул та клітин у рановому середовищі, вторинні ефекти VAC—терапії можуть бути реалізовані саме через зміни експресії цих протеїназ.

ВИСНОВКИ

1. Вперше проведено паралельне визначення активності ММП у біоптатах пошкоджених тканин та рановому ексудаті, що дало змогу отримати повну інформацію щодо впливу VAC—терапії на розподіл та мобілізацію колагенолітичних ферментів у ранах у хворих на ЦД.

2. VAC—терапія сприяє усуненню надмірної колагенолітичної активності з пошкоджених тканин хронічних ран у хворих на ЦД.

3. Нормалізація протеолітичних процесів у ранах за умови лікування негативним тиском корелює з позитивною динамікою їх загоєння, отже, може розглядатися як один з ключових механізмів реалізації лікувальних ефектів VAC—терапії.

ЛІТЕРАТУРА

- Rohani M. G. Matrix remodeling by MMPs during wound repair / M. G. Rohani, W. C. Parks // *Matrix Biol.* — 2015. — Vol. 44 — 46. — P. 113 — 121.
- Increased ratio of serum matrix metalloproteinase—9 against TIMP—1 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers / Z. Li, S. Guo, F. Yao [et al.] // *J. Diabet. Complicat.* — 2013. — Vol. 27, N 4. — P. 380 — 382.
- A systematic review of topical negative pressure therapy for acute and chronic wounds / D. T. Ubbink, S. J. Westerbos, E. A. Nelson, H. Vermeulen // *Br. J. Surg.* — 2008. — Vol. 95, N 6. — P. 685 — 692.
- Role of negative pressure wound therapy in healing of diabetic foot ulcers / P. S. Nain, S. K. Uppal, R. Garg [et al.] // *J. Surg. Tech. Case Rep.* — 2011. — Vol. 3. — P. 17 — 22.
- Effectiveness of vacuum—assisted closure (VAC) therapy in the healing of chronic diabetic foot ulcers / A. Nather, S. B. Chionh, A. Y. Han [et al.] // *Ann. Acad. Med. Singapore.* — 2010. — Vol. 39, N 5. — P. 353 — 358.
- Петренко О. М. Моніторинг перебігу ранового процесу у гнійних ранах / О. М. Петренко, Б. Г. Безродний, А. О. Тихомиров // *Хірургія України.* — 2014. — № 2. — С. 65 — 69.
- Interaction of keratinocytes and fibroblasts modulates the expression of matrix metalloproteinases—2 and —9 and their inhibitors / G. Sawicki, Y. Marcoux, K. Sarkhosh [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* — 2005. — Vol. 269, N 1—2. — P. 209 — 216.
- The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: a focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing / S. M. McCarty, C. A. Cochrane, P. D. Clegg, S. L. Percival // *Wound Repair Regen.* — 2012. — Vol. 20, N 2. — P. 125 — 136.
- Chamanga E. Effectively managing wound exudates / E. Chamanga // *Br. J. Commun. Nurs.* — 2015. — Suppl. *Wound Care*: S8, S10.
- Increased matrix metalloproteinase—9 (MMP—9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer / E. A. Rayment, Z. Upton, G. K. Shooter [et al.] // *Br. J. Dermatol.* — 2008. — Vol. 158, N 5. — P. 951 — 961.