

УДК 616-089:617.5

ПЕТРЕНКО О.М., БЕЗРОДНИЙ Б.Г., ТИХОМИРОВ А.О.<sup>1</sup>

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

<sup>1</sup>Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, м. Київ, Україна

## ВАКУУМ-ТЕРАПІЯ ДІАБЕТИЧНИХ РАН М'ЯКИХ ТКАНИН: ВПЛИВ НА АКТИВНІСТЬ МАТРИКСНИХ МЕТАЛОПРОТЕЇНАЗ

**Резюме.** Метою роботи було вивчити вплив вакуум-терапії на основні стадії загоєння гнійних ран м'яких тканин у пацієнтів із цукровим діабетом, ступінь мікробної контамінації ран та активність матричних металопротеїназ (ММП) тканин ранової поверхні. Проаналізовано результати лікування та обстеження 48 пацієнтів із хронічними діабетичними ранами м'яких тканин. У 26 хворих (основна група) у лікувальному комплексі застосовували вакуум-терапію ран. Під час лікувального періоду проводили визначення мікробіологічних та цитологічних показників. Активність ММП у тканинах ранової поверхні пацієнтів контрольної та основної груп визначали методом желатинової зимографії на різних етапах загоєння. Установлено, що в пацієнтів основної групи очищення ран від гнійного субстрату та мікроорганізмів відбувалося на  $5,2 \pm 1,5$  доби раніше порівняно з пацієнтами контрольної групи. Разом із тим у тканинах ранової поверхні пацієнтів основної групи відбувається статистично вірогідне ( $p < 0,05$ ) зниження активності ММП, величина якої на 5-ту та 10-ту добу лікування становила відповідно 68 і 45 % від початкового рівня. У ранах пацієнтів із діабетом, які проходили курс традиційного медикаментозного лікування, колагеназна активність залишалася стабільно високою протягом усього періоду спостереження. Отже, разом з антимікробними та протизапальними ефектами нормалізація протеолітичних процесів у рановому ложі може бути одним із ключових механізмів високої лікувальної ефективності VAC-терапії.

**Ключові слова:** цукровий діабет, діабетичні рани м'яких тканин, вакуум-терапія, цитограми, матриксні металопротеїнази.

### Вступ

Загоєння ран у хворих на цукровий діабет (ЦД) характеризується тривалим перебігом, толерантністю до лікування та наявністю ускладнень, що часто призводять до необхідності ампутації кінцівок [1]. Головними причинами часто незадовільної ефективності лікування є насамперед порушення мікроциркуляції в тканинах, мікробна контамінація, дисбаланс запально-репаративних процесів у рані, надмірна продукція протеїназ та знижена активність факторів росту [3, 8]. Великі сподівання в лікуванні цієї категорії пацієнтів покладають на комплексні заходи із застосуванням інноваційних технологій. Останнім часом пріоритетною в терапії діабетичних ран стала VAC-терапія (vacuum-assisted closure), що базується на створенні локального негативного тиску (topical negative pressure) [13]. Численні клінічні спостереження свідчать, що вакуум-терапія забезпечує позитивну динаміку загоєння ран, є порівняно дешевим і нетрудомістким методом лікування. Найбільш ефективним локальне застосування вакуумних пов'язок виявилось саме у випадках лікування ексудативних, зокрема й хронічних діабетичних, ран м'яких тканин. До того ж вакуум-терапія зменшує

рівень ранової ексудації, підтримуючи помірно вологе ранове середовище, необхідне для нормального перебігу репаративно-регенераторних процесів, сприяє видаленню значної кількості патогенної мікрофлори, покращує ангіогенні процеси, посилює клітинну проліферацію та синтез у рановому ложі основних речовин сполучної тканини [2, 10]. Однак механізми, завдяки яким VAC-терапія сприяє покращенню репаративних процесів у проблемних ранах, залишаються малодослідженими.

Ключову роль у процесах загоєння відіграють колагенолітичні ензими групи матричних металопротеїназ (ММП). За умов нормального загоєння ММП розщеплюють протеїнові компоненти міжклітинного матриксу, забезпечуючи міграцію кератиноцитів, реепітелізацію, регулюють запальні процеси, рановий неангіогенез та утворення фіброзного рубця [6, 9].

Адреса для листування з авторами:

Петренко Олег Миколайович  
E-mail: olegnpetrenko@ukr.net

© Петренко О.М., Безродний Б.Г., Тихомиров А.О., 2016

© «Міжнародний ендокринологічний журнал», 2016

© Заславський О.Ю., 2016

Надмірна активація ММП у діабетичних ранах вважається однією з найголовніших причин їх хронізації [11]. Клінічні спостереження, а також експериментальні дослідження на трансгенних тваринах із надкспресією ММП показали, що аномальне підвищення активності ММП-1, -2, -8 та -9 на тлі зниженого синтезу їх ендогенних інгібіторів призводить до порушення епітелізації ран, загострення запальних реакцій, пролонгації загоєння [14]. Розкриття молекулярних механізмів репаративних процесів та їх порушення лежить в основі розробки як специфічних, так і неспецифічних підходів, спрямованих на інактивацію надлишку ММП у хронічних ранах. З огляду на це потребує перевірки питання щодо адекватності застосування терапії негативним тиском для нормалізації колагенолітичної активності в рановому ложі.

**Метою роботи** було вивчити ефекти вакуум-терапії гнійних ран м'яких тканин у пацієнтів із цукровим діабетом на основні стадії загоєння, мікробне обсіменіння ран та активність ММП тканин ранової поверхні.

## Матеріали та методи

У дослідженні брали участь 48 пацієнтів із гнійними ранами м'яких тканин на тлі ЦД. Пацієнти надали письмову згоду на участь у проведенні наукового дослідження. Усіх пацієнтів було прооперовано (розкриття флегмон, некректомії, висічення трофічних виразок). У післяопераційному періоді рани не проявляли тенденції до загоєння. Тривалість загоєння ран становила від 13 до 60 діб. Площа ран у середньому була  $32,4 \pm 2,5$  см<sup>2</sup>. Середній вік пацієнтів —  $62,4 \pm 3,8$  року. Жінок було 30, чоловіків — 18. Хворих розділили на дві групи: основну (26 пацієнтів) — отримували в комплексному лікуванні вакуум-терапію та контрольну (22 хворі), пацієнтів якої було проліковано за традиційною методикою, що включала в себе застосування мазевих пов'язок у місцевому лікуванні ран. За віком, діагнозом та супутньою патологією групи були репрезентативні. Пацієнти обох груп отримували антибіотикотерапію, судинну терапію, вітамінотерапію та перев'язки.

У лікуванні пацієнтів основної групи застосовували VAC-систему виробництва компанії «КСІ» (США), у якої вакуумний апарат обладнаний зовнішнім контрольним пристроєм, що підтримує різні значення негативного тиску та здатний забезпечити режим постійної та перемінної дії на рану. Вакуум-терапія проводилась у постійному режимі протягом 5–7 діб. Заміну пов'язок проводили кожні 2–3 доби. Використовували постійну вакуум-терапію з рівнем негативного тиску від –50 до –200 мм рт.ст. (оптимальним був негативний тиск –80–125 мм рт.ст.).

Для оцінки ефективності вакуум-терапії використовували прямі показники динаміки ранового процесу, що включали планіметричні обстеження та якісні показники, а також аналіз мікробіологічного складу ран. У всіх пацієнтів визначали активність ММП в епітеліальних тканинах ранової поверхні до лікування та на 5-ту і 10-ту добу після застосування вакуумних

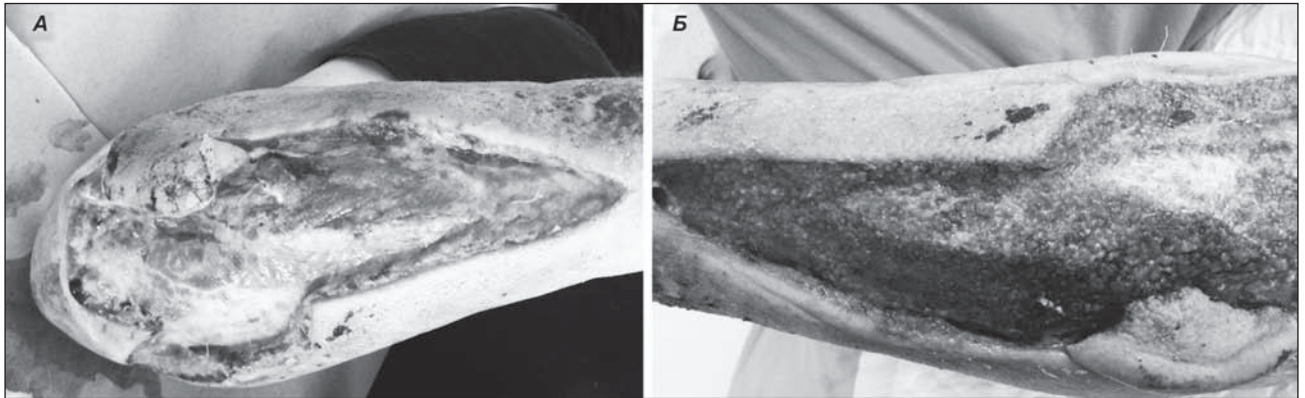
пов'язок. Активність ММП визначали методом ензим-форезу (желатинової зимографії), який проводили в сополімері поліакриламідного гелю та желатину [11]. Після проведення денситометричного аналізу зимограм колагенолітичну активність виражали у відсотках від величини, визначеної до початку проведення VAC-терапії. Статистичну обробку отриманих результатів проводили з використанням U-критерію Манна — Уїтні, різницю між груповими середніми вважали вірогідною при  $p < 0,05$ .

Дослідження проводили в хірургічному відділенні гнійної хірургії Київської міської лікарні № 4 (клінічна база кафедри хірургії № 2 Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця).

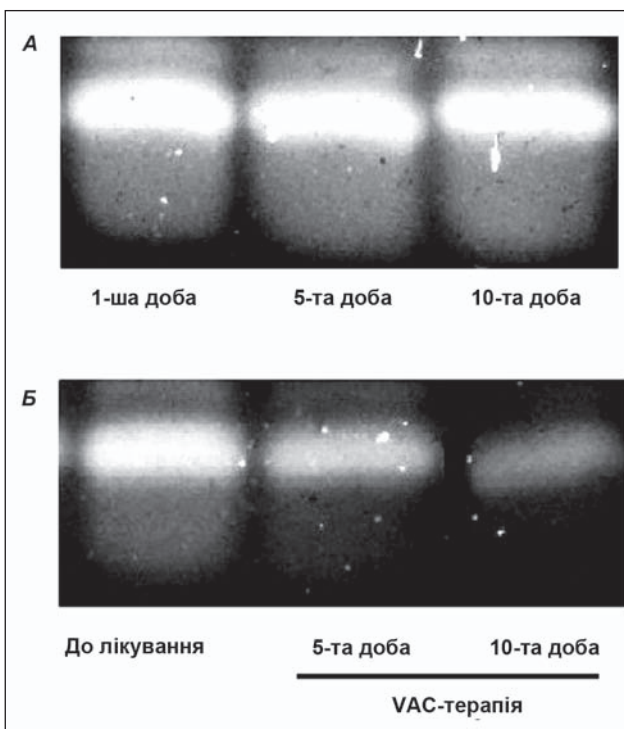
## Результати дослідження

Для клінічної картини діабетичних ран м'яких тканин характерний поліморфізм ознак. Аналіз мікробного пейзажу виразкових ран показав, що найчастішими представниками патогенної мікрофлори ранової поверхні були аеробні грамнегативні мікроорганізми. На 1-шу добу обстеження вміст мікроорганізмів у всіх діабетичних ранах пацієнтів обох груп перевищував 50 колонієутворюючих одиниць. При дослідженні ран у пацієнтів основної групи встановлено, що на 3-тю добу після застосування VAC-терапії кількість мікроорганізмів зменшується до 25–50 колонієутворюючих одиниць. У пацієнтів основної групи після проведення сеансу вакуум-терапії на 5-ту добу лікування кількість патогенів у рані була мізерною, а в мазках-відбитках домінував регенераторно-запальний тип цитогам. На 10-ту добу мікрофлора в рані була практично відсутня, до того ж відзначається ініціація крайової епітелізації рани, дно рани було повністю вистелено грануляційною тканиною (рис. 1). Стан хворих покращувався, больовий синдром зменшувався. На перев'язках грануляції були ясні, червоні, без ознак фібрину. Краї рани без набряків та синюшності, спостерігалася крайова епітелізація. У пацієнтів контрольної групи на 10-ту добу в рані відзначався помірний ріст бактерій, а цитограми характеризувалися переважно запальним типом.

Результати желатинової зимографії зразків епітеліальних тканин ран пацієнтів обох груп вказують на наявність поліпептидних зон, що відповідають активним ММП, найбільш вираженою з яких виявилася ММП-9 (молекулярна маса 92 кДа) (рис. 2). За допомогою денситометричного аналізу встановлено, що в пацієнтів контрольної групи спостерігається високий рівень експресії ММП протягом усього періоду обстеження, що є характерною ознакою діабетичних ран (рис. 3). У пацієнтів дослідної групи до проведення VAC-терапії колагенолітична активність була на рівні такої для контрольної групи. Однак починаючи з 5-ї доби після вакуумування ран спостерігається статистично вірогідне зниження активності ММП-9 (на 68 %,  $p < 0,05$ ) щодо вихідного рівня. На 10-ту добу загоєння, стимульованого застосуванням негативного тиску, активність ММП становила не



**Рисунок 1.** Пацієнтка К. із гнійно-некротичною ранною правого передпліччя на фоні цукрового діабету до застосування вакуум-терапії (А) та на 4-ту добу після проведення курсу вакуум-терапії (Б)

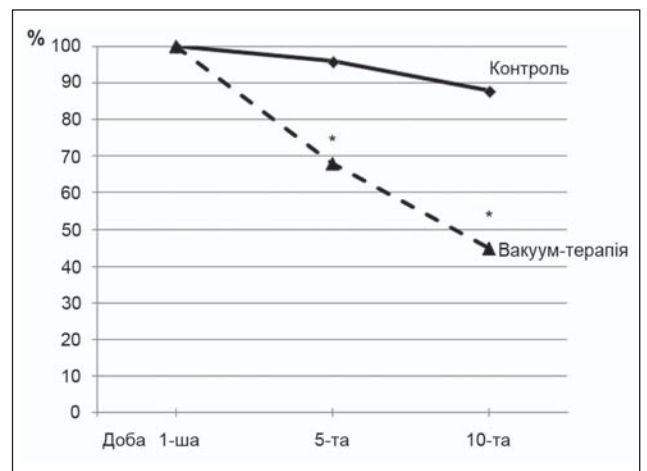


**Рисунок 2.** Типова зимограма протеїнових проб, отриманих з епітеліальних тканин поверхні діабетичних виразок нижніх кінцівок пацієнтів контрольної групи (А) та пацієнтів, які проходили курс вакуум-терапії (Б)

більше 45 % ( $p < 0,05$ ) від початкової величини. Цей факт можна пояснити змінами в клітинному наповненні рани при загоєнні.

### Обговорення результатів дослідження

Відомо, що основним джерелом ММП-9 у рановій поверхні є нейтрофіли, кератиноцити та фібробласти [12]. Дані літературних джерел свідчать про перехід від запального до проліферативного фенотипу саме в цей термін загоєння [3, 5]. Отже, динамічні зміни активності ММП-9 відбуваються паралельно із зменшенням кількості прозапальних клітин у рановому ложі на 10-ту добу після VAC-терапії, а залишкова колаге-



**Рисунок 3.** Результати денситометричного аналізу ензиматичної активності ММП

**Примітка:** \* –  $p < 0,05$  порівняно з величиною в 1-шу добу, U-критерій Манна – Уїтні

нолітична активність обумовлена функціонуванням кератиноцитів, що експресують ММП для забезпечення своєї міграції [12].

На відміну від групи пацієнтів, які проходили курс вакуум-дренування, у хворих контрольної групи протягом десятиденного періоду обстеження висока активність колагенази залишалася на сталому рівні. Цю обставину можна пояснити рекрутингом до місця ураження значної кількості ММП-продукуючих клітин, які відповідають за гостру фазу запального процесу. Дане спостереження підтверджується результатами цитометрії: цитограми відповідали некротичному та дегенеративно-запальному типам. Крім того, поверхня ран характеризувалася високим ступенем мікробного обсіменіння. Як відомо, мікробні протеїнази здатні розщеплювати тканинні субстрати, а також активувати ендогенні ММП [4, 7].

Лише на 10-ту добу в пацієнтів контрольної групи, які проходили традиційний курс медикаментозного лікування, спостерігається поява грануляційних тканин та намічається тенденція до зниження ензиматичної активності досліджуваних протеїназ (на 12 %), про-



те ці зміни не сягають рівня статистичної вірогідності ( $p > 0,05$ ).

Нормальний процес загоєння проходить за складним, чітко скоординованим сценарієм, в якому серед усіх ензимів провідну роль відіграють протеїнази родини ММП, що секретиються до ранового ложа власними клітинами організму. Порушення активаторно-інгібіторного балансу протеолітичних систем може призводити до ускладнень загоєння та хронізації рани за цукровим діабетом [6, 14].

Вакуум-терапія сприяє евакуації надлишкової колагенолітичної активності з гнійних виразок м'яких тканин пацієнтів із ЦД і стимулює репаративні процеси. Результати, отримані в наведеній роботі, свідчать, що позитивні ефекти лікування гнійних ран у пацієнтів із ЦД із застосуванням негативного тиску реалізуються через комплексні зміни на молекулярно-клітинному рівні, чільне місце серед яких займає неспецифічне зменшення надмірної активності колагенолітичних ензимів.

## Висновки

1. Лікування гнійно-некротичних ран м'яких тканин пацієнтів із цукровим діабетом із застосуванням дозованого вакууму чинить антибактеріальний ефект, прискорює запальний регрес та стимулює репаративні процеси.

2. Нормалізація протеолітичних процесів за рахунок видалення надлишкової колагенолітичної активності за допомогою VAC-терапії корелює з позитивною динамікою загоєння.

## Список літератури

1. Bilton A.J., Kirshner R.S., Vileiky L. *Neuropathic diabetic foot ulcers* // *N. Eng. J. Med.* — 2004. — Vol. 351. — P. 48-55.
2. Dowsett C., Davis L., Henderson V. *The economic benefits of negative pressure wound therapy in community-based wound care in the NHS* // *Int. Wound. J.* — 2012. — Vol. 9. — P. 544-552.
3. Kane M.G., Krasner D. (eds) *Chronic wound care: a clinical source book for healthcare professionals.* — 2nd ed. — Health Management Publications Inc., 1997. — 427 p.

4. Kernacki K.A., Fridman R., Hazlett L.D., Lande M.A., Berk R.S. *Kernacki K.A. In vivo characterization of host and bacterial protease expression during Pseudomonas aeruginosa corneal infections in naive and immunized mice* // *Curr. Eye Res.* — 1997. — V. 16, № 4. — P. 289-297.

5. Leaper D.J., Harding K.G. *Wounds: Biology and Management.* — Oxford University Press. — 1998. — 130 p.

6. Lobman R., Ambrosch A., Schultz G., Waldmann K., Schiweck S., Lehnert H. *Expression of gelatinase (MMP-2) in diabetic and non-diabetic wounds* // *Diabetologia.* — 2001. — Vol. 44. — P. 1011-1016.

7. McCarty S.M., Cochran C.A., Clegg P.D., Percival S.L. *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* // *Wound Repair Regen.* — 2012. — Vol. 20. — P. 125-136.

8. McCarty S.M., Percival S.L. *Proteases and delayed wound healing* // *Adv. Wound Care.* — 2013. — Vol. 2. — P. 438-447.

9. Mirastschijski U., Impola U., Jähkola T., Karlsmark T., Agren M.S., Saarialho-Kere U. *Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds* // *Human Pathol.* — 2002. — Vol. 33. — P. 355-364.

10. Nain P.S., Uppal S.K., Garg R., Bajaj K., Garg S. *Role of negative pressure wound therapy in healing of diabetic foot ulcers* // *J. Surg. Tech. Case Rep.* — 2011. — Vol. 3. — P. 17-22.

11. Neely A.N., Clendenen C.E., Gardner J., Greenhalgh D.G. *Gelatinase activities in wounds of healing-impaired mice versus wounds of non-healing-impaired mice* // *J. Burn Care Rehabil.* — 2000. — Vol. 21. — P. 395-402.

12. Sawicki G., Marcoux Y., Sarkhosh K., Tredget E.E., Ghahary A. *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.

13. Schintler M.V. *Negative pressure therapy: theory and practice* // *Diabetes Metab. Res. Rev.* — 2012. — Vol. 28. — P. 72-77.

14. Liu Y., Min D., Bolton T., Nubé V., Twigg S.M., Yue D.K., McLennan S.V. *Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers* // *Diabetes Care.* — 2009. — Vol. 32. — P. 117-119.

Отримано 29.01.16 ■

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

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.В. Палладина НАН Украины, г. Киев, Украина

## ВАКУУМ-ТЕРАПИЯ ДИАБЕТИЧЕСКИХ РАН МЯГКИХ ТКАНЕЙ: ВЛИЯНИЕ НА АКТИВНОСТЬ МАТРИЧНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ

**Резюме.** Целью работы было изучить влияние вакуум-терапии на основные стадии заживления гнойных ран мягких тканей у пациентов с сахарным диабетом, степень микробной контаминации ран и активность матричных металлопротеиназ (ММП) тканей раневой поверхности. Проанализировано результаты лечения и обследования 48 пациентов с хроническими диабетическими ранами мягких тканей. У 26 больных (основная группа) в комплексе лечебных мероприятий использовали вакуум-терапию ран. В период лечения проводили исследование микробиологических и цитологических показателей. Активность ММП в тканях

раневой поверхности пациентов контрольной и основной групп определяли методом желатиновой зимографии на разных этапах заживления. Установлено, что у пациентов основной группы очищение ран от гнойного субстрата и микроорганизмов происходило на  $5,2 \pm 1,5$  суток раньше, чем у пациентов контрольной группы. Вместе с тем в тканях раневой поверхности пациентов основной группы отмечается статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) снижение активности ММП, величина которой на 5-е и 10-е сутки лечения составила соответственно 68 и 45 % от исходного уровня. В ранах пациентов с диабетом, которые проходили курс традицион-

ного медикаментозного лечения, коллагеназная активность оставалась стабильно высокой в течение всего периода наблюдения. Таким образом, вместе с антимикробными и противовоспалительными эффектами нормализация протеолитических процессов в раневом ложе может быть одним

из ключевых механизмов высокой лечебной эффективности VAC-терапии.

**Ключевые слова:** сахарный диабет, диабетические раны мягких тканей, вакуум-терапия, цитограммы, матриксные металлопротеиназы.

*Petrenko O.M., Bezrodnyi B.H., Tykhomyrov A.O.<sup>1</sup>*

*National Medical University named after O.O. Bohomolets, Kyiv, Ukraine*

*<sup>1</sup>Institute of Biochemistry named after O.V. Palladin, Kyiv, Ukraine*

#### **VACUUM THERAPY OF DIABETIC SOFT TISSUE WOUNDS: THE IMPACT ON THE MATRIX METALLOPROTEINASE ACTIVITY**

**Summary.** The objective was to investigate the effect of vacuum therapy on the main stages of the healing of purulent wounds of soft tissues in patients with diabetes mellitus, the degree of microbial contamination of wounds and the activity of matrix metalloproteinases (MMP) in the tissues of wound surface. The results of treatment and examination of 48 patients with chronic diabetic wounds of soft tissues were analyzed. In 26 patients (study group), vacuum therapy of wounds was used in the treatment complex. During healing process, microbiological and cytological parameters were determined. MMP activity in the tissues of wound surface of patients from the control and study groups was monitored by the method of gelatine zymography at the various stages of healing. It was found that in patients of the main group, wound purification from necrotic material and microorganisms occurred  $5.2 \pm 1.5$

days earlier than in patients of the control group. Moreover, in the tissues of wound surface of patients from study group, a statistically significant ( $p < 0.05$ ) decrease in MMP activity was observed, its value on the 5th and 10th days of treatment was respectively 68 and 45 % of the initial level. In the wounds of patients with diabetes mellitus who underwent traditional medical treatment, collagenase activity remained consistently high throughout the period of observation. So, together with antimicrobial and anti-inflammatory effects, the normalization of proteolytic processes in the wound bed can be one of the key mechanisms of high therapeutic effectiveness of VAC-therapy.

**Key words:** diabetes mellitus, soft tissue diabetic wounds, vacuum therapy, cytograms, matrix metalloproteinases.