

Азизов Д. Т., Мирзаев К. К., Алейник В. А., Бабич С. М.

Андижанский государственный медицинский институт

**ОСОБЕННОСТИ ИЗМЕНЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ПРОТЕАЗ И
ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕАЗ В ХРОНИЧЕСКИХ ГНОЙНЫХ
РАНАХ**

Резюме: В работе изучались особенности изменения содержания протеаз и ингибиторов протеаз в хронических гнойных ранах. Сделано заключение, что в послеоперационных ранах, показатели общей протеолитической активности и антипротеолитической активности существенно не отличаются, имеется равновесие между протеазами и ингибиторами протеаз, которое предположительно может регулироваться местными механизмами.

В хронических гнойных ранах общая протеолитическая активность значительно выше этого же показателя послеоперационных ран. При этом антипротеолитическая активность значительно ниже общей протеолитической активности, а также ниже антипротеолитической активности послеоперационных ран, что создает выраженное нарушение равновесия между протеазами и ингибиторами протеаз и способствует хронизации воспалительного процесса в гнойных ранах с подключением, как местных, так и системных механизмов регуляции.

Ключевые слова: протеазы, ингибиторы протеаз, послеоперационные раны, хронические гнойные раны, протеолитическая активность, антипротеолитическая активность.

Azizov D.T., Mirzaev K.K., Babich S.M., Aleynik V.A.

Andijan State Medical Institute

**FEATURES OF CHANGE IN THE CONTENT OF PROTEASES
AND PROTEASES INHIBITORS IN CHRONIC PURULENT
WOUNDS**

Resume: The work studied the features of changes in the content of proteases and protease inhibitors in chronic purulent wounds. It was concluded that in postoperative wounds, the indicators of general proteolytic activity and antiproteolytic activity do not differ significantly, there is an equilibrium between proteases and protease inhibitors, which can presumably be regulated by local mechanisms. In chronic purulent wounds, the total proteolytic activity is significantly higher than that of postoperative wounds. At the same time, the antiproteolytic activity is significantly lower than the general proteolytic activity, as well as lower than the antiproteolytic activity of postoperative wounds, which creates a pronounced imbalance between proteases and protease inhibitors and the chronicization of the inflammatory process in purulent wounds with the involvement of both local and systemic mechanisms of regulation.

Key words: proteases, protease inhibitors, postoperative wounds, chronic purulent wounds, proteolytic activity, antiproteolytic activity.

Актуальность. Помимо клинических признаков инфекции (например, воспаления, гнойности и боли), для определения раневой инфекции исторически использовалось количество микроорганизмов. Однако все чаще признается, что не только высокий уровень бионагрузки вреден для заживления ран, но и вирулентность вторгающегося микроорганизма и иммунный статус хозяина могут повлиять на клинические исходы. Бактерии, такие как синегнойная палочка, золотистый стафилококк и эпидермальный стафилококк, разработали ряд факторов вирулентности, которые помогают им преодолевать защиту хозяина и размножаться в подлежащих мягких тканях. Более конкретно, бактериальные протеазы являются одним из таких факторов вирулентности, которые участвуют в стимулировании инвазии и разрушения ткани хозяина. Из-за сложности микроорганизмов

протеазы могут негативно влиять на раневую среду, что приводит к замедленному заживлению ран. Полученные данные свидетельствуют о том, что протеазы могут играть важную роль в раневых инфекциях, способствовать развитию воспалительной реакции и препятствовать заживлению ран [11].

Бактериальные протеазы, способствуют индукции воспалительной реакции у хозяина. Было обнаружено, что протеазы, продуцируемые бактериями, активируют кининовую систему и разлагают кининогены, что впоследствии вызывает воспалительную реакцию в виде отека, покраснения и боли [9].

Подобно другим иммунологическим факторам, бактериальные протеазы также могут препятствовать фагоцитозу [7], способствуют снижению активности лейкоцитов [6], ингибированию функции нейтрофилов и препятствию хемотаксиса [8].

Бактериальные протеазы могут разрушать ряд биологически важных белков-хозяев, таких как компоненты комплемента C3 и C1q [4], также предотвращать образование C5 путем разрушения C3 [10]. За счет чего нарушается опсонизация и фагоцитоз нейтрофилов, затрудняется или даже предотвращается [15].

Функция бактериальных протеаз в преодолении иммунной системы хозяина заключается в деградации иммуноглобулина хозяина [16]. Это может быть особенно вредным для хозяина, учитывая роль иммуноглобулинов в распознавании и способствовании нейтрализации вторгающихся микроорганизмов. Различные исследователи сообщили о влиянии протеаз на деградацию иммуноглобулинов, в том числе иммуноглобулина А (IgA) и иммуноглобулина G (IgG) [4].

Протеазы и их ингибиторы способствуют балансу между деградацией и отложением внеклеточного матрикса (ВКМ), создавая равновесие, необходимое для своевременного и скоординированного

заживления кожных ран. Однако, когда этот баланс нарушается, раны переходят в хроническое состояние, характеризующееся обильным уровнем протеаз и пониженным уровнем ингибиторов протеаз [13].

Соотношения протеаз и их ингибиторов также использовались в качестве прогностических маркеров прогрессирования раны к заживлению. [14].

Многими исследователями подчеркивается ключевая роль протеаз в заживлении ран. Поэтому необходим контроль экспрессии протеаз в раневой среде и способов, которыми чрезмерная экспрессия и активация протеаз может привести к задержке процесса заживления кожных ран. Будущие исследования должны быть нацелены на изучение способов, с помощью которых протеазы могут быть нацелены в качестве альтернативного терапевтического подхода к лечению ран, а также для оценки преимуществ и недостатков использования раневых жидкостей для оценки прогрессирования раны с точки зрения протеолитической активности [13].

Цель исследования: изучить особенности изменения содержания протеаз и ингибиторов протеаз в хронических гнойных ранах.

Материал и методы. В работе были обследованы в первой группе 12 больных с послеоперационными ранами (контроль) и во второй группе 15 больных с гнойными ранами (опыт). У всех больных в диагнозе отсутствовали сердечнососудистые заболевания, диабет и метаболические изменения. Материал для исследования получали путем сбора смывов стерильным физиологическим раствором с поверхности послеоперационных и гнойных ран.

Общую протеолитическую активность в составе смывов определяли казеинолитическим методом по учету продуктов гидролиза казеина в единицах активности (Ед) по тирозину. Ингибиторную (анти-протеолитическую) активность полученных смывов определяли

казеинопептическим тестом, по способности убывания активности 0,01% трипсина и 0,01% папаина, при инкубации их с исследуемыми образцами смывов по сравнению с образцами смывов с трипсином или папаином без инкубации. Ингибиторную активность выражали в ингибиторных единицах (ИЕд).

С целью степени выраженности протеолиза в ранах рассчитывался индекс протеолиза - соотношения протеолитической активности к антипротеолитической активности (ОПА/АПА).

Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием стандартных программ Microsoft Excel 2007 с вычислением средних величин (M), их ошибок (m), а также коэффициента достоверности разности средних величин Стьюдента-Фишера (t).

Результаты и их обсуждение. Полученные данные показали (Рис.), что у пациентов с послеоперационными ранами средний показатель ОПА в составе смывов составлял $31,7 \pm 2,8$ Ед/мл. В тоже время у больных с гнойными ранами этот показатель был достоверно выше, по сравнению с аналогичными результатами послеоперационных ран, и составлял $52,4 \pm 4,8$ Ед/мл ($P < 0,01$). При этом показатель антипротеолитической активности

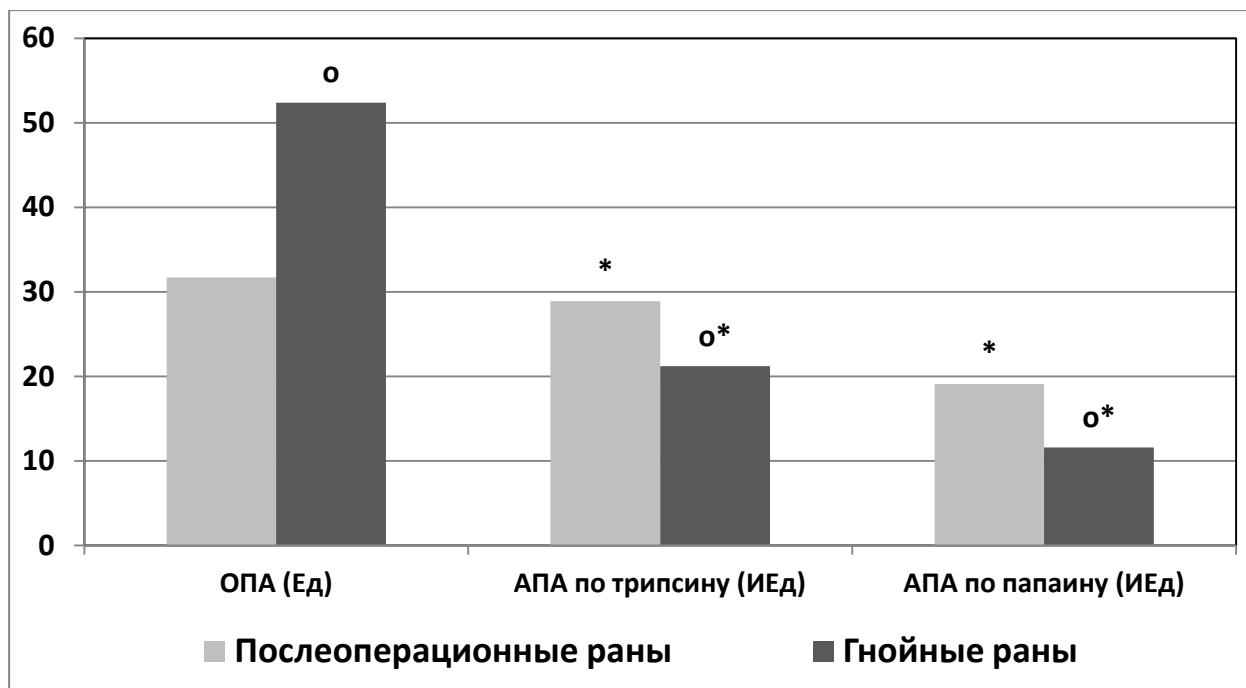


Рисунок. Изменение показателей общей протеолитической активности (ОПА) и антипротеолитической активности (АПА) смывов послеоперационных и гнойных ран.

* - достоверно отличающиеся величины относительно показателей ОПА гнойных ран.

o - достоверно отличающиеся величины относительно соответствующих показателей ОПА послеоперационных ран.

по трипсину в составе смывов послеоперационных ран составлял $28,9 \pm 2,5$ ИЕд/мл, что было не существенно ниже ОПА в смывах послеоперационных ран, а индекс протеолиза ОПА/АПА по трипсину был также не существенно выше и равен $1,1 \pm 0,1$. У больных с гнойными ранами показатель антипротеолитической активности по трипсину был достоверно ниже по сравнению с аналогичными результатами больных с послеоперационными ранами и составлял $21,2 \pm 1,9$ ИЕд/мл ($P < 0,05$), а также значительно ниже ОПА смывов гнойных ран. С учетом этих данных индекс протеолиза ОПА/АПА по трипсину находился на уровне $2,5 \pm 0,22$, что было значительно выше такого же показателя в составе смывов послеоперационных ран. Результат антипротеолитической активности по папаину в составе смывов послеоперационных ран составлял $19,1 \pm 1,5$

ИЕд/мл, этот показатель был значительно меньше антипротеолитической активности по трипсину, в связи с более низким содержанием ингибиторов протеаз связывающихся с папаином. По этой же причине увеличивался индекс протеолиза ОПА/АПА по папаину и был равен $2,7 \pm 0,24$. В тоже время у больных с гнойными ранами антипротеолитическая активность по папаину была также значительно ниже антипротеолитической активности по трипсину и составляла $11,6 \pm 0,9$ ИЕд/мл ($P < 0,05$), также это проявляется с более низким содержанием ингибиторов протеаз связывающихся с папаином. При этом индекс протеолиза ОПА/АПА при исследовании гнойных ран по папаину был равен 4,5, что было выше индекса протеолиза послеоперационных ран.

Предполагается, что трипсиноподобные сериновые протеазы в раневой среде связываются преимущественно с двумя ингибиторами $\alpha 1$ -ингибитором протеиназ ($\alpha 1$ ИП) и $\alpha 2$ -макроглобулином ($\alpha 2$ М) — принципиально различным образом. Первый полностью инактивирует каталитическую функцию протеаз, а второй лишь ограничивает их способность расщеплять большинство высокомолекулярных субстратов. Кроме того, константа скорости реакции таких протеаз с $\alpha 2$ М в 6 раз выше таковой с $\alpha 1$ ИП, при этом образуется активный комплекс, способный гидролизовать специфические субстраты, что позволяет большей части поступающих в раневую среду энзимов связываться с $\alpha 2$ М. Следует подчеркнуть, что цистеиновые протеиназы (папаин), в отличие от сериновых протеаз, связываются в основном с $\alpha 2$ М, а $\alpha 1$ ИП не играет существенной роли в блокировании активности протеиназ. Эти данные позволили сделать вывод о том, что сериновые и цистеиновые протеиназы, могут осуществлять свою функцию в связанном с $\alpha 2$ М состоянии [1].

Ингибирующая способность трипсина может проявляться существенно за счет низкомолекулярных ингибиторов присутствующих в составе раневого смыва и альфа-1-антитрипсина, а ингибирующая

способность папаина за счет высокомолекулярных ингибиторов альфа-1-антитрипсина и альфа 2-макроглобулина. Если учесть, что низкомолекулярным ингибитором, присутствующим в составе раневого смыва может являться секреторный лейкоцитарный ингибитор протеазы, который локально обеспечивает защиту и обладает выраженной противовоспалительной, антибактериальной и противогрибковой активностью. Тогда снижение ингибирующей активности по трипсину в смыве с выраженными проявлениями воспаления можно объяснить, как выраженную провоспалительную и микробную реакцию, проявляющуюся так же увеличением ОПА за счет снижения этого ингибитора. Увеличение ОПА в составе раневых смывов возможно так же связано с увеличением функциональной активности клеток продуцентов протеаз за счет хронического воспалительного процесса [2, 3].

Что касается ингибирующей способности папаина за счет высокомолекулярных ингибиторов в составе раневых смывов, то основными высокомолекулярными ингибиторами папаина могут являться альфа-1-антитрипсин и альфа 2-макроглобулин, которые вырабатываются печенью и осуществляют тормозное действие на протеазы во всех органах и тканях организма [2, 3]. Поэтому снижение ингибирующей способности папаина в составе раневых смывов можно расценивать как проявление системного характера на воспаление или, возможно, на степень хронизации воспалительного процесса.

Исходя из этого, полученные нами данные антипротеолитической активности по папаину и трипсину можно интерпретировать, следующим образом. В послеоперационных ранах, без выраженных проявлений воспаления, имеется равновесие между протеазами и ингибиторами протеаз, которое регулируется в большей степени местными механизмами. В тоже время в хронических гнойных ранах с выраженным воспалительным процессом, нарушено равновесие между протеазами и

ингибиторами протеаз, за счет нарушения местных и системных механизмов.

Выводы. В послеоперационных ранах, показатели общей протеолитической активности и антипротеолитической активности существенно не отличаются, имеется равновесие между протеазами и ингибиторами протеаз, которое предположительно может регулироваться местными механизмами. В хронических гнойных ранах общая протеолитическая активность значительно выше этого же показателя послеоперационных ран. При этом антипротеолитическая активность значительно ниже общей протеолитической активности, а также ниже антипротеолитической активности послеоперационных ран, что создает выраженное нарушение равновесия между протеазами и ингибиторами протеаз и способствует хронизации воспалительного процесса в гнойных ранах с подключением, как местных, так и системных механизмов регуляции.

Литература:

1. Веремеенко К. Н., Кизим А. И., Досенко В. Е. а₂-макроглобулин: структура, физиологическая роль и клиническое значение// Лаб. диагностика 2000, № 2, С. 3–9.
2. Колесникова Е. В. Альфа-1-антитрипсиновая недостаточность: Современный взгляд на проблему //Сучасна гастроентерологія. – 2008. – Т. 2. – №. 40. – С. 93-98.
3. Doumas S., Kolokotronis A., Stefanopoulos P. Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor //Infection and immunity. – 2005. – Т. 73. – №. 3. – С. 1271-1274.
4. Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC, O'Callaghan RJ. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Biological Chemistry. 1998 Jul 3;273(27):16792-7.

5. Engel LS, Hill JM, Moreau JM, Green LC, Hobden JA, O'Callaghan RJ. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1998 Mar 1;39(3):662-5.
6. Hoge R, Pelzer A, Rosenau F, Wilhelm S. Weapons of a pathogen: proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology*. 2010;2:383-95.
7. Kharazmi A, Eriksen HO, Döring G, Goldstein W, Høiby N. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* proteases on human leukocyte phagocytosis and bactericidal activity. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series C: Immunology*. 1986 Nov;94(1- 6):175-9.
8. Kharazmi A, Høiby N, Döring G, Valerius NH. *Pseudomonas aeruginosa* exoproteases inhibit human neutrophil chemiluminescence. *Infection and immunity*. 1984 Jun 1;44(3):587-91.
9. Koziel J, Potempa J. Protease-armed bacteria in the skin. *Cell and tissue research*. 2013 Feb;351(2):325-37.
10. Kuo CF, Lin YS, Chuang WJ, Wu JJ, Tsao N. Degradation of complement 3 by streptococcal pyrogenic exotoxin B inhibits complement activation and neutrophil opsonophagocytosis. *Infection and immunity*. 2008 Mar 1;76(3):1163-9.
11. Lindsay S., Oates A., Bourdillon K. The detrimental impact of extracellular bacterial proteases on wound healing // *International wound journal*. – 2017. – Т. 14. – №. 6. – С. 1237-1247.
12. McCarty S. M., Percival S. L. Proteases and delayed wound healing // *Advances in wound care*. – 2013. – Т. 2. – №. 8. – С. 438-447.
13. McCarty S. M., Percival S. L. Proteases and delayed wound healing // *Advances in wound care*. – 2013. – Т. 2. – №. 8. – С. 438-447.

14. Muller, M., Trocme, C., Lardy, B., Morel, F., Halimi, S., & Benhamou, P. Y. Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP- 1 to TIMP- 1 is a predictor of wound healing //Diabetic Medicine. – 2008. – Т. 25. – №. 4. – С. 419-426.
15. Potempa J, Pike RN. Corruption of innate immunity by bacterial proteases. Journal of innate immunity. 2009;1(2):70-87.
16. Schmidtchen A, Wolff H, Hansson C. Differential proteinase expression by Pseudomonas aeruginosa derived from chronic leg ulcers. Acta Dermatovenereologica-Stockholm-. 2001 Nov 1; 81(6) : 406-9.