

ОСОБЛИВОСТІ ЗАКРИТТЯ РАНОВИХ ДЕФЕКТІВ У ПАЦІЄНТІВ ІЗ ХРОНІЧНИМИ ДІАБЕТИЧНИМИ РАНАМИ

¹ *Петренко О.М.* <https://orcid.org/0000-0002-4024-5438>

¹ *Бадзюх С.В.* <https://orcid.org/0000-0002-3175-1208>

² *Тихомиров А.О.* <https://orcid.org/0000-0003-2063-4636>

¹ *Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна*

² *Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ, Україна*

olegnpetrenko@ukr.net

Актуальність. Хронічні діабетичні рани стопи та виразки є серйозними ускладненнями перебігу цукрового діабету (ЦД), на долю яких припадає 85% від гнійно-некротичних уражень нижніх кінцівок. Патогенетичні механізми «хронізації» ран у вигляді гіперглікемії, нейропатії та наявної інфекції призводять до метаболічних порушень у вигляді гіпоксії тканин та активації протеолітичних ферментів матриксних металопротеїназ (ММП).

Ціль: дослідження ролі автологічного плазміногену на процеси загоєння в діабетичних ранах шляхом модуляції активності ММП.

Матеріали та методи. В дослідженні приймали участь 45 пацієнтів із хронічними діабетичними ранами, які було поділено на 2 групи. Пацієнти групи контролю (n=25) лікувались за стандартними методиками. У 20 пацієнтів основної групи для лікування застосовували аплікації автологічним плазміногеном.

Результати. На 18 добу лікування у досліджуваних пацієнтів констатовано зниження активності ММП-2,-9 у 3,5 рази та повне загоєння ран у 16 пацієнтів. У 4 пацієнтів ранові дефекти було закрито методом аутодермопластики із повним приживленням трансплантатів. У пацієнтів контрольної групи рівень активності ММП залишався стабільно високим протягом усього періоду спостережень.

Висновки. Застосування аплікацій автологічного плазміногену дозволяє модулювати активність ММП та створити сприятливі умови для загоєння хронічних діабетичних ран.

Ключові слова: цукровий діабет, матриксні металопротеїнази, плазміноген.

Актуальність. Хворі, які страждають на цукровий діабет (ЦД) досить чутливі до будь-якої травми внаслідок наявної у них нейропатії та схильності до повільного загоєння або незагоєння ран взагалі. Основним проявом уражень тканин нижніх кінцівок при ЦД є хронічні рани та трофічні виразки 85%. Іншу частину складають – абсцеси, флегмони, остеомієліти, гнійні артрити, які виникають на тлі трофічних виразок або внаслідок травми [3]. Тому, проблема закриття ранових дефектів шляхом пластичних методик набуває особливої актуальності.

Головним патогенетичним механізмом розвитку хронічних діабетичних ран є гіперглікемія, яка чинить токсичну дію на тканини, викликає обмінні порушення, що призводить до нейропатії, ангіопатії та імуносупресії [10]. Дані метаболічні зрушення стимулюють розвиток гіпоксії тканин із наступною активацією про-

теолітичних ферментів. За нормальних умов матриксні металопротеїнази (ММП) необхідні для кожної фази загоєння ран, відіграючи особливу роль у деградації позаклітинного матриксу (ЕСМ), ремоделюванні тканин, міграції клітин і запаленні [14]. Протеази беруть активну участь у процесах відновлення ран, тому оцінка протеолітичної активності використовується як біомаркер стану загоєння ран.

Серед усіх ММП членів, ММП-2 і -9 зазвичай беруть участь у нормальному ремоделюванні тканин під час загоєння ран [9]. Однак, як повідомляється, що драматичне підвищення активності ММП є ключовим фактором погіршення загоєння ран при діабетичних виразках шкіри та інших судинних ускладнень [6]. Тому очікується розробка підходів до модуляції протеолітичної активності для лікування ран, що важко загоюються.

Сучасні дослідження визначили плазміноген (Pg) як одного з ключових учасників процесу загоєння ран. На даний момент виявлено понад 12 різних клітинних рецепторів Pg, які потенційно пов'язані із загоєнням ран [4]. Це означає, що окрім фібринолізу Pg може діяти як сигнальна молекула, яка регулює та координує активність моноцитів/макрофагів, кератиноцитів, тромбоцитів та інших клітин, які беруть участь у загоєнні ран [8].

Ціль: дослідження ролі автологічного плазміногену на процеси загоєння в діабетичних ранах шляхом модуляцію активності MMP.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідженні брали участь 45 пацієнтів із ЦД віком від 45 до 81 року, які перебували на амбулаторному лікуванні Центральній поліклініці МВС України за період 2021 по 2023 роки із нейропатичними діабетичними ранами, які не загоювались більше 6 тижнів. Згідно класифікації PEDIS рани відповідали градації P2E2D2I2S1 [5]. Усі пацієнти дали письмову згоду на участь у дослідженні та дозвіл на публікацію результатів досліджень. Усі процедури та протоколи дослідження, використані в даному дослідженні, були розглянуті та схвалені місцевим етичним комітетом, і автори дотримувалися всіх етичних рекомендацій. Дослідження відповідають принципам, викладеним в останній редакції Гельсінської декларації (2013).

Випадковим чином пацієнтів було розділено на 2 групи. За віком, ускладненнями та супутньою патологією групи були репрезентативні. Контрольна група (25 пацієнтів) отримувала лікування діабетичних ран згідно стандартних протоколів, яке включало місцеве застосування антисептиків та ранових покриттів. Усі пацієнти отримували цукрознижуючі препарати.

У досліджуваній групі (20 пацієнтів) додатково до стандартної обробки рани місцево наносили аутологічний плазміноген на ранову поверхню в дозі 1,0 мг/мл стерильного забуференого фізіологічного розчину кожні 2 дні,

протягом 20 діб (загалом 10 аплікацій). Біоптати із ложа рани у пацієнтів з ЦД (100 ± 3 мг) відбирали перед початком лікування Pg (0 день) та на 18 добу поточного періоду лікування.

Нативну форму Pg (Glu-Pg) одержували зі свіжої цитратної плазми крові донорів (пацієнти з ЦД з дослідної групи) методом афінної хроматографії на *Lys*-сефарозі (GE Healthcare, Amersham, Велика Британія) за присутності інгібітора серинових протеїназ аprotиніну (10 мг/мл) за Lijnen [13] з мінорними модифікаціями. Чистоту одержаних препаратів Pg оцінювали за допомогою денатуруючого гель-електрофорезу в 10 % поліакриламідному гелі (SDS-PAGE). Результати гель-електрофорезу свідчать, що препарати Glu-Pg, ізольованого з плазми крові донорів, були електрофоретично гомогенними (ступінь чистоти 99 %). Перед використанням препарати Pg перевіряли на наявність спонтанної амідолітичної активності за допомогою фотометричного методу з використанням специфічного хромогенного субстрату плазміну S2251 та брали до роботи лише ті, які не проявляли спонтанної активності. Препарати протеїну концентрували, стерилізували ультрафільтрацією та зберігали за -20°C до використання.

Активність MMP-9 в біоптатах ранової поверхні шкіри оцінювали за допомогою желатинової зимографії і порівнювали її з активністю MMP-9 у біоптатах з гострих ран. Желатинолітичну активність аналізували шляхом розділення протеїнів (50 мкг/доріжку) у 8% поліакриламіді, кополімеризованому з желатином (5 мг/мл). Після денатуруючого електрофорезу гелі промивали двічі протягом 30 хв. у холодному 2,5 % (v/v) Triton X-100 для видалення SDS, а потім 5 разів протягом 5 хв. у холодній бідистильованій воді. Після промивання гелі інкубували протягом 16 год. при 37°C у буфері для проявлення (50 мМ трис-HCl, pH 7,6, що містить 0,15 М NaCl, 5 мМ CaCl₂, 1 мМ ZnCl₂ і 0,02 % Tween-20). Зимограми фарбували 0,15% спиртовому розчині Coomassie R-250. Знебарвлення проводили у розчині 30 % метанолу та 10 % оцтової кислоти, що не містив барвника. Після знебарвлення гель мав рівномірний блакитний фон, за винятком тих

зон, до яких мігрували ММП та розщеплювали субстрат. Желатинолітичну активність ідентифікували як прозорі смуги на фоні желатину, забарвленого кумасі. Отримані смуги ММП візуалізували та проводили кількісний денситометричний аналіз.

При статистичній обробці для аналізу даних зимографії використовувався U-критерій Манна-Уїтні для оцінки відмінностей між середніми параметрами. Усі змінні були виражені як середнє \pm стандартна помилка середнього (S.E.M.). Для всіх тестів $P < 0,05$ вважалося статистично значущим. Для виконання всіх статистичних розрахунків використовувалося програмне забезпечення «OriginPro» (основна версія 9.0 SR2 Pro English).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нерідко консервативна терапія може мати самостійне значення у лікуванні нейропатичних діабетичних ран. За повідомленнями деяких авторів, частота загоєння ран стоп становить 80-90%, причому, приблизно 2/3 пацієнтів хірургічного втручання не потребують [11]. Для досягнення позитивного результату в даному випадку необхідно дотримання усіх протоколів лікування, правил асептики та антисептики, та необмежений час (до 8 місяців). Разом з тим, існуюча тривалий час рана є потенціальним джерелом для подальшого інфікування та сприяння утворенню нових гнійних вогнищ на кінцівці. Тому, основна тенденція лікування даних ран полягає у закритті ранових дефектів у можливо ранні терміни, для попередження виникнення ускладнень та прогресуванню деструкції тканин [7].

Головною умовою для виконання пластичних операцій є нормалізація стану хворого, достатнє кровопостачання м'яких тканин кінцівки, усунення гнійного запалення. Рана повинна бути з низьким рівнем бактеріологічного обсеменіння (критичний рівень 105 мікробних тіл на 1 г тканини), заповнена якими сочними грануляціями з мінімальною ексудацією. Пластична операція повинна призвести до повного закриття ранового дефекту та профілактики деформацій.

Найчастіше виконуються наступні види пластичних операцій: аутодермопластика (АДП) при обширних дефектах на тилі стопи; пластика методом дозованого розтягнення тканин або місцевими тканинами при дефектах на гомілці середнього розміру; пластика місцевими тканинами в ділянці гомілковоступневого суглобу та незначних лінійних ранах на тилі стопи; пластика місцевими тканинами при дефектах в «точках підвищеного тиску»; аутодермопластика при дефектах медіального підшовного своду стопи; ротація тильного клаптя для закриття торцевого та підшовного дефекту; ротація підшовного клаптя для закриття бокових та торцевих дефектів стопи.

Застосування аплікацій плазміногену у пацієнтів основної групи дозволило досягти повного загоєння у 16 пацієнтів із ранами із площею до 30 см² на 16–18 добу лікування. Натомість, у 4 пацієнтів із ранами на тильній поверхні гомілки та стопи, площа яких сягала понад 30 см² головною задачею було очищення ранової поверхні та підготовка до її закриття. До початку лікування рана мала характерний вигляд: ранова поверхня вкрита фібрином, набрякла, виступає над поверхнею шкіри, грануляції крупнозернисті, мали «нездоровий» блідо-сірий колір, ексудат помірний, але з неприємним запахом (рис. 1А).

Активність желатиназу була високою. На зимограмах відмічено патологічне збільшення рівня ММП-9, що характерно для перебігу хронічних ранових процесів (рис. 2). Після застосування аплікацій аутологічного P_g за розробленою нами методикою відмічено повне очищення ран від фібрину та некротичних тканин, зменшення набряку починаючи з 10 доби лікування.

Грануляції були дрібнозернистими, мали «здоровий» вигляд, ексудат скудний. При бактеріологічному дослідженні патогенних мікроорганізмів не виявлено, а при гістологічному – повна відсутність «біоплівки».

Починаючи із 14 доби констатовано прогресивну ретракцію площі рани, що свідчило про сприятливі умови для проведення пластичних операцій (див. рис. 1В).



Рис. 1. Стан ранової поверхні; А – до лікування аутологічним плазміногеном; В – на 14 добу після застосування аутологічного плазміногену; С – на 3 добу після проведення аутодермопластики та 18 добу лікування аутологічним плазміногеном; D – повне загоєння трофічної виразки на 24 добу лікування аутологічним плазміногеном

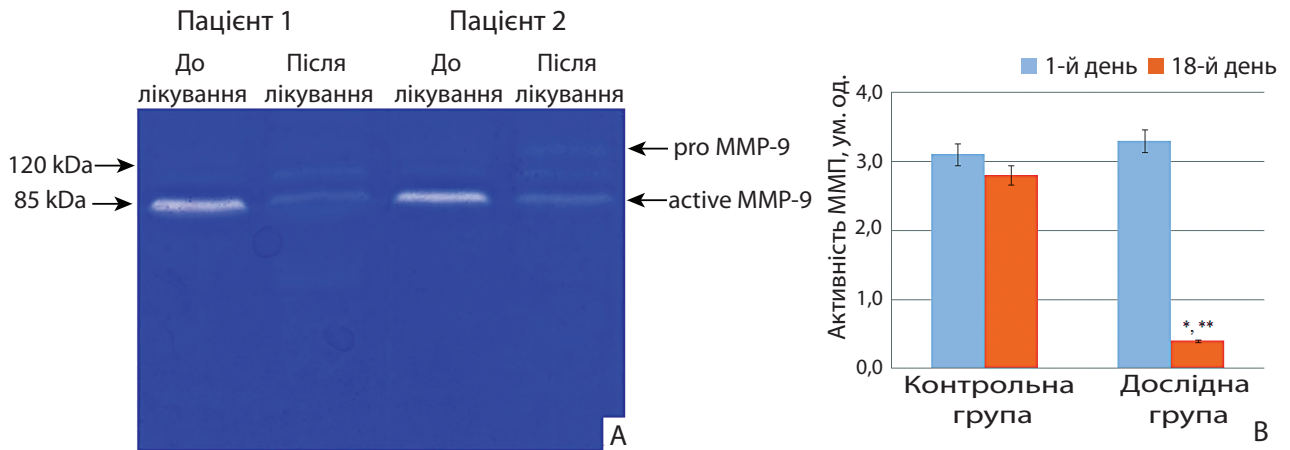


Рис. 2. Активність ММП (ум.од.): А – Зниження активності ММП внаслідок аплікацій аутологічним плазміногеном (типова зимограма); В – динаміка змін активності ММП-9 у пацієнтів обох груп на початку (1-й день) та через 18 днів лікування аутологічним плазміногеном;
* – $p < 0,01$ при порівнянні даних в групі;
** – $p < 0,01$ при порівнянні груп між собою

Разом з тим, відмічено достовірне зниження активності ММП в тканинах ран у 3,5 рази на 18 добу лікування ($p < 0,01$) (див. рис. 2). Виявлено залежність зменшення активності протеаз в тканинах ран та появою крайової епітелізації. У пацієнтів із високою активністю тканинних ферментів, на тлі «здорової» грануляційної тканини епітелізація була відсутня. Таким чином, поява крайової епітелізації свідчить до готовності рани до пластичного закриття.

Ранові дефекти було закрито за допомогою АДП шкіряним трансплантатом методом «маркування» (див. рис. 1С). Усі транспланти прижились (див. рис. 1D).

У пацієнтів контрольної групи, які отримували традиційне лікування, починаючи з 20 доби лікування відмічено зменшення ознак перифокального запалення та очищення ран від залишків фібрину та некротичних тканин. Рівень активності ММП залишався стабільно високим (див. рис. 2).

В подальшому, очищення ранової поверхні та зменшення площі ран відбувалось поступово із залученням нових форм ранових покриттів та інструментальних методів. Контракція ранової поверхні наступала починаючи з 30 доби лікування. Причиною тривалого та не завжди успішного лікування хронічних діабетичних ран є драматична активність ММП, агресивна дія яких повністю нівелює усі зусилля по лікуванню ран. Навіть повне очищення ран від мікробного компонента не дає гарантії для успішного загоєння. Проведення пластичних операцій по закриттю ранової поверхні не буде мати успіху в даному випадку, та приведе до повного лізису трансплантата до тих пір, доки не буде нейтралізовано активність протеаз. Як було продемонстровано у наших попередніх дослідженнях [12], не дивлячись на застосування вакуум-терапії при лікуванні діабетичних ран, рівень активності ММП в ексудаті даних ран залишається досить високим. Навіть після проведення вакуумної терапії.

Механізм дії плазміногену при хронічних ранових процесах полягає, в першу чергу, у ліквідації тканинної гіпоксії шляхом розчинення мікротромбів у судинах за рахунок своїх фібри-

нолітичних властивостей [1]. Процес переходу плазміногену у плазмін супроводжується підвищеною активністю прозапальних цитокінів, які містяться в тканинах ран [2]. Експресія даних факторів ініціює запалення та стимулює ангиогенез, який є основною складовою для подолання «порочного круга» хронічного запалення та переходу ранового процесу на іншу стадію загоєння ран – стадію проліферації.

ВИСНОВКИ

Активність ММП у хронічних діабетичних ранах сягає драматичних значень, в результаті чого самостійне загоєння ран стає неможливим. Застосування апікацій автологічного P_g дозволяє модулювати дану активність, створити сприятливі умови для загоєння шляхом зменшення надмірної активності ММП, покращення кровопостачання та усунення запальних процесів. Місцеве застосування автологічного P_g представляє собою багатобіцяючу стратегію для розробки нових терапевтичних підходів, які покращують загоєння ран у пацієнтів із ЦД.

Конфлікт інтересів. Автори даного рукопису стверджують, що конфлікт інтересів під час виконання дослідження та написання рукопису відсутній.

Джерела фінансування. Дослідження виконано за кошти держбюджетної теми Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (Київ, Україна) «Хірургічне лікування хворих з гнійно-некротичними ранами за допомогою молекулярно-клітинних технологій» (реєстр. № 0123U101055) та держбюджетної теми Інституту ім. Біохімія (Київ, Україна) «Дослідження функціональної ролі білків плазміноген/плазмінової системи в регуляції молекулярно-клітинних взаємодій у фібринолізі та репаративних процесах» (реєстр. № 0123U100516).

REFERENCES

1. Ajjan RA, Gamlen T, Standeven KF, Mughal S, Hess K et al. Diabetes is associated with posttranslational modifications in plasminogen resulting in reduced plasmin generation and enzyme-specific activity. *Blood* 2013; 122 (1): 134-142. DOI: 10.1182/blood-2013-04-494641.
2. Bryk-Wiązania AH, Undas A. Hypofibrinolysis in type 2 diabetes and its clinical implications: from mechanisms to pharmacological modulation. *Cardiovasc Diabetol.* 2021; 20 (1): 191. DOI: 10.1186/s12933-021-01372-w.
3. Costa D, Ielapi N, Caprino F, Giannotta N, Sisinini A, et al. Social aspects of diabetic foot: a scoping review. *Social Sciences.* 2022; 11 (4): 149. DOI: 10.3390/socsci11040149.
4. Fallah M, Viklund E, Bäckman A, Brodén J, Lundskog B et al. Plasminogen is a master regulator and a potential drug candidate for the healing of radiation wounds. *Cell Death Dis.* 2020; 11 (3): 201. DOI: 10.1038/s41419-020-2397-0.
5. Gandhi C, Kadam P, Kamepalli P, Kadam Y. PEDIS grading and its role in diabetic foot ulcer management. *Int Surg J.* 2019; 6 (7). DOI: 10.18203/2349-2902.isj20192990.
6. Gibson DJ, Schultz GS. Molecular wound assessments: matrix metalloproteinases. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2013; 2 (1): 18-23. DOI: 10.1089/wound.2011.0359.
7. Gushiken LFS, Beserra FP, Bastos JK, Jackson CJ, Pellizzon CH. Cutaneous wound: an update from physiopathology to current therapies. *Life (Basel).* 2021; 11 (7): 665. DOI: 10.3390/life11070665.
8. Keragala CB, Medcalf RL. Plasminogen: an enigmatic zymogen. *Blood.* 2021; 137 (21): 2881-2889. DOI: 10.1182/blood.2020008951.
9. Krishnaswamy VR, Mintz D, Sagi I. Matrix metalloproteinases: the sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2017; 1864 (11 Pt B): 2220-2227. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2017.08.003.
10. Kolimi P, Narala S, Nyavanandi D, Youssef AA, Dudhipala N. Innovative treatment strategies to accelerate wound healing: trajectory and recent advancements. *Cells.* 2022; 11 (15): 2439. DOI: 10.3390/cells11152439.
11. Olsson M, Järbrink K, Divakar U, Bajpai R, Upton Z et al. The humanistic and economic burden of chronic wounds: a systematic review. *Wound Repair Regen.* 2019; 27 (1): 114-125. DOI: 10.1111/wrr.12683.
12. Petrenko ON, Bezrodny BG, Tykhomyrov AA. Ekzogennye proteolytycheskie proteinazy v hronichnyh ranah u pacientov s sindromom diabeticheskoy stopy. *Khirurgia Vostochnaya Evropa.* 2015;2(12):50-60.
13. Stoscheck CM. Quantitation of protein. *Methods Enzymol.* 1990; 182: 50-68. DOI: 10.1016/0076-6879(90)82008-p.
14. Westby MJ, Norman G, Watson REB, Cullum NA, Dumville JC. Protease activity as a prognostic factor for wound healing in complex wounds. *Wound Repair Regen.* 2020; 28 (5): 631-644. DOI: 10.1111/wrr.12835.

THE PARTICULARITY PLASTIC CLOSURE OF WOUND DEFECTS IN PATIENTS WITH CHRONIC DIABETIC WOUNDS

¹ Petrenko O. M., ¹ Badziukh S. V., ² Tykhomyrov A. O.

¹ Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

² Palladin Institute of Biochemistry of National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

olegnpetrenko@ukr.net

Background. Chronic diabetic foot wounds and ulcers are serious complications of the course of diabetes mellitus (DM), which account for 85% of purulent-necrotic lesions of the lower extremities. Pathogenetic mechanisms of «chronization» of wounds in the form of hyperglycemia, neuropathy, and existing infection lead to metabolic disorders in the form of tissue hypoxia and activation of matrix metalloproteinase (MMP) proteolytic enzymes.

Aim: to study the role of autologous plasminogen on healing processes in diabetic wounds by modulating MMP activity.

Materials and methods. 45 patients with chronic diabetic wounds, who were divided into 2 groups, participated in the study. Patients of the control group (n=25) were treated according to standard methods. Autologous plasminogen applications were used for treatment in 20 patients of the main group.

Results. On the 18th day of treatment, a 3.5-fold decrease in the activity of MMP-2,-9 and complete healing of wounds was noted in 16 patients. In 4 patients, the wound defects were closed by the method of autodermoplasty with complete engraftment of grafts. In the patients of the control group, the level of MMP activity remained stably high throughout the observation period.

Conclusions. The use of applications of autologous plasminogen allows to modulate the activity of MMP and create favorable conditions for the healing of chronic diabetic wounds.

Key words: diabetes, matrix metalloproteinases, plasminogen.