

УДК 577.3

ОГРАНИЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ФЕРМЕНТА, ИСПОЛЬЗУЕМОГО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОЖОГОВЫХ РАН, ПОТОКОМ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИНГИБИТОРА, СОДЕРЖАЩЕГОСЯ В ЭКССУДАТЕ

А.С. Халили, С.П. Домогатский, Э.К. Рууге

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики; e-mail: khalili@scientist.com)

Рассмотрена математическая модель процесса проникновения протеолитического фермента, нанесенного на поверхность ожоговой раны, в глубину зоны поражения. Рассматривается диффузионное распространение фермента навстречу потоку экссудата, а также необратимая инактивация проникающего фермента специфическими ингибиторами, содержащимися в экссудате. Установлена иерархия скоростей этих процессов. Определена зависимость основных характеристик эффективности ферментной терапии от концентрации наносимого фермента. Показано, что интактные ткани и грануляции защищены от действия фермента слоем некротической ткани, содержащим несвязанный ингибитор.

Протеолитические ферменты применяют в терапии ожоговых ран [1, 2]. В настоящее время сериновые протеиназы (трипсин, химотрипсин) широко используют для лизиса компонентов внеклеточного матрикса в зоне коагуляционного некроза ожоговой раны [1, 2].

Эффективность ферментной терапии определяется локальной концентрацией фермента в зоне коагуляционного некроза ожоговой раны. Проникновение фермента в глубь ожоговой раны ограничивается диффузионно-фильтрационным барьером, формируемым структурами матрикса интерстициального пространства соединительной ткани [3], потоком экссудата и наличием ингибиторов сериновых протеиназ в экссудате [4].

Цель данной работы состояла в определении влияния ингибиторов протеиназ, присутствующих в экссудате, на следующие характеристики распределения фермента в зоне коагуляционного некроза ожоговой раны: 1) количество активного фермента, проникшего в зону коагуляционного некроза, и глубина его проникновения; 2) скорость проникновения активного фермента в жизнеспособные ткани зоны обратимого некроза.

Модель

Качественное описание модели. В настоящей работе были рассмотрены ожоги кожи IIIа–IIIб степени, согласно классификации XXVII Всесоюзного съезда хирургов [5]. Зону необратимого повреждения ожоговой раны формирует участок коагуляционного некроза, включающий эпидермис и прилежащие структуры дермы. В пределах зоны коагуляционного некроза отсутствует циркуляция крови и лимфы. Зону обратимых повреждений формируют глубокие слои дермы и прилежащие участки жировой ткани [5].

Плазма крови является источником ингибиторов сериновых протеиназ (серпинов) [6, 7]. Серпины плазмы крови фильтруются в интерстиций околососудистого пространства [4], что приводит к их накоплению в интерстициальном пространстве соединительной ткани в зоне обратимого повреждения и в зоне коагуляционного некроза [4]. Значительная локальная концентрация серпинов в интерстиции соединительной ткани ограничивает протеолитическую активность лекарственных аппликационных форм ферментов, используемых в зоне коагуляционного некроза в целях консервативной терапии ожоговой раны.

Постулаты модели. Рассматривается одномерная модель ожоговой раны, в которой выделены три зоны (рис. 1): 1) зона, являющаяся источником

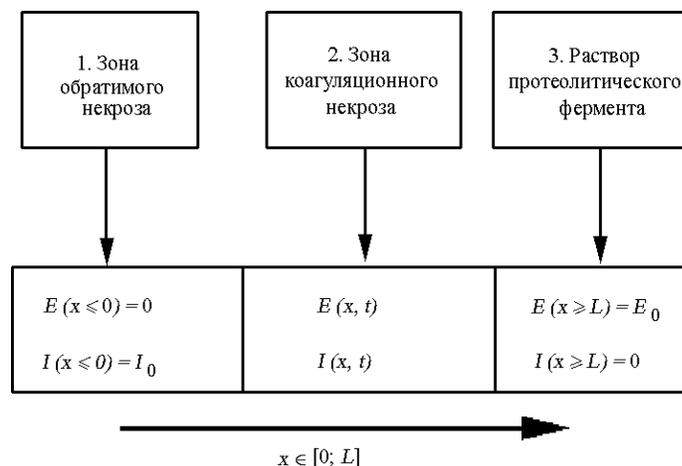
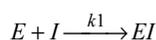


Рис. 1. Модель ожоговой раны: 1 – зона обратимого некроза, 2 – зона коагуляционного некроза, 3 – раствор фермента

протеолитического фермента с концентрацией E_0 ; 2) зона, являющаяся источником ингибитора с концентрацией I_0 ; 3) зона коагуляционного некроза, где происходят диффузионно-фильтрационное перемещение и взаимодействие фермента и ингибитора.

Значения концентрации фермента E_0 и ингибитора I_0 считаются постоянными вследствие бесконечной емкости соответствующих зон-источников и непрерывного перемешивания в этих зонах.

Зона коагуляционного некроза имеет фиксированный размер L и в данной модели обладает свойствами интерстиции соединительной ткани. Перенос фермента и ингибитора в зоне коагуляционного некроза осуществляется в процессе диффузии, а также при перемещении фильтрационных потоков интерстициальной жидкости. Взаимодействие ингибитора (серпина) и фермента (сериновой протеиназы) рассматривается как необратимая бимолекулярная реакция



с постоянной скорости реакции первого порядка k_1 [8].

Система уравнений, описывающих процессы диффузии, фильтрационного переноса потоками интерстициальной жидкости и необратимого взаимодействия фермента и ингибитора (серпина) в зоне коагуляционного некроза ожоговой раны, выглядит следующим образом:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial E(x,t)}{\partial t} = D_E \frac{\partial^2 E(x,t)}{\partial x^2} - \rho_E \frac{\partial E(x,t)}{\partial x} - k_1 \cdot E(x,t) \cdot I(x,t) \\ \frac{\partial I(x,t)}{\partial t} = D_I \frac{\partial^2 I(x,t)}{\partial x^2} - \rho_I \frac{\partial I(x,t)}{\partial x} - k_1 \cdot E(x,t) \cdot I(x,t) \end{array} \right\}, \quad (1)$$

где $D_{E,I}$ – коэффициенты диффузии; $\rho_{E,I}$ – коэффициенты фильтрации; $E(x, t)$, $I(x, t)$ – концентрация фермента и ингибитора соответственно. Коэффициент фильтрации можно представить соотношением $\rho = R(\Delta p/L)$, где R – проницаемость среды, Δp – величина гидростатического давления на участке длиной L .

Граничные условия описаны уравнениями:

$$\begin{array}{l} E(x = 0, t) = 0; I(x = 0, t) = I_0; \\ E(x = L, t) = E_0; I(x = L, t) = 0. \end{array} \quad (2)$$

Параметры модели приведены в табл. 1.

Результаты

Выявление иерархии характерных времен диффузии, фильтрации, ингибирования и лизиса некротической ткани позволяет выделить процессы, доминирующие при определенных временах и расстояниях [13]. Характерные времена диффузии и фильтрации $t_{\text{диф}}(x) = x^2/4D$, $t_{\text{ф}}(x, L) = x/\rho$ отражают скорость переноса фермента от источника на расстояние x .

Т а б л и ц а 1

Параметры модели

D_E – коэффициент диффузии фермента (трипсин, химотрипсин)	$5,8 \times 10^{-7}$ см ² /с, [10, 12]
D_I – коэффициент диффузии ингибитора (α_1 -антитрипсина)	$5,8 \times 10^{-7}$ см ² /с, [10]
$\rho_{E,L}$ – коэффициент фильтрации фермента (трипсин, химотрипсин)	$2,4 \times 10^{-7}$ см ² /с, [10]
$\rho_{I,L}$ – коэффициент фильтрации ингибитора (α_1 -антитрипсина)	$2,4 \times 10^{-7}$ см ² /с, [10]
I_0 – концентрация ингибитора (α_1 -антитрипсина) в интерстиции	2×10^{-5} М, 1 мкг/мл [11]
E_0 – концентрация наносимого фермента, применяемая в ферментной терапии	До 20 мг/мл (8×10^{-4} М), [1,2]
k_1 – константа скорости реакции связывания трипсина α_1 -антитрипсином	$1,7 \times 10^5$ М ⁻¹ с ⁻¹ , [8]
K_I – константа равновесия реакции связывания трипсина α_1 -антитрипсином	$1,4 \times 10^{-11}$ М, [8]
L – толщина слоя коагуляционного некроза при ожоге III	1–3 мм, [1, 2]
V_{lys} – средняя скорость изменения толщины зоны коагуляционного некроза за счет протеолитического действия фермента	10 мкм/ч, [1, 2]

Характерное время подавления активности фермента ингибитором

$$t_{\text{инг}} = 1/k_1 I_0.$$

Характерное время продвижения границы

$$t_{\text{lys}}(x) = x/V_{\text{lys}},$$

которое требуется для изменения толщины слоя коагуляционного некроза на величину x .

Диаграмма зависимости характерных времен процессов, влияющих на концентрацию активного фермента в слое, удаленном от источника фермента на расстояние x , представлена на рис. 2. В физически значимом диапазоне значений $x \approx 10$ –1000 мкм иерархия времен выглядит следующим образом:

$$t_{\text{инг}} \ll t_{\text{диф}} \ll t_{\text{ф}} \ll t_{\text{lys}}. \quad (3)$$

Самым быстрым процессом является взаимодействие фермента с ингибитором; этот процесс происходит за доли секунды. В течение этого времени процесс диффузии, а также прочие, более медленные процессы не успевают повлиять на распределение фермента. За времена, на порядок превышающие $t_{\text{инг}}$, но меньшие $t_{\text{диф}}$, устанавливается локальное равновесие между ферментом и ингибитором. Поскольку процесс взаимодействия

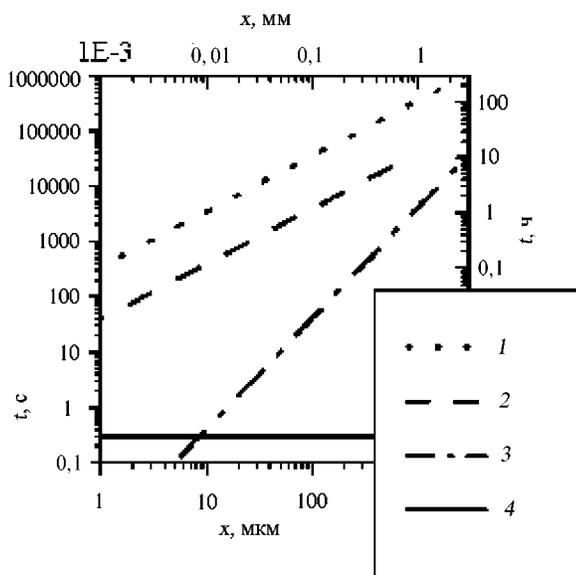


Рис. 2. Зависимость характерных времен процессов, влияющих на активность фермента в точке, удаленной на расстояние x от источника фермента (время и расстояние даны в логарифмическом масштабе)

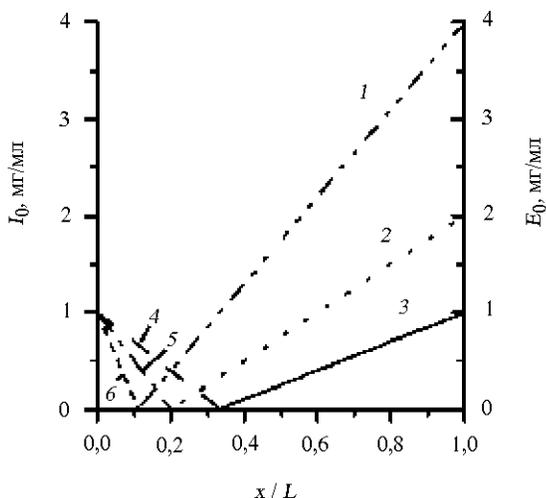


Рис. 3. Распределение фермента и ингибитора в зоне коагуляционного некроза (концентрация фермента в растворе: 1 / 2 / 4 мг/мл)

фермента и ингибитора является быстрым и необратимым, то полностью расходуется вещество, представленное в меньшей концентрации. Таким образом, зона коагуляционного некроза разделяется на два слоя – внешний, содержащий только активный фермент, и внутренний, содержащий только несвязанный ингибитор.

Диффузия фермента и ингибитора происходит на порядки медленнее процесса их взаимодействия, но на порядок быстрее процессов фильтрации и продвижения границы. Распределение активного фермента в зоне коагуляционного некроза соответствует квазистационарному диффузионному распределению.

Полученный результат позволяет редуцировать систему уравнений (1) и получить квазистационарное рас-

пределение фермента в зоне коагуляционного некроза, а также основные параметры, характеризующие эффективность терапии и возможность возникновения побочных эффектов (табл. 2). Для сравнения в табл. 2 приведены значения этих параметров при $I_0 = 0$ (в этом случае не происходит специфического взаимодействия фермента и ингибитора).

Распределение фермента и ингибитора в зоне коагуляционного некроза изображено на рис. 3 (концентрации можно считать распределенными линейным образом с точностью до 5%). Зависимость глубины проникновения фермента от его концентрации в растворе представлена на рис. 4. При малых концентрациях фермента ($E_0 \ll I_0$) глубина проникновения стремится к нулю ($\Delta L_E \rightarrow 0$).

Обсуждение

Наличие специфического ингибитора в зоне обратимого некроза и в кровотоке принципиально влияет на распределение активного фермента в зоне коагуляционного некроза и его проникновение в жизнеспособные ткани. При этом наличие потока специфического ингибитора играет двойную роль:

- 1) происходит уменьшение количества активного фермента в зоне коагуляционного некроза и глубины его проникновения (уменьшение эффективности терапии);
- 2) происходит полная инактивация фермента до его попадания в зону обратимого некроза (защита грануляционных тканей и микроциркуляторного русла от протеолитической активности – снятие побочных эффектов).

Как было показано ранее (табл. 2), использование больших концентраций фермента ($E_0 \gg I_0$) позволяет минимизировать снижение эффективности терапии; при этом ингибитор продолжает выполнять защитную функцию относительно интактных тканей (табл. 3).

Полученные выводы можно проиллюстрировать на примере сериновых протеиназ (трипсин, химотрипсин), металлопротеиназы (коллагеназа *Clostridium histolyticum*), использующихся в ферментной терапии ожоговых ран [1, 2]. Основным ингибитором протеиназ, содержащимся в интерстициальной жидкости является α_1 -анти-трипсин; ингибиторы металлопротеиназ представлены в пренебрежимо малых количествах ($I_0 \approx 0$) [9]. Проникновение сериновых протеиназ в зону коагуляционного некроза ограничивается встречным потоком ингибитора (антитрипсина) в отличие от бактериальной коллагеназы (проникновение ничем не ограничено).

Действительно, согласно результатам клинических испытаний, побочные эффекты в случае использования коллагеназы *Clostridium histolyticum* проявляются при обработке ферментом даже малой доли пораженной поверхности (при обработке лишь 1% поверхности тела у 10% пациентов кровотечения и эрозии вен не наблюдались) [1]. При обработке 20–50% поверхно-

Таблица 2

Основные характеристики эффективности терапии в присутствии и в отсутствие специфического ингибитора в тканях и кровотоке

Характеристики терапии	Содержание специфического ингибитора в тканях и кровотоке	
	содержится	не содержится
Распределение активного фермента в зоне коагуляционного некроза	$x \in \left[\frac{I_0}{E_0 + I_0} \cdot L; L \right]:$ $E(x) = (E_0 + I_0) \cdot \frac{x}{L} - I$ $x \in \left[0; \frac{I_0}{E_0 + I_0} \cdot L \right]:$ $E(x) = 0$	$x \in [0; L]:$ $E(x) = E_0 \cdot \frac{x}{L}$
Глубина проникновения активного фермента в зону коагуляционного некроза	$\Delta L_E = \frac{E_0}{E_0 + I_0} \cdot L$	$\Delta L_E = L$
Толщина слоя, защищающего грануляционные ткани от действия активного фермента	$\Delta L_I = \frac{I_0}{E_0 + I_0} \cdot L$	$\Delta L_E = L$
Количество активного фермента в зоне коагуляционного некроза	$\frac{M_E}{S} = \frac{1}{2} E_0 \Delta L_E$ $= \frac{1}{2} \frac{E_0^2}{E_0 + I_0} \cdot L$	$\frac{M_E}{S} = \frac{1}{2} E_0 L$
Скорость инактивации фермента в зоне коагуляционного некроза	$\frac{J_E}{S} = \frac{1}{2} (E_0 + I_0) \frac{D}{L}$	$\frac{J_E}{S} = 0$
Скорость проникновения активного фермента в жизнеспособные ткани зоны обратимого некроза	$\tilde{J}_E = 0$	$\tilde{J}_E = \frac{1}{2} E_0 \frac{D}{L}$

сти тела концентрированным раствором трипсина побочных эффектов не наблюдалось [1]. Это подтверждает сделанный нами вывод о том, что слой некротической ткани, содержащий несвязанный ингибитор, защищает интактные ткани от действия сериновых протеиназ.

Таблица 3

Эффективность и побочные эффекты при обработке некротических ран сериновыми протеиназами (трипсин, химотрипсин) и бактериальными металлопротеиназами (коллагеназа *Clostridium histolyticum*)

Терапевтическое действие протеиназа	Сериновые протеиназы трипсин, химотрипсин		Металло- протеиназа
	$E_0 \ll I_0$	$E_0 \gg I_0$	
Степень проникновения активного фермента в зону коагуляционного некроза	Низкая *	Высокая **	Высокая ***
Побочные эффекты: Протеолитическая активность в кровеносных сосудах	Нет [1]	Нет [1]	Есть [1] ****
Повреждение грануляций и тканей зоны обратимого некроза	Нет	Нет	Возможно

Примечания. * При $E_0 < 0,5$ мг/мл проникновение менее, чем на 50% глубины зоны коагуляционного некроза; ** при $E_0 > 5,0$ мг/мл проникновение более, чем на 90% глубины зоны коагуляционного некроза; *** полное проникновение в зону коагуляционного некроза – не ограничено ингибитором; **** у 10% пациентов при обработке раны площадью 1% от суммарной поверхности тела [1] наблюдались венозные кровотечения и эрозия кровеносных сосудов.

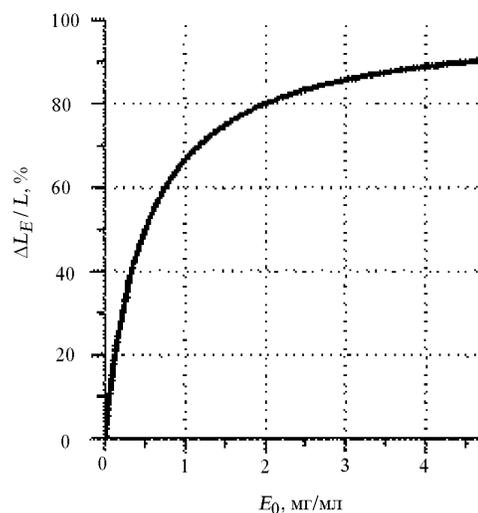


Рис. 4. Относительная глубина проникновения фермента $\Delta L_E / L$ (%): зависимость от концентрации фермента в растворе E

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Klasen H.J.* // *Burns*. 2000. **26**. P. 207.
2. *Глянцев С.П., Саввина Т.В., Заец Т.Л.* // Бюлл. эксп. биол. мед. 1996. **121**. P. 716.
3. *Jain R.K., Gerlowski L.E.* // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 1986. **5**. P. 115.
4. *Prager M.D., Herring M., Germany B., Baxter C.R.* // *J. Burn. Care Rehabil.* 1991. **12**. P. 300.
5. *Бурмистров В.М.* Классификация ожогов//Ожоги. Л., 1981.
6. *Varisoni D., Bellavite P., Sorio A. et al.* // *Burns*. 1991. **17**. P. 141.
7. *Pos O., van der Stelt M.E., Wolbink G.J. et al.* // *Clin. Exp. Immunol.* 1990. **82**. P. 579.
8. *Olson S.T., Bock P.E., Kvassman J. et al.* // *J. Biol. Chem.* 1995. **270**. P. 30007.
9. *Handbook of biochemistry and molecular biology* // Cleveland, Ohio, 1977.
10. *Chary S.R., Jain R.K.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1989. **86**. P. 5385.
11. *Michalski J.P., McCombs C.C., Sheth S. et al.* // *J. Immunol. Methods*. 1985. **83**. P. 101.
12. *Foy B.D., Blake J.* // *J. Magnetic Resonance*. 2001. **148**. P. 126.
13. *Рубин А.Б.* Биофизика. М., 1999. С. 49.

Поступила в редакцию 25.10.02