

© А.С.Коган, В.А.Шантуров и др., 2005.

А.С.Коган, В.А.Шантуров, Р.Р.Гумеров, Е.Г.Григорьев

30 ЛЕТНИЙ ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММОБИЛИЗОВАННЫХ ПРОТЕИНАЗ В ЛЕЧЕНИИ ГНОЙНО-ОЧАГОВЫХ ПРОЦЕССОВ

Научный центр реконструктивной и восстановительной хирургии ВШЦ СО РАМН
Иркутск, Россия

Аннотация: В настоящем сообщении представлен 30-летний опыт использования иммобилизованных протеиназ для лизиса денатурированных белковых структур (препараты профезим и имозимаза, АО "Итерум", Новосибирск). Детальный анализ механизмов протеолиза проведен на 10 видах белковых субстратов. Клинические исследования проведены в процессе лечения 497 больных: 65 с абсцессами живота различной локализации, 67 с распространенным гнойным перитонитом, 57 с неспецифическим язвенным колитом, 148 с очагами криодеструкции, 57 с очагами термонекроза шейки матки, 54 с инфекционно-воспалительным процессом в мочевыводящих путях, осложнившимся течением послеоперационного периода у больных ДГПЖ, 49 с острым пиелонефритом. Применение имозимазы в лечении данной патологии позволяет уменьшить летальность, добиться более благоприятного течения воспалительного процесса, сократить сроки выздоровления. На основании описанных данных определены закономерности действия препарата в отношении различных белковых субстратов, определено время экспозиции.

Ключевые слова: имозимаза, иммобилизованные протеиназы, денатурированные белковые субстраты, тромболизис, абсцесс живота, распространенный гнойный перитонит, неспецифический язвенный колит, инфекция мочевыводящих путей.

В последние годы показано, что денатурированные белковые субстраты (ДБС), непременно присутствующие в очаге гнойно-некротического процесса (сгустки крови, некротизированная клетчатка, фибринозно-гнойные структуры (ФГС), секвестры, избыточные надлигатурные ткани), являются средой вегетации возбудителей и источником реинфицирования в очаге воспаления [1]. В этих структурах содержится на 1-2 порядка больше микроорганизмов, чем в гнойном экссудате. В них плохо проникают антибактериальные препараты. Таким образом, они являются "резервом нагноения".

Механическое удаление ДБС в полной мере затруднительно, особенно ФГС, спянных с висцеральной брюшиной, и опасно развитием кишечных свищей [2]. Вместе с тем имеются данные о том, что иммобилизованные протеолитические ферменты (ИПФ) способны воздействовать на девитализированные белковые субстраты, что в сочетании с применением антибактериальных препаратов оказывает положительный эффект [3, 4].

Настоящее сообщение объединяет наш 30-летний опыт использования ИПФ в лечении различных гнойных процессов.

В качестве препаратов ИПФ использовались имозимаза (АО "Итерум", Институт цитологии и генетики СО РАН), представляющая собой комплекс бактериальных протеиназ (протосубтилины *Vac. Subtilis*), иммобилизованных на полимерной матрице (полиэтиленоксид) методом радиационной сшивки [5] и профезим, матрицей которого является аминоэтилцеллюлоза. Активность препарата 60 ПЕ (протеолитических единиц) в 1 мл. Исследования проведены на 10 видах субстратов: фибриновая плёнка из донорской плазмы; стерильные сгустки крови, инфицированные *E. Coli* (106-108) сгустки крови; фибринозно-гнойные напластования на брюшине (распространённый гнойный перитонит); содержимое абсцессов живота (органных и внеорганных); фетальные ткани плодного яйца, удалённые при трубной беременности; венозные тромбы, удалённые при флелэктомиях; артериальные тромботические массы, удалённые при операциях аорто-бедренного шунтирования; содержимое гайморовых пазух при гнойном воспалении; фибринозно-гнойные структуры со слизистой кишечника при неспецифическом язвенном колите.

Результаты опытов *in vitro*. Инкубация фибриновой плёнки площадью 4 см² в течение 1 часа с 5 мл имозимазы вызывала её фрагментацию с образованием частиц 0,04 см² и менее. Имеется прямая зависимость интенсивности лизиса фибрина от соотношения количества фермента и субстрата. При соотношении 1 мг фибрина – 2,7 ПЕ имозимазы полный лизис субстрата происходил через 2 часа инкубации. При соотношении 1 мг фибрина – 4,7 ПЕ имозимазы лизис происходил к концу первого часа. Подобные данные получены и со стерильными сгустками крови. Опыты с инфицированными сгустками крови показали, что инфицированный субстрат лизируется достоверно быстрее (на 30 мин). Однако интенсивность микробной (*E. Coli*) контаминации сгустка (106-108 КОЕ/мл) не влияла на этот показатель. Есть основания полагать, что более быстрый лизис инфицированных сгустков крови происходил благодаря суммации протеолитических воздействий препарата и микробных протеиназ. Следует отметить, что показатель спонтанного лизиса сгустков крови составлял всего 12,5±0,5% в час.

В опытах *in vitro* со стандартной фибриновой плёнкой установлено, что имозимаза сохраняет свою активность в широком диапазоне pH (от 6,2 до 8,0), при этом отмечен максимальный лизис фибрина при pH 7,6.

Опыты *in vitro* с ФГС, полученными от больных распространённым гнойным перитонитом, показали, что эффект имозимазы не ограничивается лишь их лизисом. В процессе бактериологических исследований установлено, что если до воздействия имозимазы lg КОЕ/г для аэробов составлял 7,1±0,14, а аэробов 7,0±0,16, то после инкубации эти показатели были соответственно 3,5±0,40 (p<0,001) и 0,7±0,40 (p<0,001). Поскольку имозимаза не обладает прямым антибактериальным эффектом, есть основания считать, что уменьшение пула возбудителей обусловлено уменьшением массы биотопа, в котором вегетировали микроорганизмы. Параллельно с приведёнными выше изменениями мы наблюдали уменьшение и количества видов микробов. Этот показатель также снизился с 3,5±0,37 видов для аэробов и 2,7±0,76 для анаэробов до 2,0±0,45 (p<0,05) и 0,4±0,26 (p<0,001) видов соответственно.

Аналогичные результаты эффективного пролонгированного протеолиза имозимазой были получены при

инкубации с ней гнойных субстратов околоносовых пазух [1], ФГС, полученных при колоноскопии у больных неспецифическим язвенным колитом [9].

Интерес представляют результаты инкубации фетальных тканей плодного яйца, извлечённого эндоскопически при внематочной беременности. Полный лизис клеток цитотрофобласта, синцитиотрофобласта и разрушение ворсин хориона происходил в течение 24 часов воздействия имозимазы.

Практический интерес представляло использование имозимазы для лизиса криодевитализированных тканевых структур. Как при воздействии на очаги холодовой деструкции папиллом, базалиом, кондилом, пигментных невусов, так и при криодевитализации иноперабельных стенозирующих опухолей прямой кишки, введение в очаг криодеструкции имозимазы приводило к его лизису и отторжению, что сокращало продолжительность подчас длительного периода спонтанного отторжения крионекроза [6, 7].

Что касается венозных и артериальных тромбов, то временные параметры их лизиса зависели от давности и степени организации тромбов. Подтверждена прямая зависимость времени лизиса от соотношения количества фермента и субстрата. При этом, венозные тромбы лизируются быстрее артериальных при прочих равных условиях (табл. 5).

Если к этим данным добавить результаты ранее выполненных положительных опытов с гнойным экссудатом при эмпиемах плевры, фибринозно-гнойной мокротой при воспалительных процессах трахеобронхиального дерева [11], то спектр патологических субстратов, поддающихся лизису иммобилизованными протеиназами, значительно расширяется. Это свидетельствует о широком протеолитическом действии имозимазы.

Лизис денатурированных белковых субстратов *in vivo*. Первый опыт клинического применения иммобилизованных протеиназ был получен при лечении гнойных ран различного происхождения [12, 13]. Этот опыт показал, что гнойно-некротические массы ран в короткие сроки поддаются лизису, что сокращает время их очищения от девитализированных тканей и ускоряет развитие репаративных процессов. Основным принципом применения имозимазы является локальный (очаговые гнойно-некротические процессы) и регионарный (серозные полости – брюшная, плевральная).

Применение современных пункционных и пункционно-дренажных технологий [8, 17] позволяет вслед за эвакуацией гнойного содержимого воздействовать на остающийся субстрат. При этом происходит лизис структур, содержащих колонии возбудителей, препарат гидролизует содержимое гнойной полости, лизируются организовавшиеся гематомы. Это обеспечивает исчерпывающий результат миниинвазивного лечения у 89,4% больных острыми очаговыми висцеральными гнойными процессами [8, 10, 17].

Необходимо подчеркнуть, что имозимаза, пролонгированно и интенсивно лизируя денатурированные белки, действует как "химический нож", вскрывая микроабсцессы, что позволяет антибактериальным препаратам более эффективно оказывать своё действие. Вместе с тем, благодаря очищению очага воспаления от девитализированных тканей, устраняется питательная среда для вегетации микроорганизмов. Эти два фактора несомненно способствуют повышению эффективности лечения при сочетанном применении имозимазы и антибактериальных препаратов. В пользу их совместного применения говорит и тот факт, что протеолитическая активность ферментов повышается при их растворении поверхностно-активными антисептиками (хлоргексидин-биглюконат [14], анавидин).

Приведённые выше данные об уникальных свойствах имозимазы, продемонстрированные также в экспериментах на крысах с гнойным перитонитом [15], стали основанием для интраабдоминального применения пролонгированного протеолиза при распространённых гнойных перитонитах [1, 2, 3]. Санации брюшной полости в процессе программированных релапаротомий с использованием имозимазы существенно сокращали период очищения брюшины от фибринозно-гнойных напастований, сгустков крови, лишая тем самым возбудителей среды их обитания. Отсутствие обтурации фибрином дренажных систем обеспечивало эвакуацию продуктов протеолиза. В результате, летальность при распространённых гнойных перитонитах удалось снизить с 47,4 % до 27,3 % [1, 3].

Также эффективным локальный протеолиз оказался при синуситах [1], неспецифическом язвенном колите [9], абсцессах таза у гинекологических больных [1]. Параллельно показано достоверное ускорение отторжения очагов термонекроза после диатермокоагуляции, либо лазерной вапоризации очаговых патологических процессов шейки матки, что стимулировало развитие грануляции и эпителизации.

Положительный опыт применения пролонгированного протеолиза в гнойной хирургии явился основанием для внедрения этого метода в урологию. Добавление этого метода в программу комплексного лечения инфекционных гнойных процессов в мочевыводящих путях позволило существенно улучшить результаты их лечения [16]. Так введение имозимазы в мочевой пузырь больным после трансуретральной резекции способствовало быстрейшему очищению ложа простаты от патологического белкового субстрата и позволило раньше купировать воспалительный процесс (табл. 6). При лечении острого пиелонефрита имозимазу вводили в почечную лоханку через мочеточниковый катетер либо через нефростому, результатом чего также явилось более благоприятное течение воспалительного процесса и сокращение сроков выздоровления (табл. 7).

Следует отметить, что имозимаза не обладает отрицательными побочными эффектами, ибо протеиназы ковалентно "пришиты" к инертной матрице и не десорбируются с неё. Кроме этого, как известно, в воспалительных очагах доминируют процессы экссудации над резорбцией.

Опыта применения имозимазы в клинике как тромболитика пока нет, но есть основания полагать, что способность препарата лизировать не только фибрин, но и иные белковые субстраты, в том числе участвующие в процессе коагуляции крови, создаёт перспективу использования иммобилизованных протеиназ по крайней мере для локального тромболизиса.

Выводы:

Препарат иммобилизованных бактериальных протеиназ имозимазы обладает широким спектром протеолитического действия в отношении различных денатурированных белковых субстратов;

пролонгированный лизис инфицированных белковых девитализированных субстратов подавляет процесс реинфицирования в гнойно-некротическом очаге;

интенсивность лизиса напрямую зависит от соотношения имозимазы и субстрата, а также от концентрации фермента. Чем больше фермента и выше его концентрация, тем лизис интенсивнее. Оптимальное время экспозиции препарата составляет 3 часа;

эффективный лизис имозимазой сгустков крови, венозных и артериальных тромбов свидетельствует о перспективности этого препарата как тромболитика.

Список литературы

1. Хирургия тяжёлых гнойных процессов / Под

ред. Е.Г. Григорьева, А.С. Когана. –Новосибирск: Наука, 2000. - 314 с.

2. Хирургия послеоперационного перитонита / Под ред. Е.Г. Григорьева, А.С. Когана. - Иркутск, 1996. - 216с.

3. Нечаев Е.В. Сочетанное применение физических и химических методов санации брюшной полости в лечении разлитого гнойного перитонита. Автореф. дис. ... канд. мед. наук - Иркутск, 1998. - 25 с.

4. Фадеева Т.В. Закономерности микробной контаминации при гнойном перитоните и механизмы эффективности регионарного протеолиза иммобилизованными протеиназами. Автореф. дис. ... канд. мед. наук - Иркутск, 1998. - 23 с.

5. Троицкий А.В. Разработка способа получения лекарственных препаратов на основе иммобилизованных протеаз *Vac. subtilis*: Дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 1998. – 110 с.

6. Коган А.С., Зайчук И.П., Филиппов А.Г. Применение бесконтактной криодеструкции для лечения некоторых заболеваний прямой кишки // Крихирургия. - Иркутск, 1987. – 195 с. – С. 152-158.

7. Коган А.С., Пухаев А.А., Беляев М.Д., Николин В.П. Бесконтактная криодеструкция и интритканевой пролонгированный протеолиз опухолей мягких тканей // Крихирургия. - Иркутск, 1987. – 195 с. – С. 106-111.

8. Шантуров В.А., Коган А.С., Бойко Т.Н., Гумеров Р.Р., Фадеева Т.Н., Григорьев Е.Г. Пункционно-дренирующая санация гнойников брюшной полости: исчерпывающий ли метод лечения? // Хирургия. - 2000. - №12. – С.12-16.

9. Чашкова Е.Ю. Пролонгированный интестинальный протеолиз в комплексном лечении неспецифического язвенного колита. Автореф. дис. ... канд. мед.

наук - Иркутск, 2000. - 23 с.

10. Шантуров В.А. Диагностика и парахирургическое лечение локальных гнойно-деструктивных процессов верхнего этажа брюшной полости: Дис. ... д-ра мед. наук. - Иркутск, 1998. - 241с.

11. Очерки парахирургического лечения острых гнойных процессов лёгких и плевры / Под ред. Е.Г. Григорьева, А.С. Когана. – Иркутск: РИО ГИУВа, 1998. - 283 с.

12. Коган А.С., Морозов С.А., Куликов Л.К. Лечение гнойных ран иммобилизованными протеолитическими ферментами. - Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та, 1987. - 112 с.

13. Салганик Р.И., Коган А.С., Гончар А.М. Иммобилизованные протеолитические ферменты и раневой процесс. - Новосибирск, 1983. - 266 с.

14. Астапкевич С.Г., Нечипоренко Ю.А. Фонофорез карипазида с хлоргексидином в подготовке гнойных ран к кожной пластике // Кожная пластика в гнойной хирургии. Материалы всесоюзного симпозиума. – Москва, 1990. Под ред. Акад. В.Д. Фёдорова, д.м.н. Ю.А. Амिरасланова. – 89 с. – С. 9-10.

15. Усов С.А. Применение иммобилизованной бактериальной протеиназы (имозимазы) в комплексном лечении разлитого гнойного перитонита (экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Новосибирск, 1990. – 18 с.

16. Малышев А.В. Патогенетическое обоснование пролонгированного протеолиза в хирургии органов мочеполовой системы. Дис. ... канд. мед. наук. – Иркутск, 2000. – 119 с.

17. Гумеров Р.Р. Локальный пролонгированный протеолиз в лечении абсцессов живота: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.27 / ИГМУ. – Иркутск, 2001. – 23 с.

Гумеров Р.Р.

E-mail: surgery@ru.ru
rg@ru.ru