

ВПЛИВ ФЕРМЕНТ-ВМІСНИХ ПОЛІМЕРНИХ НАНОЧАСТИНОК НА АКТИВНІСТЬ MMP-2 ПІД ЧАС ЗАГОЄННЯ ОПІКОВОЇ РАНИ У ЩУРІВ ЗІ СТРЕПТОЗОТОЦИНОВИМ ДІАБЕТОМ

Мироненко О.І. <https://orcid.org/0000-0001-5221-7218>

Панова Т.І. <https://orcid.org/0000-0002-0298-802X>

Натрус Л.В. <https://orcid.org/0000-0002-0416-2600>

Веръовка С.В. <https://orcid.org/0000-0002-3578-7996>

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

om.ua.md@gmail.com

Актуальність. Синдром діабетичної стопи є поширеним ускладненням, що характеризується розвитком хронічних виразок. Серед механізмів порушення загоєння діабетичної рани провідну роль відіграє порушення гомеостазу позаклітинного матриксу: хронічна гіперглікемія, з одного боку, сприяє утворенню так званих advanced glycation end products (AGEs), що опосередковують прозапальну активацію імунних клітин, а з іншого боку, пригнічує проліферацію та синтетичну функцію фібробластів, порушує міграцію кератиноцитів та ендотеліоцитів. Тому елімінація AGEs є патогенетично обґрунтованим методом лікування хронічних виразок при цукровому діабеті. З цією метою було розроблено композит, що складався з поліспеціфічних мікробіних протеїназ, фіксованих на полімерних пористих наночастинках. Прогностичним індикатором загоєння хронічної рани було обрано активність матриксної металопротеїнази-2 (MMP-2).

Ціль: вивчити активність MMP-2 у тканинах опікової рани щурів з модельованим цукровим діабетом під впливом фермент-вмісних наночастинок.

Матеріали та методи. У досліді було використано $n=48$ щурів лінії Wistar. Цукровий діабет було індуковано введенням 50 мг/кг стрептозотоцину. Для моделювання рани у щурів з гіперглікемією використали стандартну тваринну модель термічного опіку за Walker та Mason, з модифікаціями. Термічне ураження відповідало II-ІІІА ступеню опіку, складало $19\pm1,6\%$ від загальної площини шкіри тварин. Щури були розподілені на дві групи по 24 тварини в кожній: група ЦД не отримувала лікування, а щурам з групи ЦД+Л щодня на опікову рану наносили композит з фермент-вмісними наночастинками. Тварин виводили з експерименту на 3, 7, 14 та 21 добу спостереження. Активність MMP-2 у тканинах опікової рани діабетичних щурів досліджували методом желягинової зимографії, виражали в умовних одиницях (AU). Статистичну обробку даних виконували у програмному пакеті SPSS Statistics Base, v.22 за допомогою критерію Стьюдента для парних порівнянь та критерію Шеффе – для множинних порівнянь.

Результати. Рівень активності MMP-2 у тканинах опікової рани щурів у групі ЦД на 3 добу дослідження складав $4,9\pm1,3$ AU, зростав на 7 добу ($p < 0,01$) та досягав максимального рівня $52,55\pm3,06$ AU на 14 добу ($p < 0,01$). На 21 добу активність досліджуваного ферменту зменшувалася на 8,5 AU ($p < 0,01$) відносно 14 доби.

На 3 добу дослідження у групі ЦД+Л активність MMP-2 у діабетичній рані становила $15,93\pm2,68$ AU і поступово зменшувалася ($p < 0,01$) до $5,67\pm2,67$ AU на 14 добу. Проте на 21 добу спостерігався другий пік ($p < 0,01$) активності досліджуваного ферменту – $33,64\pm4,1$ AU.

При порівнянні двох груп (ЦД та ЦД+Л) на 3 добу дослідження активність MMP-2 в тканинах опікової рани щурів у групі ЦД+Л утримувала ($p < 0,01$) показник у групі ЦД. Але вже з 7 доби активність MMP-2 у групі ЦД була вищою за показник групи ЦД+Т у півтора рази, а на 14 добу – в 10 разів ($p < 0,01$). На 21 добу дослідження рівень MMP-2 у групі ЦД залишався вищим ($p < 0,01$), ніж у групі ЦД+Т.

Висновки. Застосування фермент-вмісних наночастинок забезпечує ефективну деградацію гліказильованих компонентів позаклітинного матриксу, сприяючи тим самим зменшенню запального процесу, зниженню активності MMP-2 та сприяє загоєнню опікової рани у щурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом.

Ключові слова: цукровий діабет, хронічна рана, MMP-2, AGEs, наночастинки.

Актуальність. Хоча загальна поширеність синдрому діабетичної стопи у популяції складає лише 6,3%, він залишається серйозною медико-соціальною проблемою, адже кожні 30 секунд у світі виконують ампутацію нижньої кінцівки через ускладнення діабету [1].

Діабетична виразка характеризуються хронічним перебігом зі значним порушенням стадійності процесу загоєння та розвитком персистуючого запалення у рані [2]. Серед механізмів, що задіяні в постійній прозапальній активації імунних клітин у гіперглікемічному мікросередовищі, провідну роль відіграє порушений гомеостаз позаклітинного матриксу

(ПКМ), домінуючим компонентом якого у тканинах шкіри є волокна колагену. При цукровому діабеті спостерігається пригнічення продукування нативного колагену фібробластами шкіри, посилене його фрагментація під дією матриксних металопротеїназ (MMPs) та модифікація за рахунок неферментативного гліказильовання з утворенням так званих AGEs (advanced glycation end products) [3, 4]. Фрагментовані та гліказильовані волокна колагену здатні, у свою чергу, взаємодіяти з відповідними рецепторами на поверхні лейкоцитів та епітеліоцитів, обумовлюючи вивільнення прозапальних цитокінів та медіаторів,

що посилюють активність MMPs і замикають *circulus vitiosus* тривалого запального процесу в діабетичній рані [5]. Додатковим фактором, що гальмує швидке загоєння діабетичної виразки, є руйнування факторів росту під впливом агресивного ранового ексудату з підвищеною протеолітичною активністю [6].

Серед різних типів MMPs, важливе значення у реорганізації ПКМ під час ранового процесу мають желатинази (MMP-2 та MMP-9), які забезпечують деградацію не тільки волокон колагену IV, частково денатурованого колагену I, еластину, фібронектину, але й деяких факторів росту та їхніх рецепторів [7]. До того ж, було показано, що желатиназа A (MMP-2) бере участь у процесингу низки цитокінів, – зокрема, в утворенні активного інтерлейкіну-1 β (IL-1 β) з проінтерлейкіну-1 β шляхом обмеженого протеолізу [8]. У свою чергу, IL-1 β індукує синтез желатиназ фібробластами [9]. Таким чином, хронічний запальний процес у рані сприяє підвищенні активності MMP-2 та MMP-9, що було підтверджено як у дослідах на мишах, так і клінічними дослідженнями ранового ексудату пацієнтів з діабетичними виразками [10, 11]. Тому, на думку деяких авторів, рівень експресії MMP-2 у рані може слугувати надійним індикатором її здатності до загоєння [12].

За даними літератури, застосування селективних інгібіторів желатиназ (наприклад, композиції ND-336) хоч і пришвидшувало гоєння діабетичної виразки [13], але не усувало одну з головних причин хронічного запалення, якою є постійна прозапальна активація імунних клітин через накопичення AGEs у рані. Тому, на нашу думку, ефективна елімінація гліказильованих фрагментів ПКМ у рані може бути патогенетично обґрунтованим методом лікування діабетичних виразок. Проте слід враховувати, що гліказильовання колагену з утворенням патологічних поперечних зшивок між фібрилами суттєво зменшує його сприятливість до деградації під впливом MMPs [14]. Таким чином, попри підвищену протеолітичну активність, продукти гліказильовання ПКМ не можуть бути повністю розщеплені у діабетичній виразці та уповільнюють її загоєння сприяючи хронічному запальному процесу. Отже, наша гіпотеза полягає в тому, що застосування екзогенних гідролаз мікробного походження, здатних ефективно очистити діабетичну рану від AGEs, може сприяти її загоєнню.

Ціль: оцінити вплив екзогенних мікробних протеїназ на активність MMP-2 у динаміці загоєння діабетичної рані.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Лабораторні тварини

Дослідження вимагало використання лабораторних тварин, оскільки складний та багатокомпонентний процес загоєння рані неможливо відтворити на ізольованій культурі клітин. Було використано 48

щурів лінії Wistar. Тварини чоловічої статі, віком 6–7 міс., вагою 180–200 г, не мали зовнішніх ознак патології та були отримані з віварію Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Щури утримувалися в індивідуальних клітках, за температури 22 ± 2 °C, з доступом до води та їжі ad libitum. Вибір більш щурів у якості піддослідних тварин був економічно обґрунтованим та пов’язаним зі зручністю моделювання типових патологічних процесів у таких тварин. Усі маніпуляції із тваринами проводилися з дотриманням загальноприйнятих етичних принципів, відповідно до міжнародних рекомендацій (Директиви ЄС 2010/63/EU щодо захисту тварин, які використовуються з науковою метою) та національних регламентуючих норм щодо гуманного поводження із тваринами. Протокол експериментальної роботи було затверджено Комісією з біоетики НМУ імені О.О. Богомольця.

Моделювання діабетичної виразки

Для індукування цукрового діабету використовували загальноприйняті стрептозотоцинову (STZ) модель, коли тваринам одноразово вводили 50 мг/кг STZ (Sigma-Aldrich, USA) внутрішньочеревно. Розвиток діабету оцінювали за рівнем глюкози та глікозильованого гемоглобіну (HbA1c) у крові. Так, через чотири тижні після ін’єкції STZ, середні рівні глікемії та HbA1c складали $13,54\pm2,35$ ммоль/л та $8,5\pm1,6\%$, відповідно, і достовірно перевищували ($p < 0,05$) значення показників цих тварин до введення препарату ($4,45\pm1,38$ ммоль/л та $4,1\pm1,8\%$, відповідно).

Для моделювання рані у щурів з гіперглікемією та високим рівнем HbA1c використовували стандартну тваринну модель термічного опіку за Walker та Mason [15], з модифікаціями. Так, під постійною ефірною анестезією, до депільованої шкіри дорзальної поверхні тулуба тварин щільно прикладали мідні пластини, розміром $3,7\times4,5$ см, попередньо занурені в окріп на 10 хв. Тривалість контакту пластин зі шкірою складала 10 сек. Термічне ураження відповідало II-ІІІА ступеню опіку (за глибиною дефекту – дермальний опік), а його площа дорівнювала $0,0052$ м², що відповідало $19\pm1,6\%$ від загальної поверхні шкіри тварин, розрахованої за формулою Meeh [16]. Після нанесення опіку щури перебували під подовженою анестезією ефіром, також тваринам вводили 50 мл/кг розчину Рінгера внутрішньочеревно. Вибір термічного опіку в якості ранової моделі був обумовлений більшою стандартизацією ураження (порівняно з пошкодженням гострими предметами) та зручністю визначення площі дефекту шкіри в динаміці процесу загоєння.

Композит для загоєння рані

Для забезпечення очищення рані від некротичного детриту, а також з метою ефективної деградації модифікованих (гліказильованих) та фрагментованих компонентів ПКМ були використані поліспецифічні мікробні гідролази з комплексу Pronase (Sigma-

Aldrich, USA). Для обмеження агресивного впливу на неушкоджені тканини, зокрема на волокна нативного колагену, а також з метою аутокаталітичної інактивації, згадані ферменти були адсорбовані на нерозчинних гранулах з пористою структурою. У якості останніх були використані поліакрилові наночастинки Spheron 100 000 LC (Lachema, Czech Republic), розміром до 45 мкм. Фіксацію протеїназ на таких полімерних носіях проводили стандартним методом ковалентної іммобілізації [17]. У якості водорозчинної основи для отриманих наночастинок застосовували поліетиленгліколь, що забезпечував гідрофільні умови для оптимального функціонування мікробних ферментів. Запропонований композит для загоєння ран зареєстровано в Державному реєстрі патентів України на корисні моделі (№105500 від 25.03.16).

Обробка ран та забір матеріалу

Після відтворення діабетичної рані всіх щурів ($n=48$) було випадковим чином розподілено на дві групи по 24 тварини в кожній. Першу групу (ЦД+Л) складали щури, яким щоденно після промивання опікової рані фізіологічним розчином рівномірно наносили композит з описаними фермент-вмісними наночастинками. Другу групу (ЦД) складали діабетичні щури, яким щоденно обробляли ранову поверхню тільки фізіологічним розчином.

Тварин з обох груп виводили з експерименту шляхом внутрішньочеревного введення летальної дози тіопенталу натрію та наступної декапітації на 3, 7, 14 та 21 добу після нанесення опіку – по 6 тварин із групи в кожен із зазначених термінів, що відповідали загальноприйнятим уявленням про стадійність перебігу ранового процесу [18]. Ділянки шкіри з опіковою раною промивали фізіологічним розчином та вилучали гострим шляхом: матеріалом дослідження були прямокутні смужки розміром $1,5 \times 0,5$ см, що включали центральну частину рані та її край з дотичною нормальнюю тканиною шкіри. Отримані зразки зберігали в рідкому азоті до моменту дослідження.

Визначення активності MMP-2

Рівень активності матриксної металопротеїнази-2 визначали методом субстратної (желатинової) зімографії [19]. Так, фрагменти тканин опікової рані шкіри діабетичних щурів подрібнювали та розтирали в рідкому азоті. Гомогенати (по 200 мг) змішували з буфером для екстракції, піддавали ультразвуковій дезінтеграції та центрифугували, після чого надсадову рідину збирали та переносили до пластикових пробірок. Концентрацію загального протеїну вимірювали спектрофотометрично. Протеїнові екстракти змішували з буфером для нанесення на електрофорез. Електрофоретичне розділення протеїнових проб проводили за допомогою гель-електрофорезу у сополімері поліакриламіду та желатину (5 мг/мл) у трис-гліциновому буфері (рН 8,6), за напруги 70 В. Кількість загального протеїну складала 100 мкг/трек.

Після електрофорезу гель виймали та промивали. Колагенолітичну активність проявляли у developing-буфері (рН 7,4), після чого гель забарвлювали у розчині Кумассі R-250. Отримані зімограми сканували для проведення кількісного денситометричного аналізу з використанням програмного забезпечення TL-120 (TotalLab Ltd., США). Відносну активність MMP-2 виражали в умовних одиницях оптичної густини (arbitrary units, AU).

Статистичний аналіз

Усі показники були представлени у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення (SD). Пере-вірку даних на нормальност проводили за допомогою критерію Шапіро-Уілка. За умов нормального закону розподілу показників статистичну відмінність між двома незалежними групами (ЦД та ЦД+Л) у різni терміни дослідження перевіряли за допомогою критерію Стьюдента, а для оцінки динаміки показників всередині кожної групи (на 3, 7, 14 та 21 добу дослідження) використовували дисперсійний аналіз із застосуванням критерію Шеффе. Усі розрахунки проводили у програмному пакеті SPSS software (IBM SPSS Statistics Base, v.22). Статистично значуща відмінність між показниками була встановлена на рівні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Динаміка активності MMP-2 у групі ЦД

Рівень активності желатиназ А у тканинах опікової рані щурів у групі ЦД на 3 добу дослідження складав $4,9 \pm 1,3$ AU, а вже на 7 добу зростав у 3,6 рази ($p < 0,01$), сягаючи $17,82 \pm 1,74$ AU. На 14 добу процесу загоєння активність MMP-2 була максимальною за весь час спостереження ($52,55 \pm 3,06$ AU), перевищуючи в 10 та 3 рази ($p < 0,01$) показники 3 та 7 доби, відповідно. На 21 добу активність досліджуваного ферменту зменшувалася на 8,5 AU ($p < 0,01$) відносно 14 доби, але все одно залишалася вищою ($p < 0,01$) за попередні терміни спостереження. Виявлено динаміка (рис. 1) відповідає попереднім дослідженням на миших, що показали низький рівень про-MMP-2 у діабетичній рані на ранніх стадіях процесу загоєння [20]. Подальше зростання активності MMP-2 у рані підтверджується дослідженнями й у людей. При цьому була виявлено пряма залежність між високим рівнем глюкози у крові та активністю MMP-2 у тканинах діабетичної виразки та ранового ексудату [21].

Поясненням виявленої динаміки активності MMP-2 у рані діабетичних щурів може бути той факт, що в умовах хронічної гіперглікемії порушуються проліферація та міграція фібробластів та кератиноцитів, тому цих клітин дуже мало в рані й вони не можуть бути джерелом желатиназ, хоча, за даними Wall et al. продуктування MMPs фібробластами неушкодженої шкіри при цукровому діабеті значно збільшено [22]. Проте ми вважаємо, що значне зростання активності MMP-2 у діабетичній рані опосередковано накопи-

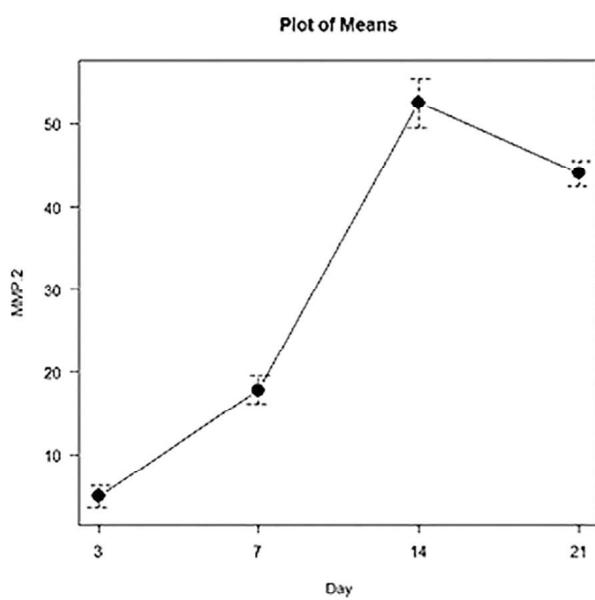


Рис. 1. Динаміка активності MMP-2 у тканинах опікової рани шкіри щурів із модельованим цукровим діабетом (група ЦД) на 3, 7, 14 та 21 добу після нанесення опіку, в умовних одиницях (AU)

ченням та прозапальною активацією макрофагів/моноцитів. Це обумовлює розвиток хронічного запалення зі збільшеним рівнем таких цитокінів, як IL-1 β та фактор некрозу пухлин- α , які, в свою чергу, стимулюють синтез MMP-2 [9, 23].

Динаміка активності MMP-2 у групі ЦД+Л

На 3 добу дослідження у групі ЦД+Л активність MMP-2 у діабетичній рані становила $15,93 \pm 2,68$ AU і поступово зменшувалася ($p < 0,05$) до $10,63 \pm 1,75$ та $5,67 \pm 2,67$ AU на 7 та 14 добу, відповідно. Проте

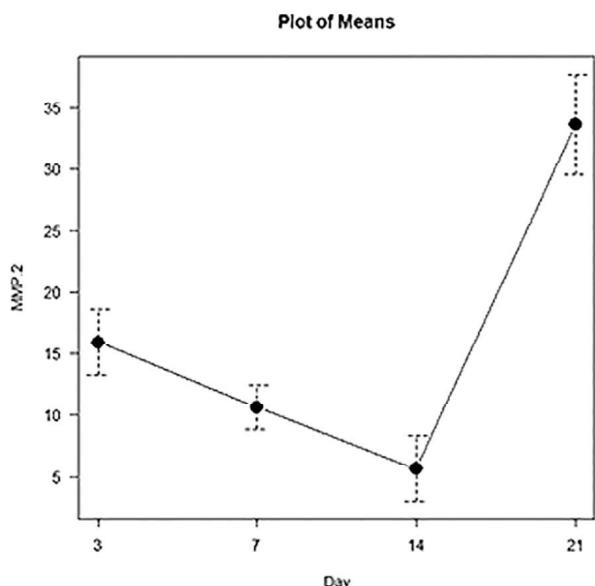


Рис. 2. Динаміка активності MMP-2 у тканинах опікової рани шкіри щурів із модельованим цукровим діабетом під впливом фермент-вмісних наночастинок (група ЦД+Л) на 3, 7, 14 та 21 добу спостереження, в умовних одиницях (AU)

на 21 добу спостерігався другий пік активності досліджуваного ферменту ($33,64 \pm 4,1$ AU), що вдвічі перевищував ($p < 0,01$) показник 3 доби і в 6 разів ($p < 0,01$) – значення 14 доби (рис. 2). Ми припускаємо, що низхідний тренд динаміки желатинази A від 3 до 14 доби спостереження є свідченням протизапального ефекту фермент-вмісних наночастинок на процес гоєння опікової рани. А збільшення активності ферменту на 21 добу може результатом його продукування кератиноцитами під час ре-епіталізації та ендотеліоцитами під час неоангіогенезу, що посилюються внаслідок вщухання запального процесу в рані через зменшення вмісту AGEs.

Порівняння активності MMP-2 між групами ЦД та ЦД+Т

На рисунку 3 та рисунку 4 представлені репрезентативні зимограми, що характеризують вплив фермент-вмісних наночастинок на активність MMP-2 в опіковій рані діабетичних щурів на 3, 7 та 14, 21 добу, відповідно.

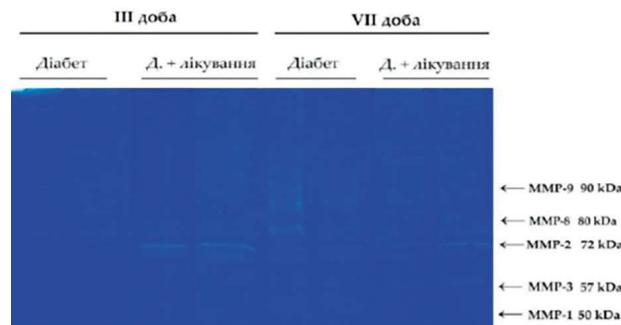


Рис. 3. Репрезентативна зимограма активності матриксних металопротеїназ у тканинах опікової рани щурів з цукровим діабетом (група ЦД) та під впливом фермент-вмісних наночастинок (група ЦД+Л) на 3 та 7 добу дослідження

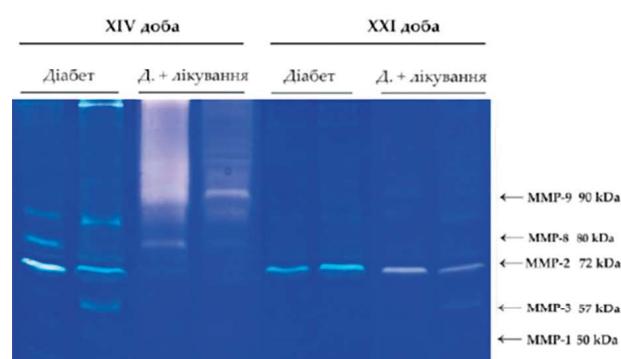


Рис. 4. Репрезентативна зимограма активності матриксних металопротеїназ у тканинах опікової рани щурів з цукровим діабетом (група ЦД) та під впливом фермент-вмісних наночастинок (група ЦД+Л) на 14 та 21 добу дослідження

На 3 добу дослідження активність желатинази A в тканинах опікової рани щурів у групі ЦД+Л утримувала ($p < 0,01$) показник у групі ЦД (рис. 5). Ми вважаємо, що такий високий рівень активності MMP-2 у групі ЦД+Т можна пояснити нашаруванням у часі пришвидшеної

міграції макрофагів та початку ре-епітелізації, тоді як у групі ЦД функція кератиноцитів залишається пригніченою, а в рані ще перебуває «перша лінія» клітин-емігрантів – нейтрофіли. Але вже з 7 доби активність MMP-2 у групі ЦД перевищує показник групи ЦД+Т у півтора рази, а на 14 добу – в 10 разів ($p < 0,01$). Ми припускаємо, що таке суттєве зменшення колагенолітичної активності в тканинах рані під впливом мікробних протеїназ, фіксованих на наночастинках, є наслідком ефективної елімінації деградованих та гліказильованих фрагментів ПКМ. Так, зменшення активації рецепторів до AGEs (RAGEs) на поверхні макрофагів у діабетичній рані сприяє їхньому репрограмуванню в M2-фенотип, що сприяє завершенню запалення. Зменшення AGE-RAGE сигналінгу у фібробластах посилює їхню проліферацію та синтез колагену, що забезпечує формування грануляційної тканини. У свою чергу, безпосереднім наслідком зменшення активності MMP-2 у рані є пригнічення апоптозу ендотеліоцитів та посилення їхньої здатності до міграції, що є вкрай важливим під час неоваскуляризації.

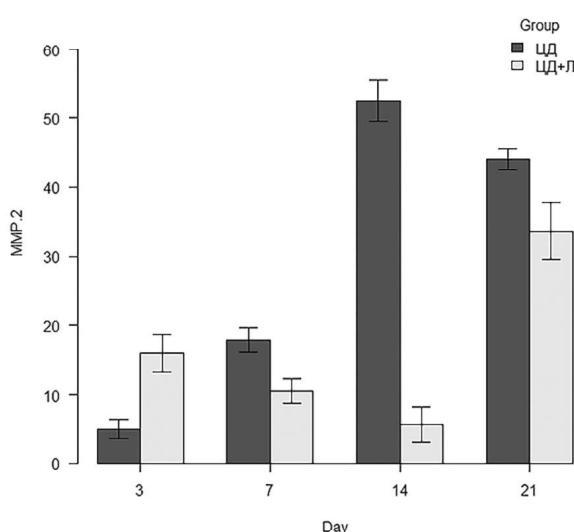


Рис. 5. Порівняльна характеристика активності MMP-2 у тканинах опікової рані шурів із модельованим цукровим діабетом (група ЦД) та тканинах діабетичної рані під впливом фермент-вмісних наночастинок (група ЦД+Л) у різні періоди спостереження

Попри спільну тенденцію до підвищення активності MMP-2 в обох групах на 21 добу дослідження, рівень MMP-2 у групі ЦД залишився вищим ($p < 0,01$), ніж у групі ЦД+Т, оскільки джерелом цього ферменту в першому випадку були прозапальні макрофаги, тоді як у групі ЦД+Л – фібробласти, задіяні у активному формуванні грануляційної тканини [25].

ВИСНОВКИ

Желатинази задіяні в усіх стадіях загоєння рані. При хронічній гіперглікемії у рані порушується утворення колагенового каркасу, що є провізорним ПКМ, необхідним для активної міграції ендотеліоцитів та кератиноцитів, натомість, накопичуються AGEs, які є стійкими до MMP-залежної деградації, підсилюють прозапальну активацію лейкоцитів та пригнічують проліферацію фібробластів. Застосування фермент-вмісних наночастинок забезпечує ефективну деградацію гліказильованих компонентів ПКМ, сприяючи тим самим зменшенню запального процесу, зниженню активності MMP-2 та загоєнню опікової рані у шурів із стрептозотоцин-індукованим діабетом.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють, що не мають конфлікту інтересів.

Джерело фінансування. Дослідження було профінансовано Міністерством охорони здоров'я України, грант № 0119U101219.

REFERENCES

- Zhang P, Lu J, Jing Y, Tang S, Zhu D, Bi Y. Global epidemiology of diabetic foot ulceration: a systematic review and meta-analysis. *Annals of medicine*. 2017;49(2):106-116. DOI: 10.1080/07853890.2016.1231932
View at: Publisher Site: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/07853890.2016.1231932>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27585063/>
- Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Landthaler M, Babilas P. Wound healing in the 21st century. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2010;63(5):866-881. DOI: 10.1016/j.jaad.2009.10.048
View at: Publisher Site: [https://www.jaad.org/article/S0190-9622\(09\)01499-6/fulltext](https://www.jaad.org/article/S0190-9622(09)01499-6/fulltext)
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20576319/>
- Black E, Vibe-Petersen J, Jorgensen LN, Madsen SM, Agren MS, Holstein PE, Perrild H, Gottrup F. Decrease of collagen deposition in wound repair in type 1 diabetes independent of glycemic control. *Archives of surgery*. 2003;138(1):34-40. DOI: 10.1001/archsurg.138.1.34
View at: Publisher Site: <https://jamanetwork.com/journals/jamasurgery/fullarticle/394022>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12511146/>
- Liao H, Zakhaleva J, Chen W. Cells and tissue interactions with glycated collagen and their relevance to delayed diabetic wound healing. *Biomaterials*. 2009;30(9):1689-1696. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2008.11.038
View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0142961208009113?via%3Dihub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19157537/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2668700/>
- Peppa M, Stavroulakis P, Raptis SA. Advanced glycation products and impaired diabetic wound heal-

- ing. Wound Repair and Regeneration. 2009;17(4):461-472. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2009.00518.x
View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1524-475X.2009.00518.x>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19614910/>
6. McCarty SM, Percival SL. Proteases and delayed wound healing. Advances in wound care. 2013;2(8):438-447. DOI: 10.1089/wound.2012.0370
View at: Publisher Site: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/wound.2012.0370>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24688830/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3842891/>
7. Vargová V, Pytlík M, Mechírová V. Matrix Metalloproteinases. In: Gupta S. (eds) Matrix Metalloproteinase Inhibitors. Experientia Supplementum, 2012;103:1-33. Springer, Basel. DOI: 10.1007/978-3-0348-0364-9_1
View at: Scopus: https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-0348-0364-9_1
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22642188/>
8. Yanhan R, Guosheng G, Min Y, Driver VR. Role of matrix metalloproteinases in chronic wound healing: diagnostic and therapeutic implications. Chinese Medical Journal. 2014;127(8):1572-1581. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20131179
View at: PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24762608/>
9. Dai J, Shen J, Chai Y, Chen H. IL-1 β Impaired Diabetic Wound Healing by Regulating MMP-2 and MMP-9 through the p38 Pathway. Mediators of Inflammation. 2021: article ID 6645766. DOI: 10.1155/2021/6645766
View at: Publisher Site: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2021/6645766/>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34054346/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8149221/>
10. Neely AN, Clendening CE, Gardner J, Greenhalgh DG. Gelatinase Activities in Wounds of Healing-Impaired Mice Versus Wounds of Non-Healing-Impaired Mice. Journal of Burn Care & Rehabilitation. 2000;21(5):395-402. DOI: 10.1097/00004630-200021050-00001
View at: Publisher Site: <https://academic.oup.com/jbcr>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11020045/>
11. Lazaro JL, Izzo V, Meaume S, Davies AH, Lohmann R, Uccioli L. Elevated levels of matrix metalloproteinases and chronic wound healing: an updated review of clinical evidence. Journal of Wound Care. 2016;25(5):277-287. DOI: 10.12968/jowc.2016.25.5.277
View at: Publisher Site: <https://www.magonlinelibrary.com/doi/abs/10.12968/jowc.2016.25.5.277>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27169343/>
12. Karim RB, Brito BL, Dutrieux RP, Lassance FP, Hage JJ. MMP-2 assessment as an indicator of wound healing: a feasibility study. Advances in skin & wound care. 2006;19(6), 324-327. DOI: 10.1097/00129334-200607000-00011.
- View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/aswc-journal/Fulltext/2006/07000/MMP_2_Assessment_as_an_Indicator_of_Wound_Healing_.11.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16885646/>
13. Gao M, Nguyen TT, Suckow MA, Wolter WR, Gooyit M, Mobashery S, Chang M. Acceleration of diabetic wound healing using a novel protease-anti-protease combination therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015;112(49):15226-15231. DOI: 10.1073/pnas.1517847112
View at: Publisher Site: <https://www.pnas.org/content/112/49/15226>
14. Panwar P, Butler GS, Jamroz A, Azizi P, Overall CM, Brömmme D. Aging-associated modifications of collagen affect its degradation by matrix metalloproteinases. Matrix Biology. 2018;65:30-44. DOI: 10.1016/j.matbio.2017.06.004
View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0945053X17301300?via%3Dhub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28634008/>
15. Walker HL, Mason AD. A standard animal burn. The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. 1968;8(6):1049-1051. DOI: 10.1097/00005373-196811000-00006
View at: Publisher Site: https://journals.lww.com/jtrauma/Citation/1968/11000/A_STANDARD_ANIMAL_BURN.6.aspx
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5722120/>
16. Gilpin DA. Calculation of a new Meeh constant and experimental determination of burn size. Burns. 1996;22(8):607-611. DOI: 10.1016/S0305-4179(96)00064-2
View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0305417996000642?via%3Dhub>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8982538/>
17. Zucca P, Sanjust E. Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms. Molecules. 2014;19(9):14139-14194. DOI: 10.3390/molecules190914139
View at: Publisher Site: <https://www.mdpi.com/1420-3049/19/9/14139>
PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25207718/>
PubMed Central: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6272024/>
18. Enoch S, Leaper DJ. Basic science of wound healing. Surgery (Oxford). 2008;26(2):31-37. DOI: 10.1016/j.mpsur.2007.11.005
View at: Scopus: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S026393190700316X>
Publisher Site: <https://www.surgeryjournal.co.uk/article/S0263-9319%2807%2900316-X/abstract%3Fcc%3Dy%3D>
19. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. Biotechniques. 2005;38(1):73-83. DOI: 10.2144/05381RV01

- View at: Publisher Site: <https://www.future-science.com/doi/10.2144/05381RV01>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15679089/>
20. Lioupis C. Effects of diabetes mellitus on wound healing: an update. *Journal of Wound Care.* 2005;14(2):84-86. DOI: 10.12968/jowc.2005.14.2.26738
 View at: Publisher Site: <https://www.magonlinelibrary.com/doi/abs/10.12968/jowc.2005.14.2.26738>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15739657/>
21. Blakytny R, Jude E. The molecular biology of chronic wounds and delayed healing in diabetes. *Diabetic Medicine.* 2006;23(6):594-608. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2006.01773.x
 View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1464-5491.2006.01773.x>
22. Wall SJ, Sampson MJ, Levell N, Murphy G. Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts. *British Journal of Dermatology.* 2003;149(1):13-16. DOI: 10.1046/j.1365-2133.2003.05262.x
 View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1365-2133.2003.05262.x>
23. Arenas IA, Xu Y, Lopez-Jaramillo P, Davidge ST. Angiotensin II-induced MMP-2 release from endothelial cells is mediated by TNF- α . *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2004;286(4): 779-784. DOI: 10.1152/ajpcell.00398.2003
 View at: Publisher Site: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00398.2003>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14644777/>
24. Shapiro S, Khodalev O, Bitterman H, Auslender R, Lahat N. Different activation forms of MMP-2 oppositely affect the fate of endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology.* 2009;298(4):942-951. DOI: 10.1152/ajpcell.00305.2009
 View at: Publisher Site: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00305.2009>
 PubMed: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20071690/>
25. Tardáguila-García A, García-Morales E, García-Alamino JM, et al. Metalloproteinases in chronic and acute wounds: A systematic review and meta-analysis. *Wound Repair and Regeneration.* 2019;27(4):415-420. DOI: 10.1111/wrr.12717
 View at: Publisher Site: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/wrr.12717>

Article history

Received: 01.06.2021

Revision requested: 12.06.2021

Revision received: 19.06.2021

Accepted: 24.06.2021

Published: 30.06.2021

ВЛИЯНИЕ ФЕРМЕНТ-СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИМЕРНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА АКТИВНОСТЬ MMP-2 ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ ОЖГОГОВОЙ РАНЫ У КРЫС СО СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫМ ДИАБЕТОМ

Мироненко О.И., Панова Т.І., Натрус Л.В., Вер'ювка С.В.

Національний медичинський університет імені А.А. Богомольця, Київ, Україна

om.ua.md@gmail.com

Актуальність. Синдром диабетической стопы является распространенным осложнением, которое характеризуется развитием хронических язв. Среди механизмов нарушения заживления диабетической раны ведущую роль играет нарушение гомеостаза внеклеточного матрикса: хроническая гипергликемия, с одной стороны, способствует образованию так называемых advanced glycation end products (AGEs), опосредующих провоспалительную активацию иммунных клеток, а с другой стороны, подавляет пролиферацию и синтетическую функцию фибробластов, нарушает миграцию кератиноцитов и эндотелиоцитов. Поэтому элиминация AGEs является патогенетически обоснованным методом лечения хронических язв при сахарном диабете. С этой целью был разработан композит, состоящий из полиспецифичных микробных протеаз, фиксированных на полимерных пористых наночастицах. Прогностическим индикатором заживления хронической раны была выбрана активность матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2).

Цель: изучить активность MMP-2 в тканях ожоговой раны крыс с сахарным диабетом под влиянием фермент-содержащих наночастиц.

Материалы и методы. В опыте было использовано n=48 крыс линии Wistar. Сахарный диабет был индуцирован введением 50 мг/кг стрептозотоцина. Для моделирования раны у крыс использовали стандартную животную модель термического ожога по Walker и Mason, с модификациями. Термическое поражение соответствовало II-IIIА степени ожога и составляло 19 ± 1,6% от общей площади кожи животных. Крысы были разделены на две группы по 24 животных в каждой: группа СД не получала лечения, а крысам из группы СД+Л ежедневно на ожоговую рану наносили композит с фермент-содержащими наночастицами. Животных выводили из эксперимента на 3, 7, 14 и 21 сутки наблюдения. Активность MMP-2 в тканях ожоговой раны диабетических крыс исследовали методом желатиновой зимографии, выражали в условных единицах (AU). Статистическую обработку данных выполняли в программном пакете SPSS Statistics Base v.22 с помощью критерия Стьюдента для парных сравнений и критерия Шеффе - для множественных сравнений.

Результаты. Уровень активности MMP-2 в тканях ожоговой раны крыс в группе СД на 3 сутки исследования составлял $4,9 \pm 1,3$ AU, увеличивался на 7 сутки ($p < 0,01$) и достигал максимального уровня ($52,55 \pm 3,06$ AU) на 14 сутки ($p < 0,01$). На 21 сутки активность исследуемого фермента уменьшалась на 8,5 AU ($p < 0,01$) относительно 14 суток.

На 3 сутки исследования в группе СД+Л активность MMP-2 составила $15,93 \pm 2,68$ AU и постепенно уменьшалась ($p < 0,01$) до $5,67 \pm 2,67$ AU на 14 сутки. Однако на 21 сутки наблюдался второй пик ($p < 0,01$) активности исследуемого фермента ($33,64 \pm 4,1$ AU).

При сравнении двух групп (СД и СД+Л) на 3 сутки исследования активность MMP-2 в тканях ожоговой раны крыс в группе СД+Л втрое превышала ($p < 0,01$) показатель в группе СД. Но уже с 7 суток активность MMP-2 в группе СД была выше показателя группы СД+Л в полтора раза, а на 14 сутки - в 10 раз ($p < 0,01$). На 21 сутки исследования уровень MMP-2 в группе СД оставался выше ($p < 0,01$), чем в группе СД+Л.

Выводы. Применение фермент-содержащих наночастиц обеспечивает эффективную деградацию гликозилированных компонентов внеклеточного матрикса, способствуя тем самым уменьшению воспалительного процесса, снижению активности MMP-2, и способствует заживлению ожоговой раны у крыс со стрептозотоцин-индуцированным диабетом.

Ключевые слова: сахарный диабет, хроническая рана, MMP-2, AGEs, наночастицы.

EFFECT OF THE ENZYME-CONTAINING POLYMERIC NANOPARTICLES ON MMP-2 ACTIVITY DURING BURN WOUND HEALING IN RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

Myronenko O.I., Panova T.I., Natrus L.V., Verevka S.V.

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

om.ua.md@gmail.com

Relevance. Diabetic foot syndrome is a common complication that is characterized by the development of chronic ulcers. Among the mechanisms of impaired wound healing, the leading role is played by disturbance of extracellular matrix homeostasis: chronic hyperglycemia, on the one hand, promotes the formation of so-called advanced glycation end products (AGEs), which mediate pro-inflammatory activation of immune cells, and on the other hand, inhibits fibroblasts proliferation and collagen production, disrupts the migration of keratinocytes and endothelial cells. Therefore, the elimination of AGEs is a pathogenetic approach in diabetic wound treatment. For this purpose, a composite consisting of polyspecific microbial proteinases fixed on polymeric porous nanoparticles was developed. The activity of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) was chosen as a prognostic indicator of chronic wound healing.

Objective: to study the activity of MMP-2 in the tissues of the burn wound of rats with simulated diabetes mellitus under the influence of enzyme-containing nanoparticles.

Materials and methods. N = 48 Wistar rats were used in the experiment. Diabetes mellitus was induced by administration of 50 mg/kg of streptozotocin. To model the wound in rats, a standard animal model of thermal burns by Walker and Mason was used. Thermal damage corresponded to the II-IIIA degree of burns, and occupied $19 \pm 1.6\%$ of the total area of animal skin. Rats were divided into two groups of 24 animals each: the DM group did not receive any treatment, and rats from the DM+T group were daily applied to the burn wound with the mentioned composite (enzyme-containing nanoparticles). Animals were removed from the experiment on days 3, 7, 14 and 21 of observation. The activity of MMP-2 in the tissues of the burn wound of diabetic rats was studied by gelatin zymography, expressed in arbitrary units (AU). Statistical data processing was performed in the software package SPSS Statistics Base, v.22 with Student and Scheffe tests.

Results. The level of activity of MMP-2 in the tissues of the burn wound of rats in the DM group on the 3rd day of the study was 4.9 ± 1.3 AU, increased by 7 days ($p < 0.01$) and reached a maximum level of 52.55 ± 3.06 AU at day 14 ($p < 0.01$). On day 21, the activity of the test enzyme decreased by 8.5 AU ($p < 0.01$), compared to day 14.

On day 3 of the study in the DM+T group, the activity of MMP-2 in the diabetic wound was 15.93 ± 2.68 AU and gradually decreased ($p < 0.01$) to 5.67 ± 2.67 AU on day 14. However, on day 21, the second peak ($p < 0.01$) of the activity of the studied enzyme was observed - 33.64 ± 4.1 AU.

When comparing the two groups (DM and DM+T) on day 3 of the study, the activity of MMP-2 in the tissues of the burn wound of rats in the DM+T group was three times higher ($p < 0.01$) than in the DM group. But from the 7th day the activity of MMP-2 in the DM group was higher than the DM+T group. On day 21 of the study, the level of MMP-2 in the DM group remained higher ($p < 0.01$) than in the DM+T group.

Conclusions. The use of enzyme-containing nanoparticles provides effective degradation of glycosylated components of the extracellular matrix (AGEs), thereby reducing the inflammatory process and activity of MMP-2, and promoting wound healing in rats with streptozotocin-induced diabetes.

Key words: diabetes mellitus, chronic wound, MMP-2, AGEs, nanoparticles.