

І.А. СРЕБНЯК

АКТИВНІСТЬ ПРОТЕЇНАЗ В ЕКСУДАТІ З СЕРЕДНЬОГО ВУХА І ХОЛЕСТЕАТОМНОМУ МАТРИКСІ ДО ТА ПІСЛЯ КОМПЛЕКСНОГО ЛІКУВАННЯ

*ДУ «Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка НАМН України»
(дир. – академік НАМН України, проф. Д.І. Заболотний)*

Характерними ознаками холестеатоми середнього вуха є наявність запалення, проліферація кератиноцитів, апоптоз, активний ангиогенез, особливо при більш агресивній, інвазивній формі холестеатоми, і резорбція кісткових структур. Існує декілька теорій деструкції прилеглої до холестеатомного матриксу кістки: механічна теорія деградації кісткових структур під дією холестеатоми, специфічної імунної відповіді прилеглої грануляційної тканини та ензиматичного остеолізу, котра має найбільше прихильників. Підтвердженням цієї теорії є дані зарубіжних авторів щодо значного зростання активності гідролаз, катепсину L і K, лізосомальних екзопептидаз, каспаз 3 та 8 в ексудаті і холестеатомі у хворих на ХГСО [3].

В попередніх роботах нами було виявлено, що як в ексудаті, так і в холестеатомному матриксі та оточуючих його перифокальних структурах суттєво підвищена активність фосфомоноестераз, трипсиноподібних протеїназ, активатора протеїназ урокіназного типу, катепсину В – ферментів, які здатні руйнувати основний білок кісткової тканини – колаген [1, 2]. Ці дані були передумовою для застосування при лікуванні хворих на хронічний гнійний середній отит (ХГСО) з холестеатомою природних інгібіторів протеїназ, зокрема апротиніну, якому притаманна інактивуюча дія по відношенню до трипсиноподібних протеолітичних ферментів.

Мета даної роботи – обґрунтувати можливість використання поліфункціонального інгібітора протеїназ в комплексному лікуванні хворих на ХГСО з холестеатомою

і оцінити його ефективність за допомогою біохімічних тестів визначення активності калікреїну та еластази.

Результати біохімічних досліджень отримано на клінічному матеріалі у 61 хворого на ХГСО з холестеатомою, з них у 17 була діагностована інвазивна форма холестеатоми, у 44 – інкапсульована.

Об'єктом дослідження були ексудат і гомогенати тканин, які ми отримували з холестеатомного матриксу, слизової оболонки антро-мастоїдальної порожнини і прилеглих кісткових структур середнього вуха у обстежуваних пацієнтів. Тканини подрібнювались ножицями у порцеляновій ступці, додавався 0,9% розчин NaCl з 0,25% розчином тритону X-100 у співвідношенні 1:9 (тканини/розчинник), розтирались до однорідної маси і витримувались при температурі -10-15°C протягом 16 год. Після танення при температурі 37°C суміш центрифугувалася протягом 15 хв при швидкості обертання 5 000 об/хв. Одержані надосадкові рідини гомогенатів тканин використовувались як джерело еластази та калікреїну. Їх активність визначалась спектрофотометричним методом за швидкістю розщеплення хромогенного субстрату – Suc-Ala₃-пара-нітроаніліду для еластази, N-D-Val-Ley-Arg-пара-нітроаніліду для калікреїну і виражалась в нмоль пара-нітроаніліну (п-НА), який вивільнявся із субстратів під дією 1мг білка ексудату і тканин за 1 год. Інактивуюча дія апротиніну – поліфункціонального інгібітора протеїназ (ПФП) оцінювалась за ступенем гальмування ним активності протеїназ ексудату, холестеатомного матриксу, кіст-

кової тканини і слизової оболонки в дослід-
дах *in vitro*. Вони проводились наступним
чином. У дослідні проби вносилося по 0,1
мл ексудату або гомогенату тканин, додава-
лась 0,1 мл аprotиніну (25-100 АТрО), і во-
ни витримувались 15 хв при температурі 20-
22°C, об'єм проб доводився до 1,8 мл 0,1
моль трис буфером при рН=8,1, після цього
вносилась 0,1 мл субстрату. Проби залиша-
лись для інкубації протягом 4 годин при те-
мпературі 37°C, і реакція зупинялась дода-
ванням 0,1 мл льодової оцтової кислоти.
Після центрифугування проб при обертовій
частоті 6 000 об/хв в надосадовій рідині ви-
значалась оптична густина на СФ-26. Вияв-
лялась активність ферментів за калібруваль-
ним графіком. За 100 % приймалась повна
інактивація ферментів.

Результати дослідження впливу різних
концентрацій поліфункціонального інгібі-
тора на активність калікреїну з ексудату,
холестеатоми та прилеглих перифокальних
структур середнього вуха у хворих на
ХГСО наведено на рисунках 1, 2.

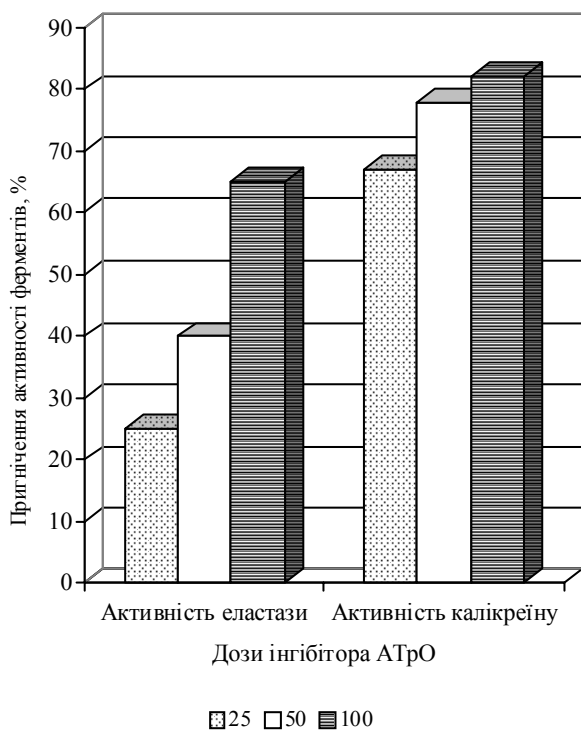


Рис. 1. Вплив аprotиніну на активність еластази і калікреїну ексудату з середнього вуха у хворих на ХГСО з холестеатомою.

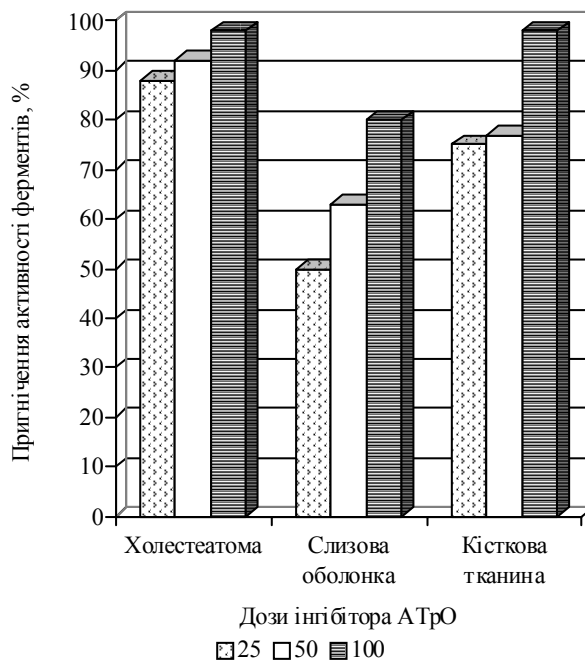


Рис. 2. Вплив аprotиніну на активність калікреїну з холестеатоми і перифокальних структур середнього вуха у хворих на ХГСО з холестеатомою.

Згідно з одержаними результатами (рис. 1), спостерігається дозозалежне гальмування інгібітором активності калікреїну і еластази в ексудаті у обстежуваних хворих, причому воно було більш вираженим по відношенню до калікреїну: 100 АТрО інактивував його на 82%, а еластазу – на 65%.

Найбільше пригнічення активності калікреїну з холестеатоми і кісткової тканини відмічалось під впливом 100 АТрО, воно становило, відповідно, 96 і 98%. Калікреїн слизової оболонки в присутності 100 АТрО інактивувався на 80%. Одержані результати слугували основою для включення ППФ у комплексне лікування хворих на ХГСО з холестеатомою.

В залежності від клінічних симптомів перебігу холестеатомного процесу і активності протеїнази пацієнти були розподілені на 3 групи, в яких вони лікувались комплексно за різними розробленими нами схемами комплексної терапії. В 1-у групу увійшло 19 осіб, у 18 з яких була діагностована інкапсульована холестеатома і у 1 – інвазивна форма холестеатоми. В комплексне ліку-

вання цих хворих входило хірургічне втручання для видалення холестеатоми як основний його етап і наступні місцеві аплікації апротиніну в дозі 20 000 АТрО об'ємом 2 мл. До 2-ї групи віднесено 27 обстежуваних, з них у 22 була інкапсульована, а у 5 – інвазивна форма холестеатоми. Лікування в цій групі здійснювалось за допомогою хірургічного втручання з наступними локальними введеннями розчину апротиніну в такій же дозі, як у 1-й групі, та вливанням через дренажні трубки по 1 мл інгібітора (10 000 АТрО) щоденно протягом 7-10 діб. До 3-ї групи включено 11 пацієнтів з інвазивною холестеатою і 3 – з інкапсульованою формою холестеатоми. У них застосовувалась схема II з паралельним внутрішньом'язовим введенням інтерферону (або лаферону) протягом 7 діб в дозі 300 000 ОД.

Ефективність терапії оцінювалась шляхом визначення активності досліджуваних протеїназ в ексудатах до і в різні строки після комплексного лікування хворих.

Визначено, що в 1-й групі, в основному у пацієнтів з інкапсульованою формою холестеатоми, у яких спостерігалась

невелика ензиматична активність протеїназ в ексудаті, холестеатомному матриксі та в прилеглий до нього кістковій тканині до лікування, рецидивів холестеатоми не виявлено як в найближчий, так і у віддалений період після комплексної терапії з використанням локальних аплікацій інгібітора. Про це свідчили як результати клінічних досліджень, так і відсутність патологічного ексудату з прооперованого вуха та нульові значення біохімічних показників в змивах зі слизової оболонки середнього вуха хворих.

У 2-й групі рецидиви виникали в різні строки (6-12 міс) у 3 обстежуваних з інвазивною і у 2 з інкапсульованою формою холестеатоми. В 3-й групі з 14 осіб у 5 рецидив холестеатоми виник також через 6-12 міс після комплексного лікування. У віддаленому періоді (через 18-24 міс) рецидив неактивної холестеатоми у вигляді холестеатомної перлини мав місце у 3 пацієнтів (у 2 з 2-ї групи і у 1 – з 3-ї групи). Результати вивчення активності калікреїну і еластази в ексудаті у хворих на ХГСО з холестеатою до та після лікування представлено в табл. 1.

Таблиця 1

Активність калікреїну і еластази в ексудаті у хворих на ХГСО з холестеатою до та у віддаленому періоді після лікування

Схеми лікування	Активність калікреїну, нмоль n-НА/(год•мг білка)		Активність еластази, нмоль n-НА/(год•мг білка)	
	M±m			
	до лікування	через 6-12 міс після лікування	до лікування	через 6-12 міс після лікування
II схема	137,0±74	54,0±26,0	53,0±10,0	19,0±8,0 p<0,05
III схема	103,0±18	4,7±1,9 p<0,01	32,0±8,0	0 p<0,01

Як видно з табл. 1, через 6-12 міс після проведеної комплексної терапії активність як калікреїну, так і еластази значно зменшувалася, особливо в ексудаті у пацієнтів, у яких застосовувалась III схема лікування. Ці результати можна проілюструвати і на прикладі окремих хворих (рис. 3-5).

У хворого М. (рис. 3) через 7 міс після хірургічного видалення холестеатоми і комплексної терапії за II схемою виник реци-

див. Дослідження активності калікреїна та еластази в ексудаті показало, що активність першої протеїнази знизилась у 1,4 рази, а активність еластази досягла нульового значення порівняно з такою до лікування. Через 12 міс активність калікреїна в ексудаті була меншою, ніж вихідна, у 8 разів, а через 24 міс вона дорівнювала нулю. Клінічне обстеження підтвердило відсутність рецидивування.

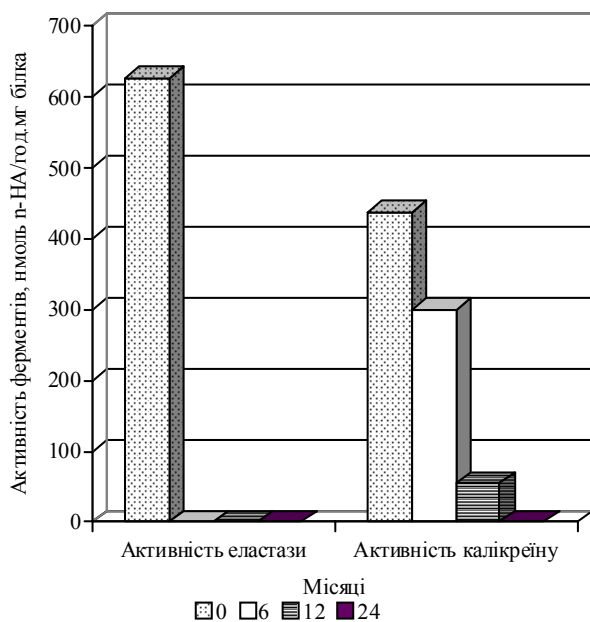


Рис. 3. Активність калікреїну і еластази в ексудаті у хворого М. до і в різні строки після лікування за схемою II.

У хворій Г. (рис. 4, 5) через 12 міс після комплексного лікування за схемою II виявлена локальна рецидивна холестеатома в ділянці вестибулярного вікна та ретротимпануму. Оточуюча кісткова тканина та слизова оболонка барабанної порожнини були на вигляд неушкодженими. Проведені біохімічні дослідження дозволили виявити падіння активності калікреїну як у вторинній резидуальній холестеатомі, так і в кістковій тканині та ексудаті з барабанної порожнини, відповідно, у 2,8; 2,2 і 3,6 разів порівняно з даними до лікування. Через 24 міс досліджувані показники в ексудаті дорівнювали нулю, що свідчило про відсутність подальшого рецидивування.

На рис. 6 наведено результати вивчення активності протеїнази в первинній холестеатомі та вторинній рецидивній, а також в ексудаті у хворого К. Рецидив холестеатоми через 6 міс після проведеної комплексної терапії за схемою III. Як у матриксі вторинної холестеатоми, так і в ексудаті активність калікреїна була нижчою, ніж до комплексного лікування, відповідно, в 11 і 32 рази. Активність еластази також значно знижувалась в ексудаті, досягаючи нульового значення. У віддаленому періоді (через 24 міс) клінічно не визначався рецидив хо-

лестеатоми, що підтверджувалося і відсутністю секрету із середнього вуха.

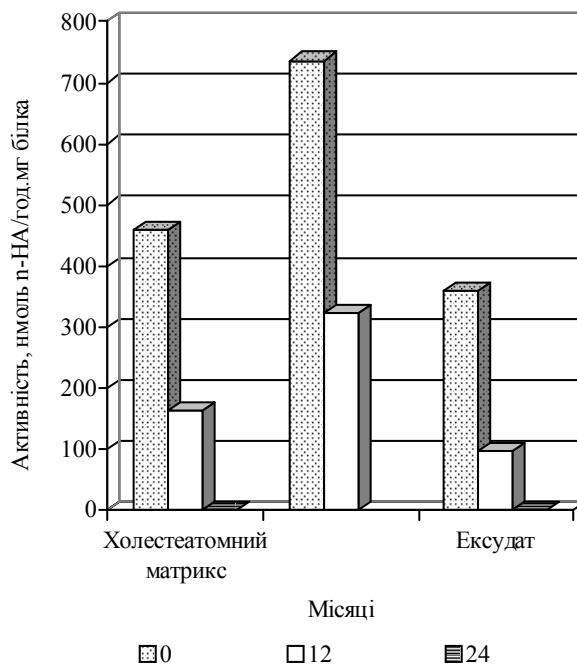


Рис. 4. Активність калікреїну в холестеатомі, кістковій тканині та ексудаті у хворій Г. до і в різні строки після лікування за схемою II.

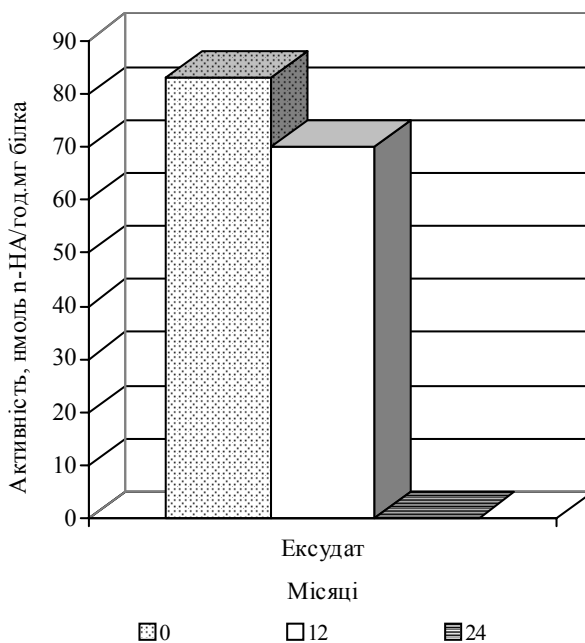


Рис. 5. Активність еластази в ексудаті у хворій Г. до і в різні строки після лікування за схемою II.

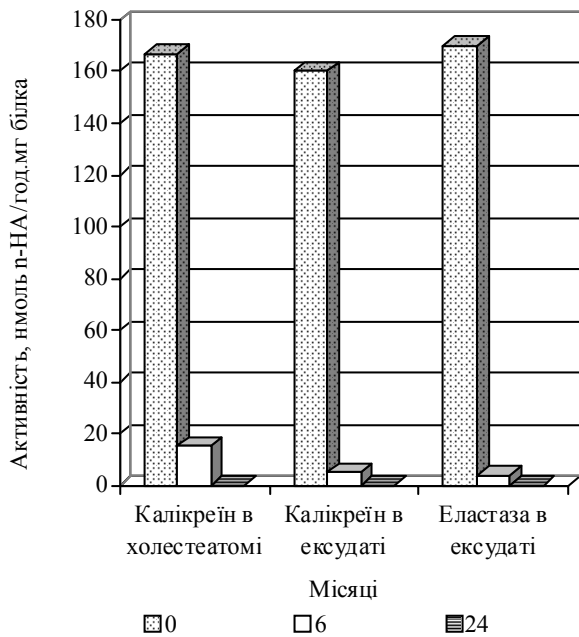


Рис. 6. Активність калікреїну в холестеатомному матриксі та ексудаті і еластази в ексудаті у хворого К. до і після лікування за схемою Ш.

Таким чином, на основі отриманих результатів можна зробити такі висновки. В дослідях *in vitro* виявлено, що ПФП (апро-

тинін) в дозі 100 АТрО пригнічує активність калікреїну холестеатоми на 96%, на 98% – в кістковій тканині і на 80% – в слизовій оболонці у хворих на ХГСО. Активність калікреїну в ексудаті інактивується на 82%, а еластази – на 65%. Ці дані слугували обґрунтуванням для включення апротиніну в комплексне лікування хворих на ХГСО з холестеатомою.

Комплексна терапія з використанням ППФ в більшості випадків, особливо при інкапсульованій формі холестеатоми, запобігала розвитку вторинної рецидивної холестеатоми, про що, перш за все, свідчила відсутність патологічного ексудату з вуха. При виникненні вторинної рецидивної холестеатоми у пацієнтів спостерігалось значне зниження як в ній, так і в ексудаті з вуха активності калікреїна та еластази – ферментів, яким притаманна властивість розщеплювати основний білок сполучної тканини – колаген, викликаючи деградацію кісткової тканини. Під впливом апротиніну мало місце зниження ознак агресивності холестеатоми.

1. Сребняк І.А., Кизим А.И. Активность эластазы в биологических жидкостях и перифокальных тканях среднего уха у больных хроническим гнойным средним отитом // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2004. – № 6. – С. 19-22.
2. Сребняк І.А., Кизим О.Й. Дослідження активності катепсину В в біологічних рідинах та перифокальних тканинах середнього вуха у хво-

- рих на хронічний гнійний середній отит з холестеатомою // Журн. вушних, носових і горлових хвороб. – 2007. – № 1. – С. 12-15.
3. Hochstrasser K., Albrecht G.Y., Gebhard W. et al. Isolation and characterization of trypsin-like and chymotrypsin-like proteinases from human cholesteatoma // Eur. Arch. Otorhinolaryngol. – 1994. – Vol. 251. – P. 30-35.

Надійшла до редакції 25.10.10.

© І.А. Сребняк, 2010

**АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНАЗ В ЭКССУДАТЕ
ИЗ СРЕДНЕГО УША И ХОЛЕСТЕАТОМНОМ
МАТРИКСЕ ДО И ПОСЛЕ КОМПЛЕКСНОГО
ЛЕЧЕНИЯ**

Сребняк И.А. (Киев)

Резюме

Установленный в опытах *in vitro* факт инактивирующего действия апротинина на активность калликреина и эластазы экссудата, холестеатомного матрикса и окружающих его перифокальных тканей среднего уха у больных хроническим гнойным средним отитом (ХГСО) послужил основанием для использования этого ингибитора в комплексном их лечении. Показано, что включение апротинина в комплексную терапию препятствовало развитию вторичной рецидивной холестеатомы, а при ее возникновении способствовало снижению агрессивности последней, о чем свидетельствовало значительное падение активности исследуемых протеиназ как в холестеатомном матриксе, так и в экссудате из среднего уха.

**ACTIVITY OF PROTEINASES IN EXUDATE
FROM MEDIUM EAR AND
CHOLESTEATOMIC MATRIX AFTER
COMPLEX CURE**

Srebnyak I.A. (Kiev)

Summary

Ascertainment by *in vitro* experiments of the fact of inactivative action of aprotinin on kallikrein and elastase of exudate, chloesteatomic matrix and surrounding peryfocal tissues of middle ear in patients with chronic purulent otitis media served as the basis for usage of this inhibitor in complex treatment. It were shown that including of aprotinin into the complex therapy led to prevention of the development of secondary recidivating cholesteatoma and at appearance of the latter supported to decrease of aggressively that was certified by noticeable fall of activity of the tested proteinases both in cholesteatomic matrixes and in exudate from the middle ear.