

# 蛋白水解酶对家畜污染创 治疗作用的研究\*

龙小海\*\*

(牧医系)

## 提 要

蛋白水解酶对蛋白质多少有水解作用。本研究试图利用专一性不强的蛋白酶作创伤凝块的清除术,以利抗生素直接接触创面作用于菌体。同时亦进一步研究、比较蛋白酶类对细菌的效应。

本研究通过山羊体探讨了国产的蛋白酶(主要是剑麻蛋白酶)对污染创抗生素延误处理的辅助治疗作用。对这种作用的原理进行了实验室的一系列试验,并运用电子显微镜加以验证。结果发现这些酶能够水解山羊血纤蛋白,对山羊污染创抗生素延误处理具有辅助治疗价值,其作用原理不仅仅是易化了抗生素接触细菌,而且某些蛋白酶本身也对细菌有一定的影响。所用蛋白酶资源广泛,提取容易,价格比同类进口产品远为低廉,故我们认为此研究将有助于酶在医学和兽医的应用,并存在有配制为成药的前景,从而有可能获得良好的社会效益和经济效益。

## 前 言

兽医外科临床经常要对污染创进行处理,家畜的自然灾害创常用的抗生素治疗往往不可避免地被延误<sup>[13]</sup>。若创伤后超过3小时才进行抗生素处理,由于创伤血纤蛋白凝块的存在致使治疗效果不理想<sup>[15]</sup>。手术清创能得到近似于新鲜的创面,但给组织造成进一步的损伤<sup>[17]</sup>。一些来源于动、植物和微生物的蛋白水解酶(或称蛋白酶)能清除创伤凝块,协助抗生素发挥有效的治疗作用<sup>[9]</sup>。

四十多年来已有许多种蛋白酶对创伤的治疗作用得到了较为详尽的研究,酶作用的机理也得到一定程度上的阐述<sup>[14]</sup>。这方面的工作大都是在人体或实验小动物身上完成的,直接用家畜进行酶的实验医学研究在兽医外科中尚不多见,国内这方面的工作更有

\* 本文是在导师叶浩教授指导下完成的。承蒙王树诚副教授、欧秀华、陈素珍、谭卫国、马爱云讲师、邓向前、李济和工程师、广西热作所叶启腾同志,对本试验给予支持和帮助,均此谨致谢忱。

\*\* 一九八五届硕士牧医系研究生。现在西南农业大学工作。

1985年7月23日收稿

待开展。广西热作所和复旦大学提取的, 来源于我国南方广泛种植的东一号种剑麻的一种新的巯基蛋白酶——剑麻蛋白酶<sup>[6]</sup>, 是否在兽医外科中具有使用价值, 与其他蛋白酶相比其效果如何, 是本研究拟予探讨的问题。蛋白酶在创伤的作用及其作用机理的研究, 对于推动外科创伤治疗学的发展, 促进蛋白酶在临床推广应用以提高治疗效果, 都是有意义的。

## 材 料 和 方 法

蛋白酶由广西热作所提供。剑麻蛋白酶和木瓜蛋白酶为该所产品。枯草杆菌1398蛋白酶(以下称枯草杆菌蛋白酶)为无锡酶制剂厂产品, 胰蛋白酶为浙江嘉兴化工二厂产品。酶活性以Follin单位表示。

溶血性链球菌(下称链球菌)为我们自己分离, 绿脓杆菌购自中山医科大学, 猪霍乱沙门氏杆菌(下称沙门氏杆菌)为华南农业大学传染病室提供, 该室尚负责对以上菌种进行了鉴定。

试验动物为成年雷州山羊, 雌雄随机分配, 体重接近, 健康状况良好, 一般临床检查未发现异常。

### (一) 蛋白酶对细菌作用的显微观察

蛋白酶对污染创抗生素延误治疗的作用的机理可能是多方面的。本研究通过对链球菌和沙门氏杆菌用酶处理后的显微观察, 了解酶是否对细菌有直接的影响。

含9000单位的0.5毫升酶液与4.0毫升菌液相混合, 用生理盐水与菌液混合作为对照, 混合液于37℃作用1小时后分别用光镜和电镜观察。光镜样本用革兰氏染色法, 电镜样本采用磷钨酸悬滴法负染色<sup>[6]</sup>。

### (二) 蛋白酶对细菌药敏的影响

细菌用某些蛋白酶处理后再施用抗生素则抗生素的效力大大增强<sup>[10]</sup>。用酶处理细菌是否对其药敏程度也有影响, 可通过这项试验加以测定并可选定用于活体试验的抗生素。

链球菌用鲜血琼脂培养基, 青霉素药敏试纸; 绿脓杆菌用普通琼脂培养基, 庆大霉素和卡那霉素药敏试纸。药敏试纸购自上海医学化验所。试验采用单片法<sup>[11]</sup>, 分成两部分: 1. 普通药敏试验。2. 用酶的药敏试验: 溶有300单位酶粉的1毫升生理盐水与1毫升菌液混合, 用1毫升生理盐水与菌液混合作为对照。置混合液于37℃中1小时。其余步骤与普通药敏试验相同, 仅绿脓杆菌试验是使用庆大霉素药敏试纸。

### (三) 蛋白酶的体外凝块水解试验

蛋白酶在体外水解动物血纤蛋白凝块的能力与酶对污染创抗生素延误治疗作用的效力相关联<sup>[14]</sup>。酶水解凝块的效力可以通过测定未被水解的血纤蛋白量而定量地测定出来, 水解后剩余的蛋白量与凝块水解的程度成反比。

这部分研究是要评定4种蛋白酶能否水解山羊离体血浆凝块, 其水解能力间有无差异。同时为动物试验确定一个合理施用的酶量。

离体血浆凝块的制备并不与Vnokaulla所介绍的<sup>[18]</sup>完全相同。当每个凝块用9000

单位酶作用时,肉眼几乎观察不到未被水解的凝块物质。遂对每凝块改施用900单位酶。试验共进行3次,所得出的平均数是加权平均数。

柠檬酸化山羊血浆用氯化钙重新钙化后,取每份0.5ml到10×100毫米小试管中,立即插入一根直径3毫米玻棒并用顶部开孔的胶滴管头固定在试管正中。2小时左右在玻棒周围(图1)或在管壁上形成凝块(图2)。

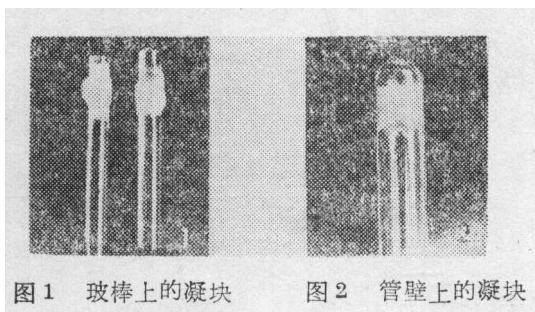


图1 玻棒上的凝块

图2 管壁上的凝块

除去多余的液体后,用生理盐水浸泡凝块30分钟,然后每个凝块浸入2.5毫升酶液中置37℃水解30分钟(酶液按George rodeheaver的方法<sup>[14]</sup>制备)。取出凝块并用生理盐水浸泡5分钟后用滤纸吸去凝块上多余的溶液,用生理盐水逐滴冲洗后再将溶液吸去,然后将此凝块溶于3.0毫升碱性尿素(200克尿素4克氢氧化钠和500毫升水)中。将此溶液在282nm光下以碱性尿素为空白对照测定其光密度,结果以整个凝块被水解的百分数来表示。将凝块样品用超薄切片技术<sup>[6]</sup>制备后在电镜下观察。

#### (四) 蛋白酶对山羊污染创抗生素延误处理的治疗作用的动物试验

预备试验包括化脓菌株的分离、筛选、鉴定和在山羊的实验化脓感染。主试验分为革兰氏阳性菌接种、抗生素局部使用和革兰氏阴性菌接种、抗生素全身用药两部分。

1. 蛋白酶对链球菌污染创抗生素延误处理的治疗作用: 试验羊4只,术前后均测定体温和血常规。在动物胸腰背部较为宽广的范围剪毛、脱毛并用酒精消毒,肌注静松灵使之安静。如图3所示沿脊柱两侧做2列各3个平行等距的手术切口,长3公分,深达深筋膜,压迫止血。用生理盐水将24小时的血斜面链球菌培养物洗下,在每个切口内滴入0.1ml菌液,菌液含菌量用标准的微生物学稀释技术测定。创伤保持开放3.5小时。蛋白酶溶于生理盐水中,每创伤滴上0.1ml含1800单位的酶液,第一

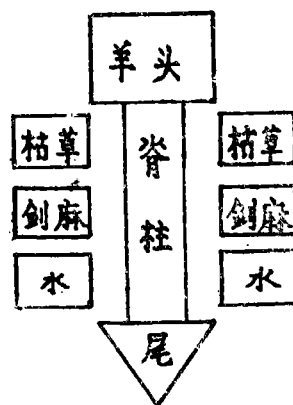


图3 动物试验酶处理示意图

对创伤用枯草杆菌蛋白酶,第二对用剑麻蛋白酶,第三对用生理盐水作对照。20分钟后,用灭菌敷料压迫伤口数次,将含5万单位青霉素G钾的0.1ml生理盐水滴在每伤口上。10分钟后,在切口中部用7号丝线作一针结节缝合,缝线从创伤底部越过,打结的松紧以使两创缘刚好对合为度<sup>[15]</sup>。用大块灭菌纱布复盖整个术部。试验期间动物采用舍饲。

4日后测定创伤的炎性反应:

硬结宽度:用手指触摸,游标卡尺测量,测定的两点之连线与切口线垂直。

脓汁的有无；揭开痂皮或打开创伤观察（有的创伤不用打开已能看到脓汁）。

活菌数估计：用止血钳夹住灭菌棉花对创伤全长进行拭擦并行搅动，力求每个创伤的操作一致。将粘有脓汁或创部液体的棉花放入5 ml生理盐水中并用漩涡混合器混合，用标准的微生物学稀释技术进行活菌计数。活菌数用以2为底的对数表示。

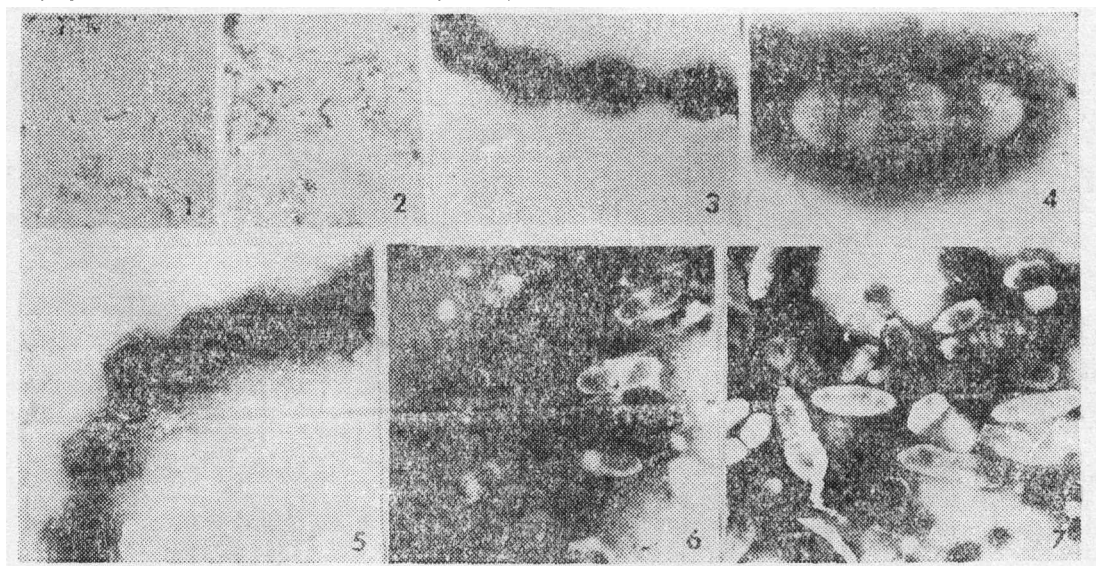
对创伤愈合情况进行比较观察，方法是观察单个的动物某一对伤口愈合对其他创伤的愈合情况。统计学处理采用95%的显著性水平。

2. 蛋白酶对绿脓杆菌污染创抗生素延误处理的治疗作用：采用绿脓杆菌作为细菌接种物，抗生素采用肌注硫酸庆大霉素3 mg/kg。其余与链球菌接种，局部使用青霉素的试验相同。

## 结 果

### （一）蛋白酶对细菌作用的显微观察

酶处理菌比对照菌明显膨胀增大，周界模糊，链球菌菌链间隔似有增宽现象。同时，电镜下的未处理链球菌不能看见内部结构，而酶处理菌则能较为清楚地看到细菌的环状核质和处于分裂中的细菌的很可能是细胞壁的结构，且可观察到链球菌菌体边缘有断裂、破损现象（图4列出部分显微照片）。



1. (660×)、3. 对照链球菌 (14000×)；2. (660×)、4. (14000×)、5. 酶处理链球菌 (14000×)；6. 对照沙门氏杆菌 (5000×)；7. 酶处理沙门氏杆菌。(5000×)

图4 显微镜下的细菌

### （二）蛋白酶对细菌药敏的影响

1. 普通药敏试验：青霉素G药敏试纸在链球菌培养物上获得了平均直径为28.8毫米的抑菌环，大于细菌对青霉素极度敏感的规定直径2.5毫米<sup>[1]</sup>。说明该链球菌对青霉素G极度敏感。

庆大霉素药敏试纸在绿脓杆菌培养物上获得了平均直径为21.1毫米的抑菌环，卡那霉素试纸平均为16.68毫米，两项结果均大于规定的15毫米，说明该绿脓菌对庆大霉素和卡那霉素均极度敏感。t检验结果表明该菌对庆大霉素的敏感性显著高于卡那霉素。

选择了青霉素和庆大霉素在活体试验中应用。

2. 用酶的药敏试验：酶处理后的链球菌培养物上，青霉素G药敏试纸获得的抑菌环平均直径为木瓜蛋白酶处理组35.1，剑麻蛋白酶组34.6，对照组32.0毫米。方差分析表明酶处理组间差异不显著，酶处理组与对照组间差异显著。

酶处理后的绿脓杆菌培养物上，庆大霉素药敏试纸获得的抑菌环平均直径为：木瓜蛋白酶组15.9，枯草杆菌蛋白酶组18.5，剑麻蛋白酶组16.2，胰蛋白酶15.1，对照组15.8毫米。枯草杆菌蛋白酶组与各处理组间均有显著差异，其余各处理组间未见显著差异。

### (三) 蛋白酶的体外凝块水解试验

各酶水解山羊离体血浆凝块的百分数是：木瓜蛋白酶组73.66，枯草杆菌蛋白酶组60.17，剑麻蛋白酶组59.57，胰蛋白酶组74.81。方差分析表明各组间没有显著差异 ( $P > 0.05$ )。

电镜下未水解的凝块其纤维状物质密集整齐呈簇状，水解后的凝块纤维状结构稀疏散乱而模糊 (图5)。

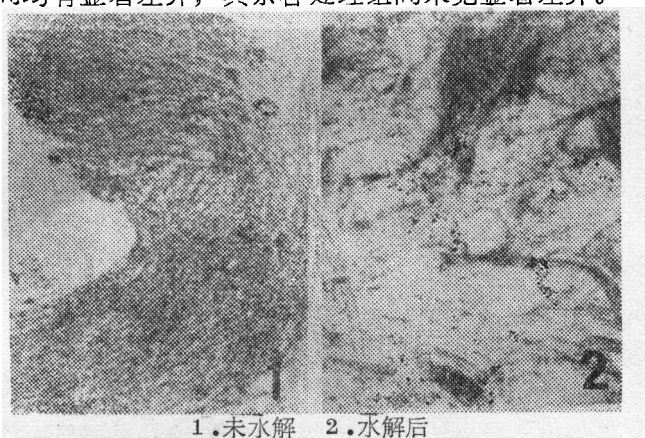


图5 电镜下的血浆块 (50000×)

### (四) 蛋白酶对山羊污染创抗生素延误处理的治疗作用的动物试验

1. 蛋白酶对链球菌污染创抗生素延误处理的治疗作用：每伤口接种的活菌数是  $4.6 \times 10^{15}$  个菌落形成单位。在复盖有血凝块的创伤上使用酶液20分钟后，用灭菌敷料轻轻压迫伤口，当敷料离开时，敷料上粘附有粉红色的胶状物质，伤口被清洁，显露出本身的组织色泽，并有轻微出血。在不用酶液而用生理盐水作对照的创伤上，敷料仅能吸附少量的无色液体，不能看到与上述酶处理创相同的清创效果。

表1 链球菌动物试验不同处理的创伤炎性反应比较

创伤数	处 理	硬结宽度		明显化脓 (%)	活菌对数 $\log_2 x$		
		(毫米)	(P)		平均 $\bar{x}$	$\bar{x} - 1.345$	$\bar{x} - 7.954$
8	生理盐水	20.07 ± 5.74		75.0	11.905	10.56**	3.951
8	枯草酶	13.03 ± 7.53	<0.01	37.5	7.954	6.609*	
8	剑麻酶	11.73 ± 6.26	<0.01	0	1.345		

注：硬结宽度采用t检验，活菌对数方差分析。·为显著，·为极显著。

术后4日,动物体温和血常规与术前相比变化不明显。测定的炎性反应结果见表1。对创伤愈合时间进行肉眼观察,发现酶处理创已愈合时,对照创均未完全愈合。

2. 蛋白酶对绿脓杆菌污染创抗生素延误处理的治疗作用: 每伤口接种的活菌数是 $2.46 \times 10^{27}$ 个菌落形成单位。术后4日动物一般检查和血常规测定基本正常。测定的炎性反应比较结果见表2。

创伤愈合时间的肉眼观察结果与链球菌接种,青霉素局部使用的试验结果相同。

表2 绿脓杆菌动物试验不同处理的创伤炎性反应比较

创伤数	处 理	硬结宽度		明显化脓 (%)	活菌对数 $\log_2 x$		
		(毫米)	(P)		平均 $\bar{x}_i$	$\bar{x}_i - 12.482$	$\bar{x}_i - 14.735$
8	生理盐水	$15.8 \pm 3.91$		62.5	21.168	8.686**	6.433**
8	枯草酶	$8.24 \pm 2.61$	<0.01	25.0	14.735	2.253	
8	剑麻酶	$9.62 \pm 1.61$	<0.01	12.5	12.482		

## 讨 论

蛋白酶(即蛋白水解酶)在外科中应用已有四十多年历史了。应用较多的是用酶消化烧伤焦痂<sup>[12]</sup>。国内有不少用酶处理毒蛇咬伤的报道<sup>[3]</sup>。近年来国外有人用酶在牛作了实验创伤治疗的初步研究<sup>[2]</sup>。然而蛋白酶在兽医外科中的应用及其有关原理的探讨还是很初步的。涉及多学科领域并利用现代科学设备对这一课题进行综合性的研究仍有待进一步开展。

我们选取了几种国产酶来进行这次初步的工作。国外有人认为枯草杆菌蛋白酶具有最大的血纤蛋白水解活性,作为抗生素延误处理的佐剂效果最好,而胰酶则被认为较差<sup>[14]</sup>。因此在重点探讨近年来在我国发现的巯基剑麻蛋白酶的同时,也用上述两种酶的国产商品作为比较。剑麻蛋白酶Agavain-SH来源广泛,提取容易,价格低廉,其有用性研究有助于我国酶学和酶在医学应用等方面的进展。用家畜进行的这项实验研究的成果可作为应用于兽医外科临床的参考。

创伤时很快形成的创伤血纤蛋白凝块阻碍了抗生素对细菌的有效作用,蛋白酶使细菌的这种保护屏障被移除。哺乳动物的蛋白质组成多样而复杂,山羊血纤蛋白凝块能否被我国生产的蛋白酶水解,这是本工作首先要解决的问题。体外凝块水解试验的成功不仅揭示了酶在山羊外科中的治疗价值,也初步提示了扩大应用于其他畜种的可能性。水解试验中没能发现所用的4种酶的凝块水解能力有显著差异。酶剂量增大则水解力增强,用9000单位酶几乎完全水解了玻棒上的凝块,这与某些研究结果是一致的<sup>[14]</sup>。

蛋白酶对污染创伤抗生素延误处理的辅助作用的机理目前我们认为有三点。首先,酶的清创术移除了连同细菌一起的血浆凝块,使细菌数量减少<sup>[13]</sup>。本研究的结果支持了这个观点,用酶处理污染创20分钟后用敷料吸除液化的凝块物质,这时用肉眼几乎

看不到血凝块的存在。但剩下的细菌数量还足以引起创伤感染<sup>[13]</sup>。

酶作用的第二个机理为,此时这些细菌由于保护性的凝块屏障被剥除而使抗生素的有效期延长<sup>[12]</sup>。本研究的结果与Edlich等的这个说法相一致,在制造创伤并污染细菌3.5小时后施用的抗生素由于酶的辅助仍发挥了有效的抗菌作用。

George rodeheaver等人认为蛋白酶本身可能具有抗菌活性,他们采用了用酶作用过的细菌进行活菌计数和对仅用酶处理的创伤进行活菌计数的方法<sup>[13]</sup>。Carl H. Clark认为在细菌培养物中酶增强了抗生素效力十多倍<sup>[10]</sup>。他们都是采用的微生物学方法。我们设想,酶一定是影响了细菌本身的某个方面。

借助电镜我们从较直观的超微结构上对酶的第三个机理进行了一些阐明。电镜下用酶处理过的细菌与对照菌相比确有明显改变。菌体膨大,周界模糊,边沿断裂破损,生长不规则等,可以视为细菌细胞壁受到某些破坏作用并使菌体本身失去应有约束而“膨胀”,或者说“溶解”。革兰氏阳性菌细胞壁含有蛋白质,阴性菌含有脂蛋白和球蛋白<sup>[4]</sup>。很可能这些蛋白质在酶的作用下部分地被分解。电镜负染技术的原理<sup>[9]</sup>指出,电镜照片中出现黑色影象的部分正是样本物质稀薄疏少的地方。在被酶处理过的电镜照片上看到细菌的环状核质,就很可能是细菌细胞壁受到了破坏或溶解而使细菌变得相对“透明”起来。细菌用某些蛋白酶处理后增加了对抗菌药物的敏感性,以及活体试验中酶对细菌性炎症的有效作用,都有助于上述对酶处理细菌超微结构观察的解释。由于动物数量和细菌计数工作量的限制,我们仅选用了枯草杆菌蛋白酶来与剑麻蛋白酶一起进行活体试验。与George rodeheaver等不一致的是,枯草杆菌蛋白酶未能表明在增强抗生素作用方面效力最大。枯草杆菌蛋白酶有很多种制剂<sup>[16]</sup>,国产1398酶可能由于水解专一性与别的制剂不同因而产生的结果也不完全相同。至于1398酶在山羊活体试验中效果是否确实不如国外的枯草杆菌蛋白酶,还是国产剑麻蛋白酶确实也具有与国外生产的枯草杆菌蛋白酶同等的甚至更好的效果呢,这有待于进一步的比较试验来阐明。

离体凝块水解试验基本准确地预示了活体试验的可能结果,这与某些报道<sup>[14]</sup>一致。剑麻蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶水解凝块的效力没有显著差异,活体试验中两种酶都有效地完成了酶的清创术,在控制炎性反应方面基本具有相等的效力。特别是剑麻蛋白酶,对由革兰氏阳性和阴性细菌引起的山羊化脓感染,都能促进延误使用的抗生素(局部使用的如青霉素,全身使用的如庆大霉素)发挥其效能。本试验同样证明了抗生素的用药途径不影响发挥其治疗作用<sup>[14]</sup>。

本工作提出了临床兽医外科中用酶处理创伤的一个供参考的剂量,充分溶解的1800 Follin单位蛋白酶对长3厘米深5毫米的创伤能够有效地进行酶的清创术。

创部硬结宽度和创伤化脓现象能表现明显的处理效应,可作为评定炎性反应的指标,愈合时间的肉眼观察虽未能取得足够的数,但也有助于说明酶的处理有利于创伤愈合的过程。评价创伤细菌性炎症的根据的创伤活菌计数是一个有说服力的指标。但同时要看到试验所采用的手段依赖于手工操作的一致。用灭菌脱脂棉拭擦创伤显然不可能使创伤的活菌完全转移到脱脂棉上。因此这种对所谓“每创伤活菌数的估计”<sup>[14]</sup>就完全建立在同等水平比较的基础上。标准的微生物学稀释技术准确地反映样本的活菌数,

而样本的采取方式却使这些数据被称为“估计值”或“估算值”。

本研究在方法学上作了一些尝试。我们在每个试验中使用的不同酶都采用相同的活性单位, 这比使用相同重量的酶<sup>[14]</sup>来似更合理。酶有各种剂型之分, 哪怕是同一种酶亦如此, 只有用活性单位方能真正表示含有多少有效的酶。相同单位的某种酶对不同作用物以及相同单位的几种酶对同一作用物表现不一致的效力。这是由于每个酶都有自己特定的作用位点, 而作用物又有自身的组成和立体构型的不同<sup>[8]</sup>。此外, 对细菌数估计虽然有人也使用对数表示<sup>[13][14]</sup>, 而本工作明确提出用以2为底的对数就更准确地反映出微生物的几何生长特性和裂殖菌的二分裂繁殖方式<sup>[7]</sup>。离体血浆凝块制备的方法使用了最容易获得的材料和极为简单的操作, 比起Vonkaulla所介绍的所谓“简单的试管安排”<sup>[15]</sup>来, 似更为简单。至于采用电镜来揭示凝块水解的变化情况和酶对细菌的作用, 以把这方面的观察提高到超微结构的水平, 使之更为直观, 这是本研究的一个尝试, 结果已表明其可行。

我们的这个工作仍然是很初步的。我们希望能够推动更多的工作者开展酶对创伤治疗的实验研究和临床应用。蛋白酶与抗生素在某种赋形剂中有效地结合起来共同发挥作用, 因而出现一种不但对动物, 而且对人的污染创都有良效的商品制剂, 这也是我们这个初步试验所期望出现的成果, 从本研究结果看, 获得良好经济效益的前景也并非是不可能的。

## 结 论

(一) 国产巯基剑麻蛋白酶Agavain-SH对山羊污染创抗生素延误处理有明显辅助治疗价值。抗生素的用药途径不影响酶的有效性。此外, 本试验结果还提供了一个可供临床创伤治疗参考的蛋白酶剂量。

(二) 国产木瓜蛋白酶、枯草杆菌蛋白酶、剑麻蛋白酶和胰蛋白酶均能水解山羊离体血纤蛋白凝块。统计学分析表明上述酶的水解能力没有显著差异。

(三) 对蛋白酶在污染创的治疗作用的机理作了进一步的阐明。电镜观察直观地证明蛋白酶能破坏细菌的某些结构, 离体药敏试验表明, 用某些酶作用过的细菌增加了对抗生素的敏感性。

(四) 在山羊所作的蛋白酶对污染创抗生素延误处理的辅助治疗作用试验的结果可以作为应用于兽医外科临床的参考, 具有治疗学价值并可获得直接经济效益。

## 参 考 文 献

- [1] 中山医学院编:《实用生化细菌检验》, 272, 广东人民出版社, 1976年。
- [2] 王锦坤译:蛋白水解酶和抗菌素对创伤微生物区系种类的影响,《国外兽医学畜禽疾病》, (3) 1985: 14。
- [3] 区淑仪:三种蛋白水解酶对眼镜蛇毒中毒动物的保护作用,《广东医学》, (11)1980: 320。
- [4] 甘肃农业大学主编:《兽医微生物学》, 9, 农业出版社, 1980年。
- [5] 孙崇荣等:剑麻蛋白酶——一种新发现的弱基蛋白酶,《科学通报》, (3) 1980: 138。
- [6] 洪涛主编:《生物医学超微结构与电子显微镜技术》, 111—152, 科学出版社, 1980年。
- [7] 俞大维等编:《微生物学》, 21, 科学出版社, 1995年。
- [8] W. 费迪南德著(王志美等译):《酶分子》, 100—153, 科学出版社, 1980年。
- [9] Bo Prytz et al, *Bacillus subtilis* protease in the digestion of burn eschar. *Clin Pharmacol Ther* 7, 1966, 347.
- [10] Carl H. Clark, Use of antibiotics in wounds. *MVP* 4, 1980, 307.
- [11] Edlich RE, et al, Studies in management of the contaminated wound. I. Technique of closure of such wounds together with a note on a reproducible experimental model. *J Surg Res* 8, 1968, 585.
- [12] Edlich RE, et al, Resistance of the surgical wound to antimicrobial prophylaxis & its mechanisms of development. *Am J Surg* 126, 1973, 583.
- [13] George Rodeheaver et al, Proteolytic enzymes as adjuncts to antibiotic prophylaxis of surgical wounds. *Am J Surg* 127, 1974, 564.
- [14] George Rodeheaver et al, Proteolytic enzymes as adjuncts to antimicrobial Prophylaxis of contaminated wounds. *Am J Surg* 129, 1975, 537.
- [15] John F. Burke, The effective period of preventive antibiotic action in experimental incisions & dermal lesions. *Surgery* 50, 1961, 161.
- [16] James Dwight Mcconn et al, *Bacillus subtilis* neutral proteinase. I. *J Biol chem* 239, 1964, 3706.
- [17] Paul Silverstein et al, In vitro evaluation enzymatic debridement of burn wound eschar. *Surg* 73, 1973, 15.
- [18] Vonkaulla KN, A simple test tube arrangement for screening fibrinolytic activity of synthetic organic compounds. *J Med Chem* 8, 1965, 164.
- [19] Vincent R. Pennisi et al, Travase, an effective enzyme for burn debridement. *Plast Resonstr Surg* 51, 1973, 371.

## STUDIES ON THE THERAPEUTIC VALUE OF PROTEOLYTIC ENZYMES IN THE TREATMENT OF CONTAMINATED WOUNDS IN DOMESTIC ANIMALS

Long Xiaohai

(Department of Animal Husbandry and Veterinary Medicine)

### ABSTRACT

Within recent years, it has been proved by many authors that the surface coagulum developed on the wound may surround the bacteria and protect them from contact with the antibiotic, thus the antibiotic has no apparent therapeutic value in the treatment of contaminated wounds if the bacteria creating the infection have been in the tissue longer than 3 hours before the antibiotic is given. And again, it has also been reported that application of some varieties of proteolytic enzymes to the surface of the contaminated wound may disrupts this coagulum, allowing the antibiotic to destroy the bacteria and prevent the development of infection. But such results were obtained mostly from laboratory animals or from human plasma, very little is known as far as domestic animals are concerned.

The purpose of the present study was to ascertain the value of some proteolytic enzymes (all domestic products) as adjuncts to antimicrobial prophylaxis of contaminated wounds in domestic animals. Adult native goats served as experimental animals in this trial.

The results obtained indicated that, in the *in vivo* assay of proteolytic enzymes as adjuncts to delayed antibiotic treatment, a recently discovered proteolytic enzyme, namely Agavain-SH, showed promise as an adjunct to a variety of antibiotics that are effective against both gram-positive and gram-negative organisms. Enzymatic hydrolysis of the wound coagulum with this enzyme significantly enhances the therapeutic value of antibiotic in the delayed treatment of contaminated wounds in goats. The route by which the antibiotic is administered does not affect the value of the enzyme. In the *in vitro* assay of enzymatic clot lysis, the enzymes agavain-SH, papain, bacillus subtilis protease and trypsin were studied. When standardized goat fibrin clots were placed in solutions containing proteolytic enzymes, all of the enzymes were found to be effective in hydrolyzing the clots, but statistical analysis indicated that there was no significant difference between them in the ability to hydrolyze fibrin clots.

In this work, bacteria treated with enzymes were also studied via both light and electron microscopy. It was found that some enzymes appeared to deteriorate the cell wall of bacteria, consequently the bacteria began to swell up and became somewhat 'transparent', thereby revealed their inherent circular nucleoplasms. Sensitivity test of bacteria to some antibiotics revealed that enzymes may render bacteria more sensitive to some antibiotics, and the facts that proteolytic enzymes themselves possess some antimicrobial activities add to the knowledge of the mechanisms of the enzymatic action as adjuncts to antimicrobial prophylaxis of contaminated wounds.

Details of some modifications in methodology are also described in this article.