

Вміст тригерних компонентів системи протеолізу та їхніх регуляторів при розвитку патологій підшлункової залози

Т.Б. Синельник¹, О.О. Кравченко¹, О.С. Костюк¹, О.М. Савчук¹, С.А. Суходоля², Л.І. Остапченко¹

¹Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка; e-mail: synelnykt@gmail.com; taxima@knu.ua;

²Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

Вивчали вміст компонентів системи активації плазміногену (плазміногену, тканинного активатора плазміногену та його інгібітора), показники ланки тромбомодулін-протейн С, а також вміст матриксних металопротейназ (ММП-1, -2, -3, -8, -9, -10) та тканинного інгібітора металопротейназ, факторів росту (трансформуючий фактор росту $\beta 1$, інсуліноподібний фактор росту 1, фактор росту фібробластів 2) та цитокіновий профіль (інтерлейкіни: ІЛ-1 β , -4, -6, -8, -10, фактор некрозу пухлин α , інтерферон γ) у хворих на хронічний панкреатит та рак підшлункової залози на рівні системної циркуляції та патологічнозміненої тканини підшлункової залози (ПЗ). Для дослідження було обрано пацієнтів Хмельницької обласної клінічної лікарні віком від 28 до 89 років: 20 осіб із хронічним панкреатитом; 20 осіб із раком ПЗ; 20 умовно здорових осіб (контроль). У всіх пацієнтів було відібрано зразки плазми крові та отримано 10%-ві гомогенати тканини ПЗ, в яких методом імуноферментного аналізу із застосуванням відповідних антитіл визначали вміст досліджуваних компонентів. На рівні системної циркуляції виявлено вірогідне зростання більшості показників за умов хронічного панкреатиту. Онкопатологія ПЗ характеризувалася підвищенням вмісту лише двох показників (тромбомодуліну та протейну С) у плазмі крові хворих. Дослідження зразків гомогенатів тканини за вищезазначених патологій, навпаки, показало значні зміни вмісту більшості ММП та цитокінів за умов раку ПЗ, що вказує на розвиток в ураженому органі локальних біохімічних процесів, спрямованих на метастазування, ангіогенез та імуномодуляцію.

Ключові слова: хронічний панкреатит; рак підшлункової залози; матриксні металопротейнази; цитокіни; плазміноген; фактори росту.

ВСТУП

Запальні захворювання підшлункової залози (ПЗ) залежно від особливостей їх початку та перебігу прийнято поділяти на три основні категорії: гострий, рецидивуючий гострий та хронічний панкреатити. Багаторічні дослідження наводять на думку про те, що ці патології є різними етапами одного і того самого захворювання, а хронічний панкреатит (ХП) часто відносять до основних факторів, що сприяють розвитку раку ПЗ [1]. Згідно з гіпотезою «сигнального» нападу, запропонованої Whitcomb [2], розвиток пан-

креатиту зазвичай починається насамперед з раптового нападу гострого панкреатиту внаслідок гострого ураження ПЗ алкоголем, токсинами, гіперліпідемією, травмами та низкою інших факторів. Вони викликають патологічну активацію травних ферментів в ацинарних клітинах, що спричиняє самоперетравлення тканини ПЗ і супроводжується її набряком, панкреонекрозом та кровотечею, а також сильним болем [3]. Приблизно у 20% пацієнтів із першим нападом гострого панкреатиту при збереженні дії факторів ризику з часом розвивається рецидивуючий гострий панкреатит, який у 35% пацієнтів надалі пе-

© Т.Б. Синельник, О.О. Кравченко, О.С. Костюк, О.М. Савчук, С.А. Суходоля, Л.І. Остапченко

реходить до ХП [4]. Розвиток фіброзу у разі ХП пов'язаний із накопиченням надмірної кількості позаклітинного матриксу через посилене відкладення та дезорганізацію його білків, що спричиняє дисфункцію тканин і органу недостатність.

Неконтрольоване запалення ПЗ, яке виникає за ХП, формує середовище, збагачене цитокінами й хемокінами, що сприяє злоякісному переродженню клітин на тлі погіршення імунного виявлення пухлини. Саме тому, як зазначалося вище, деякі дослідники розглядають ХП одним із головних факторів розвитку раку ПЗ – хвороби, на яку припадає близько 10% усіх видів раку органів травлення [5]. Понад 90% випадків раку ПЗ ідентифікують як протокову аденокарциному ПЗ – онкологічний розлад із коефіцієнтом летальності близько 0,9, середньою виживаністю менше ніж 6 міс після встановлення діагнозу та 5-річною виживаністю менше за 10% [6].

Дані численних досліджень також свідчать про існування тісного зв'язку між механізмами, залученими у тріаду «загоєння ран, хронічний фіброз, розвиток/прогресування раку», що поширюються на клітини та мікросередовище, яке їх оточує [7]. Принциповими компонентами цих механізмів є цитокіни та ростові фактори, що регулюють поширення процесів запалення і загоєння, включаючи системи протеолізу, залучені у ремоделювання позаклітинного матриксу та фіброгенез. Життєво необхідні протеолітичні реакції переважно опосередковуються сериновими протеазами, до яких, зокрема, належать компоненти системи активації плазміногену (САП), а також матриксними металопротеїназами (ММП) [8].

Метою нашої роботи було проаналізувати вміст компонентів САП (плазміногену, тканинного активатора плазміногену – ТАП та його інгібітора ІАП-1), показники ланки тромбомодулін-протеїн С, а також вміст матриксних металопротеїназ (ММП-1, -2, -3,

-8, -9, -10), ростових факторів та цитокиновий профіль у хворих на ХП та рак ПЗ на рівні системної циркуляції та патологічнозміненої тканини ПЗ.

МЕТОДИКА

Для дослідження було відібрано 60 осіб віком від 28 до 89 років, яких розподілили на 3 групи по 20 осіб у кожній. До I групи увійшли умовно здорові люди (контроль), без патології ПЗ (тобто без клінічних ознак захворювання, фіброзу, змін у структурі, архітектоніці ПЗ). До II групи увійшли хворі на ХП, до III групи – хворі на рак ПЗ. Співвідношення пацієнтів за віком та статтю в усіх трьох групах було однаковим. Усі хворі були пацієнтами хірургічної клініки Комунального закладу охорони здоров'я «Хмельницька обласна клінічна лікарня», Україна, які пройшли стандартне передопераційне обстеження, що включало аналізи крові та сечі; комп'ютерну томографію органів грудної клітини, черевної порожнини та малого тазу з підсиленням контрасту для оцінки ступеня поширення раку; біопсію пухлини з патологоанатомічним обстеженням. Обов'язковою умовою була добровільна письмова згода пацієнтів на участь у цих дослідженнях. Критеріями включення до II групи (ХП) були абдомінальний больовий синдром, гістологічно підтверджені структурні зміни ПЗ (ацинарна атрофія, фіброз, жирова трансформація, хронічне запалення та розвиток аномальних проток) та порушення її зовнішньосекреторної функції. Критеріями включення до III групи (рак ПЗ) вважали дезорганізацію архітектоніки циліндричного, муцинозного епітелію дрібних панкреатичних протоків з ядерною атипією (ядра цих клітин збільшені, плейоморфні, невірно орієнтовані), тобто морфологічні зміни, типові для третьої, найвищої стадії панкреатичної внутрішньоепітеліальної неоплазії, яку часто позначають як панкреатичну внутрішньопротокову карциному (карциному *in situ*)

із найвищим ступенем дисплазії. Згідно з рішенням біоетичної комісії Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова (протокол № 15 від 26.09.2021), проведені дослідження повністю відповідали етичним та морально-правовим вимогам діючих положень МОЗ України та Гельсінкської декларації Всесвітньої медичної асоціації про етичні принципи проведення наукових медичних досліджень за участі людини.

Передопераційні зразки плазми були відібрані вдень перед операцією натщесерце, а зразки тканини ПЗ – інтраопераційно. Для отримання 10%-го гомогенату ПЗ 1 г тканини гомогенізували в 9 мл охолодженого 50 ммоль/л тріс-НСІ-буфера (рН 7,4) і центрифугували при 12000g протягом 30 хв при +4°C. Супернатант збирали та використовували для подальших досліджень.

Концентрацію ТАП, ІАП-1, плазміногену, тромбомодуліну, протеїну С у плазмі крові, а також цитокиновий профіль (вміст інтерлейкінів ІЛ-1 β , -4, -6, -8 та -10, фактора некрозу пухлин α – ФНП- α , інтерферону γ – ІФН- γ), вміст факторів росту (трансформуючий фактор росту β 1 – ТФР- β 1, інсуліноподібний фактор росту 1 – ІФР-1, фактор росту фібробластів 2 – ФРФ-2) та матриксних металопротеїназ (ММП-1, -2, -3, -8, -9, -10) й їхнього інгібітора ТІМП-1, у плазмі крові та в гомогенаті тканини ПЗ визначали методом імуноферментного аналізу із застосуванням відповідних антитіл фірми “Santa Cruz Biotechnology, Inc.” (США) за загальною методикою для розчинних білків [9].

При дослідженні показників крові 10 мкл плазми розводили в буфері (50 ммоль/л тріс-НСІ; рН 7,4; 130 ммоль/л NaCl) до 100 мкл, а у разі дослідження тканин їхні гомогенати розводили тим самим буфером так, щоб концентрація білка становила 10 мкг/мл, та відбирали 100 мкл для нанесення в лунки. Досліджувані зразки інкубували протягом 12 год при +4°C. Видалення несорбованого антигену проводили триразовим проми-

ванням лунок 50 ммоль/л тріс-НСІ-буфером (рН 7,4), що містив 0,1% твін-20. Для блокування неспецифічних ділянок зв'язування використовували 5%-й розчин знежиреного молока. Після відмивання 0,05 ммоль/л тріс-НСІ-буфером з 0,1% твін-20 та 0,05 ммоль/л тріс-НСІ-буфером, проводили інкубацію з первинними антитілами при 37°C впродовж 60 хв. Після цього плашки знову двічі відмивали 50 ммоль/л тріс-НСІ-буфером (рН 7,4) та двічі цим самим буфером з додаванням 0,1% Твін-20. Після внесення відповідних вторинних антитіл інкубували протягом години за тих самих умов і знову відмивали за вище наведеною схемою. Як субстрати пероксидазної реакції використовували о-фенілендіамін (0,4 мг/мл) та H₂O₂ (0,013%; «Sigma-Aldrich», США). Реакцію зупиняли 1 ммоль/л H₂SO₄. Оптичну щільність проб вимірювали на плашковому спектрофотометрі μ QuantTM («BioTek Instruments, Inc.», США) при довжині хвилі 492 нм [10]. Вміст досліджуваних показників у плазмі крові виражали в умовних одиницях на 1 мл, у гомогенаті тканини – в умовних одиницях на 1 г тканини. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд відповідно до протоколу [11].

Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення “Statistica 8.0” (“StatSoft Inc.”, США), для побудови графіків використовували програмне забезпечення MS Excel (MS Office). Результати були представлені як середнє $\pm$ SEM для кожної групи. Для перевірки нормального розподілу результатів використовували тест Колмогорова-Смірнова. Статистичний аналіз проводили за допомогою однобічного дисперсійного аналізу (ANOVA). Відмінності вважали статистично вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Першим етапом роботи стало вивчення стану системи активації плазміногену та

ланки тромбомодулін-протеїн С у разі досліджуваних патологій ПЗ – адже нині доведено, що вони не лише беруть участь у регуляції процесів гемостазу, але й мають інші функції, зокрема, залучаються у процеси ремоделювання тканин, загоєння ран та ангіогенезу [12].

Результати проведених досліджень не виявили достовірних відмін у вмісті ТАП та ІАП-1 у плазмі крові хворих на ХП та рак ПЗ порівняно зі значеннями відповідних показників у контролі (рис. 1). Водночас встановлено зростання плазмового вмісту тромбомодуліну та протеїну С майже у 3 та 4 рази відповідно при ХП. Зміни вищезазначених параметрів за умов раку ПЗ були менш вираженими, перевищуючи контрольні значення на 30–40%. Такі відхилення в результаті призводили до статистично значущої різниці між показниками за умов хронічного запалення та раку ПЗ.

Існуючі дані щодо змін вмісту тромбомодуліну у сироватці та патологічно змінений

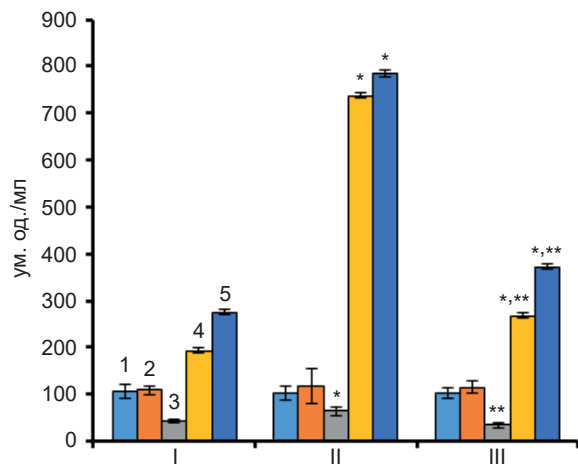


Рис. 1. Вміст компонентів системи активації плазміногену та ланки тромбомодулін-протеїн С у плазмі крові хворих на хронічний панкреатит та рак підшлункової залози: I – контроль, II – хронічний панкреатит, III – рак підшлункової залози; 1 – інгібітор активатора плазміногену, 2 – тканинний активатор плазміногену, 3 – плазміноген, 4 – протеїн С, 5 – тромбомодулін; * $P < 0,05$ порівняно зі значенням відповідного показника у контролі; ** $P < 0,05$ порівняно зі значенням відповідного показника у хворих на хронічний панкреатит

тканині ПЗ хворих на рак ПЗ та ХП є суперечливими. Відомо, що сироваткова концентрація тромбомодуліну залежить від вмісту цитокінів, наявності ТАП та ІАП-1, імунних реакції, активації каскаду згортання крові, швидкості деградації трансмембранного тромбомодуліну, наявного на ендотеліальних клітинах, та швидкості його метаболізму у нирках і печінці тощо. Дані низки досліджень свідчать про зниження рівня експресії тромбомодуліну у пухлинних клітинах раку різної локалізації, що асоціюється з прищвидшеним метастазуванням та низькою виживаністю пацієнтів. І, навпаки, підвищена експресія тромбомодуліну пухлинними клітинами часто корелює з кращим прогнозом. Нині відомо, що тромбомодулін може гальмувати ріст пухлин. Основним механізмом його протипухлинної дії вважається вплив на епідермально-мезенхімальний перехід через пригнічення експресії пухлинними клітинами мезенхімальних маркерів із одночасним посиленням експресії епітеліальних маркерів, що нормалізує проліферацію клітин та їхні міграційні властивості і може підвищити чутливість клітин до хіміотерапії. Також тромбомодулін впливає на такі етапи метастазування, як дисоціація міжклітинних контактів клітина-клітина у первинному місці, інфільтрація за допомогою деградації позаклітинного матриксу, судинна інвазія, імунне ухилення, адгезія до ендотеліальних клітин органа-мішені, екстравазація та проліферація. У погано диференційованих ракових пухлинах експресія тромбомодуліну не тільки знижується, але й змінюється його локалізація від поверхні клітини до цитоплазми, що спричиняє відшарування ракових клітин від первинної ділянки через зниження адгезивної здатності. А збільшення експресії тромбомодуліну пригнічує активність плазміну, а, отже, і протеоліз позаклітинного матриксу, клітинну інвазію та метастазування [13]. Водночас є відомості про те, що у пацієнтів з раком ПЗ вміст тромбомодуліну у плазмі є підвищеним

уже під час первинного лікування і надалі збільшується з прогресуванням хвороби. За цими самими даними, у пацієнтів з різними типами раку в термінальній стадії вміст тромбомодуліну у плазмі крові також є значно збільшеним порівняно зі значенням в умовно здорових осіб [14].

Зважаючи на подібність процесів, що лежать в основі змін у структурі позаклітинного матриксу при прогресуванні раку ПЗ та ХП, можна передбачити, що компоненти фібринолітичного шляху можуть відігравати певну роль і у патогенезі останнього. Дані низки досліджень вказують на те, що підвищена активність ТАП посилює індуковані плазміном літичні ушкодження позаклітинного матриксу, а також сприяє активації плазміном латентного ТФР- β 1, що є важливим чинником фіброзу ПЗ [12], при цьому ТФР- β 1 стимулює експресію ІАП-1.

Дослідження вмісту інших важливих регуляторів формування позаклітинного матриксу й фіброгенезу при патологіях ПЗ, а також стимуляторів пухлинного росту та інвазії, таких як ТФР- β 1, ІФР-1, ФРФ-2, у плазмі не виявили достовірних змін ні за умов розвитку ХП, ні за раку ПЗ порівняно із контролем. Виключенням був ІФР-1, плазматичний вміст якого в хворих на ХП був на 44% вищим ($P < 0,05$; рис. 2).

Незважаючи на те, що, за даними більшості досліджень, експресія вищенаведених ростових факторів у клітинах ПЗ при патологіях зростає і корелює з агресивністю захворювання та поганим прогнозом для пацієнтів, їх дія на тканину ПЗ, імовірно, подібно до розглянутих вище компонентів САП і ланки тромбомодулін-протеїн С, є локальною і тому не обов'язково супроводжується відповідними змінами вмісту цих ростових факторів у системній циркуляції [1]. І хоча є відомості, що при ХП і раку ПЗ сироватковий вміст ІФР-1 є вищим, ніж у контролі, дані інших досліджень це не підтверджують. Навіть більше, є повідомлення про те, що пацієнти з раком

ПЗ можуть мати значення цього показника, нижчі за контрольні. Одним із пояснень цього може бути розвиток у пацієнтів інсулінорезистентності та гіперінсулінемії – адже відомо, що остання сприяє зниженню концентрації ІФР-1 у сироватці крові [15]. За іншими даними, сироватковий вміст ІФР-1, ФРФ та фактора росту ендотелію судин є збільшеними лише на пізній стадії раку ПЗ, причому концентрація останнього корелює із класом пухлини, ураженням вузлів, судинною інвазією, метастазами та стадією; вміст ФРФ – із розміром і класом пухлини, а ІФР-1 – із судинною інфільтрацією [16].

Наступним етапом дослідження було проаналізувати вміст ММП-1, -2, -3, -8, -9, -10 у плазмі крові та тканині ПЗ хворих на ХП та рак ПЗ. За нормальних умов ці ферменти беруть участь у метаболізмі складових позаклітинного матриксу, відіграючи важливу роль у його ремоделюванні під час ембріо-, морфо-, ангиогенезу та загоєння ран [17]. Їхня протеолітична активність у здорових тканинах зазвичай дуже низька, а рівень експресії регулюється прозапальними цитокінами, факторами росту, гормонами, промоторами пухлин, тощо – тому

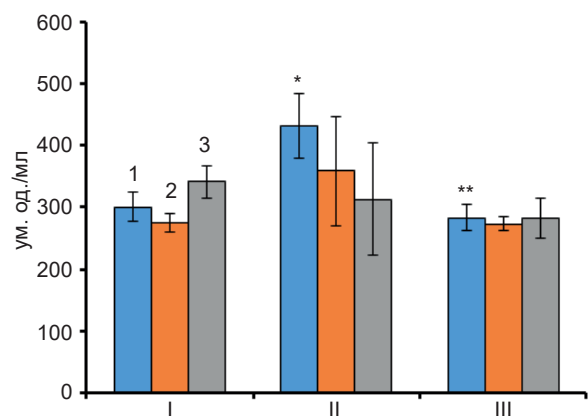


Рис. 2. Вміст ростових факторів у плазмі крові хворих на хронічний панкреатит та рак підшлункової залози: I – контроль, II – хронічний панкреатит, III – рак підшлункової залози; 1 – інсуліноподібний фактор росту 1, 2 – фактор росту фібробластів 2, 3 – трансформуючий фактор росту β 1; * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі значенням у хворих на хронічний панкреатит

активація ММП та посилене руйнування позаклітинного матриксу спостерігаються при широкому колі захворювань, що супроводжуються запаленням, фіброзом, а також за онкологічних розладів. ММП здатні розщеплювати практично будь-який компонент позаклітинного матриксу, що дає змогу раковим клітинам проникати та інфільтрувати підлеглу строму [8]. При цьому вони не протидіють фіброзу під час прогресування пухлини, і тому розглядаються як білки, що ремоделюють позаклітинний матрикс, на відміну від білків, що його розкладають [7]. Також ММП модулюють функції деяких молекул, залучених у проліферацію, хемоатракцію та міграцію, і регулюють різноманітні сигнальні шляхи.

Результати наших досліджень вказують на наявність достовірних змін вмісту окремих представників ММП як у плазмі крові, так і в тканині ПЗ хворих на ХП порівняно з контролем; при цьому більші зміни виявлено саме у патологічно зміненій тканині (рис. 3). Зростання вмісту ММП у плазмі крові хворих на ХП було максимальним для колагеназ ММП-1 та ММП-8 і становило 80% ($P < 0,05$), надалі зменшуючись у ряді: ММП-2, ММП-3, ММП-10 (див. рис. 3, а). Вірогідних змін у

плазмовій концентрації желатинази ММП-9 у хворих на ХП не виявлено. Також показано компенсаторне зростання вмісту ТІМП-1 у системній циркуляції хворих на ХП (на 67%, $P < 0,05$). За умов раку ПЗ плазмовий вміст усіх досліджуваних показників достовірно не відрізнявся від таких у контролі, ймовірно, через локальне залучення досліджених ферментів у процеси пухлиногенезу – саме на рівні тканини, в місці їхньої секреції, а не в системній циркуляції.

Ці припущення узгоджуються з результатами, отриманими нами при вивченні вмісту ММП та ТІМП-1 у тканині ПЗ, згідно з якими значення всіх досліджених показників хворих на обидві патології достовірно перевищували такі у контролі (див. рис. 3, б). У хворих на ХП максимальне зростання вмісту (в 3,2 раза) також було виявлено для колагенази ММП-1; концентрації інших ММП збільшувалися таким чином: ММП-8 – в 2,7 раза, ММП-9 та -10 – в 2,3 раза, ММП-3 – на 83%, ММП-2 – на 66%, а вміст ТІМП-1 зростав у 2,6 раза (для усіх показників $P < 0,05$). У разі раку ПЗ концентрація ММП у тканині перевищувала значення відповідних показників у контролі більш виражено: ММП-9 – в 3,3 раза, ММП-10 – в 3,1 раза,

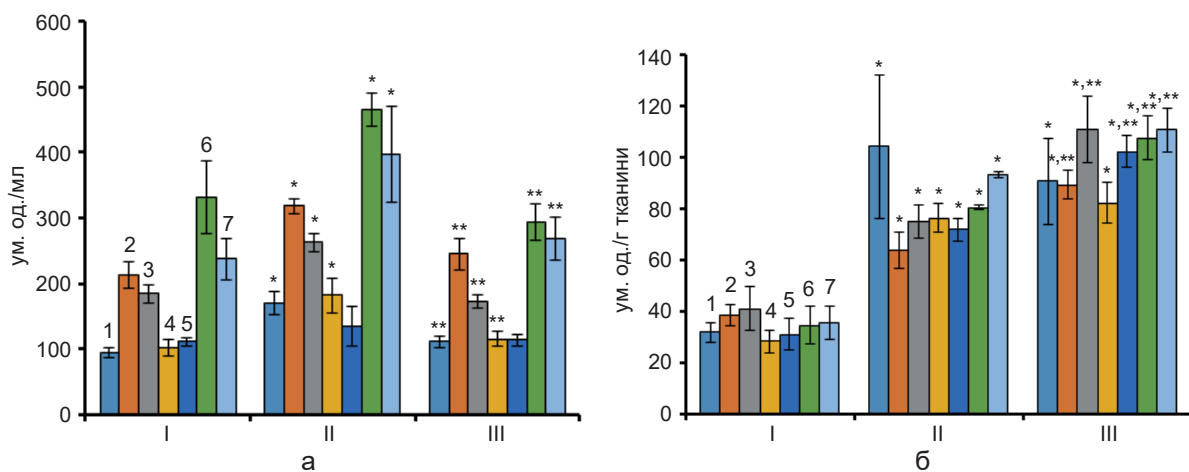


Рис. 3. Вміст матриксних металопротеїназ (ММП) у плазмі крові (а) та пухлинній тканині (б) хворих на хронічний панкреатит та рак підшлункової залози: I – контроль, II – хронічний панкреатит, III – рак підшлункової залози; 1 – ММП-1, 2 – ММП-2, 3 – ММП-3, 4 – ММП-8, 5 – ММП-9, 6 – ММП-10, 7 – ТІМП-1; * $P < 0,05$ порівняно зі значенням відповідного показника у контролі; ** $P < 0,05$ порівняно зі значенням відповідного показника у хворих на хронічний панкреатит

ММП-8 та -1 – в 2,9 раза, ММП-3 – в 2,7 раза та ММП-2 – в 2,3 раза. Вміст ТІМП-1 перевищував такий у контролі в 3,1 раза. Всі виявлені відміни були статистично значущими ($P < 0,05$). При цьому концентрації ММП-2, -3, -9, -10 та ТІМП-1 у тканині ПЗ хворих на рак достовірно перевищували значення відповідних показників у групі хворих на ХП.

Отримані нами результати щодо збільшення вмісту ММП у тканині ПЗ хворих на ХП та рак ПЗ узгоджуються з існуючими нині літературними даними. Останні вказують на активну роль цих ферментів у ремоделюванні позаклітинного матриксу, котре у разі хронічного запалення сприяє розвитку фіброзу ПЗ, а при раку полегшує інвазію, ангиогенез та метастазування.

Слід додати, що при ХП встановлено максимальне зростання – як у системній циркуляції, так і у тканині ПЗ – вмісту колагеназ ММП-1 та -8, тоді як у тканині хворих на рак ПЗ найбільші зміни були характерними для желатинази ММП-9. Виявлені нами особливості в концентраціях окремих ММП відповідають існуючим нині даним, згідно з якими ММП-1 розглядається як один із ключових ферментів у ремоделюванні тканини, секреція якого клітинами ПЗ у хворих на ХП зростає внаслідок збільшення вмісту прозапальних цитокінів ІЛ-1 β і ФНП- α . А в низці інших праць із використанням специфічних інгібіторів ММП підкреслюється особлива важливість характерних для тріади «загоєння ран, хронічний фіброз, розвиток/прогресування раку» желатиназ ММП-2 і -9 у прогресуванні раку ПЗ [3, 7]. Загалом, тоді як інформація про роль окремих ММП у патогенезі ХП є обмеженою і потребує подальших досліджень, для раку більш однозначно доведено зростання експресії генів різних ММП у тканині ПЗ. Водночас відомості щодо вмісту окремих представників ММП у системній циркуляції, так і щодо кореляції між сироватковими і (або) тканинними концентраціями ММП та розміром пухлини, статусом диферен-

ціювання, ураженням лімфатичних вузлів, а також із прогнозом хвороби й виживаністю пацієнтів є суперечливими [17].

Фізіологічним інгібітором вже активованих ММП, у тому числі ММП-1 та -9, є глікопротеїн ТІМП-1. Подібно до ІАП-1, який відіграє роль інгібітора ТАП і водночас сприяє прогресуванню пухлини, ТІМП-1 також не пригнічує пухлиногенез. Про це свідчить встановлене нами зростання його вмісту в ураженому органі в 3,1 раза в хворих на рак ПЗ. За даними літератури, ТІМП-1 має прогностичну та діагностичну цінність: його транскрипти виявляються як у стромі, так і в пухлинних клітинах ПЗ, експресія ТІМП-1 позитивно корелює зі ступенем десмоплазії в стромі пухлини, а також із дедиференціюванням пухлинних клітин. На експериментальних моделях ХП також показано, що експресія мРНК ТІМП-1 у ПЗ збільшується з прогресуванням захворювання, що свідчить про важливу роль ТІМП-1 у фіброгенезі. У плазмі крові цей показник є значно вищим у пацієнтів, хворих на ХП порівняно з контролем, а в хворих на рак ПЗ він залежить від стадії хвороби та наявності метастазів. Це підтверджується аналізом концентрації ТІМП-1 у системній циркуляції з урахуванням рTNM-класифікації пацієнтів і свідчить про те, що глікопротеїн може бути корисним маркером для оцінки стадії захворювання [18].

Найважливішу роль у розвитку і прогресуванні хвороб ПЗ відіграють зірчасті клітини, що за нормальних умов перебувають у стані спокою і активуються при пошкодженні ПЗ внаслідок впливу низки цитокінів та факторів росту, набуваючи здатності синтезувати компоненти позаклітинного матриксу для відновлення тканин. Зірчасті клітини ПЗ є основним джерелом білків позаклітинного матриксу, і тому при їхній тривалій активації формується дисбаланс між синтезом і деградацією білків позаклітинного матриксу, що в результаті призводить до фіброзу – явища, пов'яза-

ного з розвитком як ХП, так і раку ПЗ [5]. Крім того, ці клітини синтезують ММП та ТІМП, які ремоделюють паренхіму ПЗ [17]. Отже, активація зірчастих клітин та імунна інфільтрація ПЗ і, як наслідок, виявлені нами зміни вмісту різних ММП та їхнього інгібітора, є подіями, типовими як для ХП, так і для раку ПЗ і, вочевидь, спряженими з коливаннями вмісту цитокінів. Саме тому наступним етапом нашого дослідження став аналіз цитокінового профілю сироватки крові та тканини ПЗ пацієнтів, хворих на ХП та рак ПЗ, результати якого наведені на рис. 4.

Виявлено підвищений вміст більшості цитокінів у плазмі крові хворих на ХП порівняно з контролем (у разі прозапальних цитокінів максимальне зростання – на 95% було характерним для ІЛ-1 β , надалі зменшуючись у ряді: ІЛ-8, ІЛ-6, ФНП- α ; вміст протизапального ІЛ-4 зростає на 66% ($P < 0,05$). Концентрація протизапального цитокіну ІЛ-10 знижувалася на 26% ($P < 0,05$), а змін у вмісті ІФН- γ не спостерігалось. Також встановлено відсутність достовірних змін у вмісті цитокінів у плазмі крові хворих на рак ПЗ, за виключенням ІЛ-1 β , концентрація якого мала тенденцію до зростання.

Дослідження тканини ПЗ пацієнтів, хворих на ХП, встановило збільшений вміст усіх цитокінів, за виключенням ІЛ-10, відносно таких у контролі, причому це збільшення було більш вираженим, ніж у плазмі, і становило для протизапального ІЛ-4 – 2,9 раза, для прозапального ІЛ-6 – 2,7 раза, і далі у порядку зменшення: ФНП- α , ІЛ-8, ІЛ-1 β . Концентрація ІФН- γ зростала в 2,1 раза ($P < 0,05$). У зразках тканини ПЗ хворих на рак ПЗ вміст цитокінів також був збільшеним відносно такого у контролі. Серед прозапальних цитокінів максимально (в 3,3 раза) зростає вміст ФНП- α , також збільшувалися концентрації ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-8 (наведені у порядку зменшення змін); концентрації протизапальних цитокінів також були збільшені у 2,5 раза (ІЛ-4) та на 50% (ІЛ-10). Усі виявлені відміни були вірогідними ($P < 0,05$). Збільшеним у 3,1 раза ($P < 0,05$) виявився і вміст ІФН- γ . При цьому концентрації ІЛ-1 β , -8, -10, ФНП- α та ІФН- γ у пухлинній тканині хворих на рак ПЗ достовірно перевищували значення відповідних показників у групі хворих на ХП.

Отримані нами результати узгоджуються з даними інших досліджень. Так, за наявною інформацією, ключовими цитокінами, що спостерігаються в сироватці та тканині

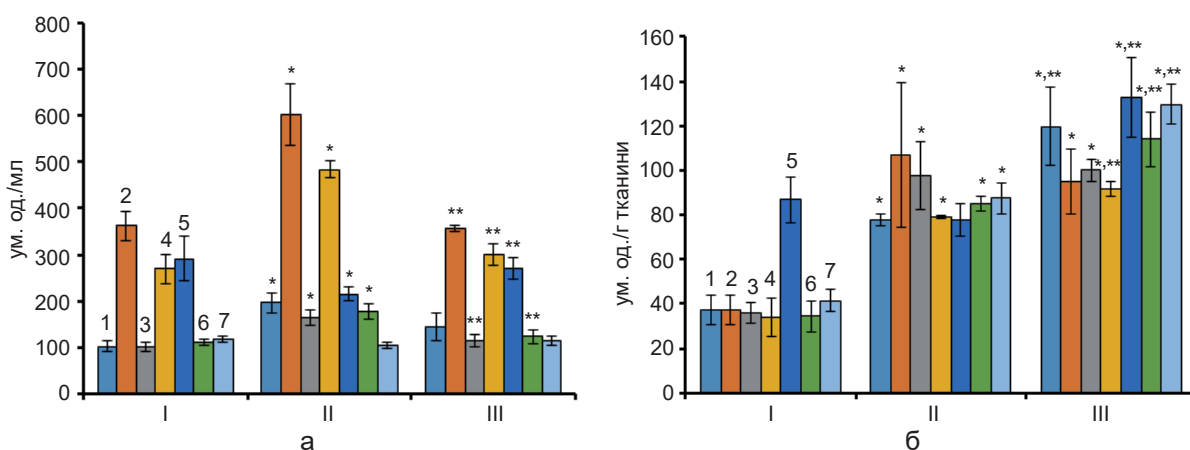


Рис. 4. Цитокіновий профіль плазми крові (а) та пухлинної тканини (б) хворих на хронічний панкреатит та рак підшлункової залози: I – контроль, II – хронічний панкреатит, III – рак підшлункової залози; 1 – інтерлейкін-1 β , 2 – інтерлейкін-4, 3 – інтерлейкін-6, 4 – інтерлейкін-8, 5 – інтерлейкін-10, 6 – фактор некрозу пухлин α , 7 – інтерферон γ ; * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі значенням у хворих на хронічний панкреатит

ПЗ у хворих на гострий панкреатит та ХП, є ІЛ-1 β , -6, -8, а також ФНП- α , причому їхні сироваткові концентрації корелюють із тяжкістю захворювання [17]. Деякі дослідники відмітили, що підвищення вмісту одного цитокіну у пухлинній тканині за раку ПЗ часто корелює з підвищенням й інших. Так, через наявність спільного активатора – транскрипційного ядерного фактора $\kappa\beta$, активність якого за раку ПЗ зростає – високі концентрації ІЛ-10 корелюють з високим вмістом ІЛ-8 і ІЛ-6. До того ж, цитокіни можуть індукувати виділення один одного: зокрема, ІЛ-6 індукує продукцію ІЛ-10 Т-клітинами [19].

За нашими результатами, вміст ІЛ-1 β та ІЛ-8 у плазмі крові хворих на ХП мав найбільше зростання відносно контролю, у тканині ПЗ зміни концентрацій цих цитокінів були найменшими, а максимальне зростання виявлено для протизапального ІЛ-4 та прозапальних ІЛ-6 й ФНП- α . У тканині ПЗ хворих на рак потужно зростали концентрації ФНП- α , ІЛ-1 β та ІЛ-6. Загалом, у тканині ПЗ пацієнтів, хворих на ХП, найбільші зміни були виявлені у вмісті протизапального ІЛ-4, тоді як у хворих на рак ПЗ максимально збільшувалися концентрації прозапальних цитокінів.

На тваринних моделях та в клінічних дослідженнях показано, що ІЛ-4 стимулює макрофаги та активує зірчасті клітини ПЗ, а його вміст при ХП підвищується, тоді як блокування ІЛ-4 пригнічує ушкодження органа та гальмує прогресування захворювання. Стромальні та пухлинні клітини при раку ПЗ експресують високі концентрації ІЛ-4 та його рецепторів, а сам він діє як фактор росту в ракових клітинах, сприяючи прогресії пухлини [4]. ІЛ-1 β є активатором низки ММП, хемокінів і факторів росту, і тому розглядається як стимулятор ангіогенезу, інвазивності та метастазування пухлин, внаслідок чого його вміст у тканині ПЗ хворих на рак ПЗ зростає сильніше, ніж у хворих на ХП. Висока концентрація ІЛ-1 β може бути

пов'язана з агресивним статусом пухлини та несприятливим прогнозом [3]. Водночас існуючі дані щодо циркулюючих концентрацій ІЛ-1 β є суперечливими. Є відомості про відсутність достовірних змін у вмісті ІЛ-1 β у сироватці пацієнтів як хворих на ХП, так і на рак ПЗ порівняно з контролем [19]. ІЛ-8 має виражений хемотаксичний ефект і регулює проліферацію клітин. Підвищені концентрації ІЛ-8 виявляються в місцях запалення; також є повідомлення про те, що ІЛ-8 може сприяти розвитку раку ПЗ, а високий вміст сироваткового ІЛ-8 передбачає гіршу виживаність та несприятливий прогноз [6]. ФНП- α стимулює синтез ММП, ангіогенез та метастазування при прогресуванні раку ПЗ, і його експресія у тканині ПЗ зростає у разі обох досліджуваних патологій [8]. Стосовно вмісту ФНП- α у системній циркуляції, то наявна інформація є суперечливою, зокрема, відомо про відсутність різниці в концентраціях ФНП- α у сироватці крові пацієнтів з ХП, раком ПЗ та умовно здорових осіб [5, 19].

Вважається, що найважливіша роль у розвитку ХП і раку ПЗ належить ІЛ-6. На тваринних моделях показано, що ХП пов'язаний із підвищеною концентрацією ІЛ-6 у тканині ПЗ, що сприяє пошкодженню ацинарних клітин. При раку ПЗ вміст ІЛ-6 у пухлинній тканині також є підвищеним – адже він залучається в ініціацію та прогресування пухлини і збільшує інфільтрацію макрофагами пухлинного мікрооточення. Також відомо про значно підвищені концентрації ІЛ-6 у сироватці крові у пацієнтів з ХП та раком ПЗ без достовірних відмінностей між цими групами [4]. Водночас дані інших досліджень відмічають, що сироватковий вміст ІЛ-6 у разі онкологічного ушкодження ПЗ в одних випадках можуть взагалі не відрізнятися від референтних значень, а в інших – навіть перевищувати значення цього показника в хворих на ХП. Це пояснюється кореляцією сироваткового вмісту ІЛ-6 з розміром пухлини, її агресивністю, розповсюдженням

метастазів, і в цілому – з несприятливим прогнозом. Можливо, у такому випадку підвищення концентрації ІЛ-6 у сироватці крові є більш пізнім явищем [20].

ІЛ-10, з одного боку, інгібує передачу сигналів через транскрипційний ядерний фактор $\kappa\beta$, виявляючи таким чином протипухлинний ефект, але, з іншого боку, має імуносупресивну дію і, отже, сприяє ухиленню ракових клітин від імунної відповіді. Високий вміст ІЛ-10 у сироватці асоціюється з поганим прогнозом при деяких онкологічних розладах [19]. Подібним чином плейотропний ефект на прогресування пухлини виявлений і для ІФН- γ : за раку ПЗ він може індукувати апоптоз ракових клітин чи стимулювати імуносупресивні механізми або ж сприяти метастазуванню пухлини [4]. Визначальним фактором стосовно того, чи буде функція цього цитокіну про- чи протипухлинною, вважається концентрація ІФН- γ в пухлинному мікрооточенні. В експериментальних дослідженнях [21] показано, що пухлини, які отримували низькі дози ІФН- γ , набували метастатичних властивостей, тоді як інфузія високої дози призводила до регресії пухлини. Також на моделях тварин виявлено, що нестача продукції ІФН- γ спричиняє загострення хронічного панкреатиту, а введення ІФН- γ викликає протизапальну дію та уповільнює розвиток гострого панкреатиту.

Відомо, що одними з головних регуляторів функцій цитокінів є ММП. Наприклад, ММП-9 посилює активацію прозапальних цитокінів ФНП- α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-8. У свою чергу активованій ФНП- α сприяє інвазії та міграції пухлинних клітин внаслідок стимулювання секреції ММП-9 у мікросередовище пухлини. Водночас ММП і самі є мішенями запальної опосередкованої цитокінами регуляції. Так, ІЛ-6 індукує експресію генів ММП-1 та ММП-3, тоді як ІФН- γ пригнічує експресію зазначених генів, а також гена ММП-9 [22].

ВИСНОВКИ

1. За умов хронічного запалення при ХП значення переважної більшості досліджуваних параметрів (вміст плазміногену, протеїну С, тромбомодуліну, ІФР-1, ММП-1, -2, -3, -8, -10, ТІМП-1, ІЛ-1 β , -4, -6, -8, а також ФНП- α) на рівні системної циркуляції виражено зростали. Зважаючи на те, що достовірні відхилення в плазмі крові хворих на рак ПЗ вдалося виявити лише для протеїну С та тромбомодуліну, інші параметри, зокрема, вміст ММП та цитокінів, можуть слугувати перспективним діагностичним критерієм для визначення переходу хронічного запалення у ПЗ до злоякісної трансформації.

2. На противагу дослідження вищезазначених параметрів у патологічно зміненій тканині виявило суттєве підвищення значення більшості з них за умов раку ПЗ. Так, вміст ММП-2, -3, -9, -10 й ТІМП-1, а також всіх досліджуваних інтерлейкінів (окрім ІЛ-4 і -6) у тканині ПЗ хворих на онкопатологію, достовірно перевищував значення відповідних показників у хворих на ХП.

3. Протизапальний цитокін ІЛ-10 виявився єдиним, для якого було зафіксовано зниження вмісту в плазмі крові за умов ХП, тоді як за умов раку ПЗ його концентрація лишалася на рівні контрольних значень. У гомогенаті тканини вміст ІЛ-10 при запаленні залишався незмінним, а при раку ПЗ – виражено зростав. Вочевидь, підвищення вмісту ІЛ-10, яке не спостерігається за умов ХП, може допомагати пухлинним клітинам уникати розпізнання імунною системою, а відтак блокувати їхнє виявлення та елімінацію.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

**T.B.Synelnik¹, O.O.Kravchenko¹, O.S. Kostiuk¹,
O.M.Savchuk¹, S.A. Sukhodolia², L.I. Ostapchenko¹**

THE TRIGGER COMPONENTS OF THE PROTEOLYTIC SYSTEM AND THEIR MODULATORS CONTENTS UNDER PANCREATIC PATHOLOGIES DEVELOPMENT

¹ Taras Shevchenko National University of Kyiv,
Educational and Scientific Centre "Institute of Biology and
Medicine"; e-mail: synelnik@gmail.com; maxima@knu.ua;
² National Pirogov Memorial Medical University of Vin-
nytsya, Ukraine

The content of the plasminogen activation system components (plasminogen, plasminogen tissue activator, and its inhibitor PAI-1) was investigated as well as the concentration of thrombomodulin, protein C, matrix metalloproteinases (MMP -1, -2, -3, -8, -9, -10) and their inhibitor TIMP, growth factors content (such as transforming growth factor- β 1, insulin-like growth factor-1, fibroblasts growth factor-2) and cytokine profile (interleukines IL-1 β , -4, -6, -8, -10, tumor necrosis factor, interferon- γ in patients with chronic pancreatitis (CP) and pancreatic cancer (PC) were established. Khmelnytsky Regional Clinical Hospital patients aged 28-89 were selected for this study: 20 people with chronic pancreatitis (group CP); 20 people with pancreatic cancer (group PC); 20 conditionally healthy persons (control). Blood plasma samples and pancreatic tissue homogenates were obtained from all the patients. The studied indicators' content in the experimental materials was determined by the enzyme-linked immunosorbent assay using appropriate antibodies. At the level of systemic circulation, a statistically significant increase was found in most of the studied parameters under the CP conditions. However, PC was characterized by an increase of two blood plasma indications only (thrombomodulin and protein C). In contrast, the pancreatic sample tissue examination for both aforementioned pathologies revealed significant changes in the content of most metalloproteinases and cytokines under PC. This indicates the development of metastasis, angiogenesis, and immunomodulation-aimed local biochemical processes in the affected organ.

Key words: chronic pancreatitis; pancreatic cancer; matrix metalloproteinases; cytokines; plasminogen; growth factors.

REFERENCES

- Nandy D, Mukhopadhyay D. Growth factor mediated signaling in pancreatic pathogenesis. *Cancers*. 2011; 3(1):841-71.
- Whitcomb D. Mechanisms of Disease: advances in understanding the mechanisms leading to chronic pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2004;1:46-52.
- Sewpaul I A, French J, Charnley R. Proteases in pancreatic disease. In: Lendeckel U, Hooper N (eds.). *Proteases in Gastrointestinal Tissue*. Netherlands: Springer; 2006. p 89-121.
- Kandikattu HK, Venkateshaiah SU, Mishra A. Chronic pancreatitis and the development of pancreatic cancer. *Endocrin Metab Immun Disord Drug Targets*. 2020; 20(8):1182-210.
- Gasiorowska A, Talar-Wojnarowska R, Kaczka A, Borkowska A, Czupryniak L, Małeczka-Panas E. Subclinical inflammation and endothelial dysfunction in patients with chronic pancreatitis and newly diagnosed pancreatic cancer. *Dig Dis Sci*. 2016;61:1121-29.
- Fang L, Xu Q, Qian J, Zhou J-Y. Aberrant factors of fibrinolysis and coagulation in pancreatic cancer. *OncoTargets Ther*. 2021;14:53-65.
- Rybinski B, Franco-Barraza J, Cukierman E. The wound healing, chronic fibrosis, and cancer progression triad. *Physiol Genom*. 2014;46:223-44.
- Rakashanda S, Rana F, Rafiq S, Masood A, Amin S. Role of proteases in cancer: A review. *Biotechnol Molecular Biol Rev*. 2012;7(4):90-101.
- Crowther JR. The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol*. 2000;149:III-IV, 1-413.
- Koval TV, Ishchuk TV, Grebinyk DM, Raetska YB, Sokur OV, Savchuk OM, Ostapchenko LI. Matrix metalloproteinase functioning in case of esophagus acid burn. *Biomed Res*. 2018;29(16):3169-73.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding. *Anal Biochem*. 1976;86:193-200.
- Baluka D, Urbanek T, Lekstan A, Swietochowska E, Wiaderkiewicz R, Kajor M, Jedrzejewska-Szypulka H, Kusnierz K, Lampe P. The role of the tissue plasminogen activator as a prognostic and differentiation factor in patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *J Physiol Pharmac*. 2016; 67(1): 93-101.
- Loghmani H, Conway EM. Exploring traditional and nontraditional roles for thrombomodulin. *Blood*. 2018;132(2):148-58.
- Lindahl AK, Boffa MC, Abildgaard U. Increased plasma thrombomodulin in cancer patients. *Thromb Haemost*. 1993;69(2):112-4.
- Włodarczyk B, Borkowska A, Włodarczyk P, Małeczka-Panas E, Gasiorowska A. Insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor binding protein 2 serum levels as potential biomarkers in differential diagnosis between chronic pancreatitis and pancreatic adenocarcinoma in reference to pancreatic diabetes. *Gastroenterology*. 2021; 16(1):36-42.
- Meggiato T, Plebani M, Basso D, Panozzo MP, Del Favero G. Serum growth factors in patients with pancreatic cancer. *Tumour Biol*. 1999;20(2):65-71.
- Slapak EJ, Duitman J, Tekin C, Bijlsma MF, Spek CA. Matrix metalloproteinases in pancreatic ductal adenocarcinoma: key drivers of disease progression? *Biology*. 2020;9(4):80.
- Prokopchuk O, Grünwald B, Nitsche U, Jäger C, Prokopchuk OL, Schubert EC, Friess H, Martignoni ME, Krüger A. Elevated systemic levels of the matrix

- metalloproteinase inhibitor TIMP-1 correlate with clinical markers of cachexia in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. BMC Cancer. 2018;18(1):128.
19. Ebrahimi B., Tucker SL, Li D, Abbruzzese JL, Kurzrock R. Cytokines in pancreatic carcinoma. Cancer, 2004;101: 2727-36.
20. van Duijneveldt G, Griffin MDW, Putoczki TL. Emerging roles for the IL-6 family of cytokines in pancreatic cancer. Clin Sci (Lond). 2020;134(16):2091-115.
21. Jorgovanovic D, Song M, Wang L, Zhang Y. Roles of IFN- γ in tumor progression and regression: a review. Biomark Res. 2020;8:49.
22. Pereira JL, Gomes M, Teixeira AL, Coelho A, Rolfo C, Araújo A. Potential and importance of metalloproteinases and interleukins in inflammation and metastasization in non-small cell lung cancer. Transl Cancer Res. 2018;7(3):782-95.

*Матеріал надійшов
до редакції 12.08.2022*