

Розподіл серинових протеаз у плазмі крові та підшлунковій залозі за хронічного панкреатиту та онкопатології

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

Метою дослідження було оцінити розподіл трипсиноподібних серинових протеаз (ТСП) між системною циркуляцією та тканиною й проаналізувати особливості їх залучення в деградацію компонентів позаклітинного матриксу у хворих із патологіями підшлункової залози (ПЗ). У дослідженні брали участь 60 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, з яких надалі методом афінної хроматографії одержано фракції ТСП. Встановлено, що вміст ТСП у плазмі хворих із патологіями є вищим, а у гомогенатах – нижчим відносно значень відповідних показників у контролі. Методом диск-електрофорезу у поліакриламідному гелі виявлено, що фракції ТСП, отримані з плазми крові пацієнтів усіх груп, містили велику кількість високомолекулярних протеїнів (150–100 кДа), тоді як ТСП з тканини ПЗ хворих із патологіями – в основному низькомолекулярні білки (35–10 кДа). Методом ензим-електрофорезу встановлено, що в усіх фракціях ТСП наявні ферменти із фібриноgeno-, желатино- та колагенолітичною активностями. У плазмі перші представлені середньомолекулярними білками (100–67 і 67–35 кДа), а дві останні групи включають низку протеїнів з високою (150–100 кДа) та дуже високою молекулярною масою (≥ 150 кДа). У гомогенатах фібриногенолітичну активність мають виключно низькомолекулярні білки, а желатинази і колагенази є білками із середньою та низькою молекулярною масою. Отримані результати вказують на різницю у компонентах фракцій ТСП, отриманих із плазми крові та тканини ПЗ хворих із досліджуваними патологіями, а також свідчать про суттєві відмінності у процесах ремоделювання позаклітинного матриксу за хронічного панкреатиту та раку ПЗ.

Ключові слова: хронічний панкреатит; рак підшлункової залози; трипсиноподібні серинові протеази; електрофорез.

ВСТУП

Рак підшлункової залози (ПЗ) становить близько 10% усіх видів раку органів травлення, причому 90% припадає на протокову аденокарциному – один із найлетальніших видів раку із середньою виживаністю пацієнтів менше ніж 6 міс після встановлення діагнозу. Дані численних епідеміологічних досліджень свідчать про те, що гострий і хронічний панкреатити пов'язані з розвитком раку ПЗ

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

загальними факторами ризику та залученням у патогенез спільних механізмів, таких як інфільтрація стромы ПЗ імунними клітинами, активація прозапальних сигнальних шляхів та окисний стрес. Хронічне неконтрольоване запалення формує в органі збагачене цитокінами, хемокінами та активними формами кисню середовище, що сприяє метастазуванню та неопластичній трансформації [1]. Патологічною ознакою хронічного панкреатиту (ХП) є прогресуючий фіброз,

розвиток якого пов'язаний із зірчастими клітинами ПЗ, що після активації набувають здатності виробляти біологічно активні сполуки та надлишкову кількість компонентів позаклітинного матриксу (ПМ) [2]. У разі онкопатології ракові та стромальні, у тому числі зірчасті, клітини так само виділяють надлишкові кількості білків ПМ, а також безліч медіаторів, які сприяють фіброгенезу, прогресії пухлини та зумовлюють стійкість до протиракової терапії. Фіброз у разі раку ПЗ поєднується з гіперпроліферацією міофібробластоподібних клітин, викликаючи десмопластичну реакцію, що є типовою ознакою пухлин ПЗ. Стромальні клітини також секретують різноманітні протеази, котрі залучаються у деградацію та ремоделювання ПМ.

Роль протеаз у пухлиногенезі є значно складнішою за їх участь у механічній деградації та ремоделюванні ПМ. Регулюючи низку сигнальних каскадів, вони впливають на експресію цитокінів та ростових факторів, їх посттрансляційну модифікацію, біодоступність, а також, вибірково розщеплюючи ці сполуки, спричиняють активацію, інактивацію або змінюють їхню спорідненість до рецептора. Через вплив на мережу цитокінів протеази залучаються у модуляцію запальних реакцій та імуносупресивних ефектів, що, залежно від низки умов, може мати стимулювальну чи пригнічувальну дію на пухлину [3].

У сукупності складну мережу протеаз, їх інгібіторів та субстратів, поєднаних між собою певними взаємодіями, називають деградомом. Протеази, що вивільнюються з ракових і стромальних клітин, формують специфічний раковий деградом, який зумовлює екстенсивне ремоделювання ПМ, а через зміни цитокінової мережі залучається у всі стадії прогресування раку [4].

Згідно з базою даних MEROPS, понад третину всіх протеолітичних ферментів організму людини становлять серинові протеази, згруповані у 13 кланів і 40 родин [5]. Трипсиноподібні серинові протеази (ТСП)

у своїй структурі містять трипсиноподібну складку (S1) з активним центром, і тому належать до родини S1 клану PA. Вони зазвичай жорстко регулюються ендогенними інгібіторами і діють позаклітинно, залучаючись у різноманітні фізіологічні процеси та ремоделювання ПМ під час загоєння ран, фіброгенезу і канцерогенезу [6].

Метою нашої роботи було оцінити розподіл ТСП між системною циркуляцією та тканиною, а також проаналізувати особливості їх залучення в деградацію компонентів ПМ у хворих на ХП та рак ПЗ.

МЕТОДИКА

Для дослідження було відібрано 60 осіб віком від 28 до 89 років і сформовано групи по 20 осіб у кожній: I – умовно здорові люди (контроль) без патології ПЗ, що не мали клінічних ознак захворювання, фіброзу і змін у структурі та архітектоніці ПЗ; II – хворі на ХП у стадії загострення; III – хворі на рак ПЗ. Всі вони 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. Пацієнти добровільно надали письмову згоду на участь у цих дослідженнях. Критеріями включення до групи хворих на ХП вважали абдомінальний больовий синдром та гістологічно підтверджені структурні зміни ПЗ (хронічне запалення, фіброз, ацинарна атрофія, жирова трансформація та розвиток аномальних проток) із порушенням зовнішньосекреторної функції ПЗ. Критеріями включення до групи хворих на рак ПЗ були дезорганізація архітектоніки циліндричного, муцинозного епітелію дрібних панкреатичних протоків з ядерною атипією (ядра цих клітин

збільшені, плейоморфні, хибно орієнтовані), тобто морфологічні зміни, характерні для третьої, найвищої стадії панкреатичної внутрішньоепітеліальної неоплазії, яку часто позначають як панкреатичну внутрішньопротокову карциному 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 принципи проведення наукових медичних досліджень за участю людини.

Передопераційні зразки плазми були відібрані вдень перед операцією натщесерце, а зразки тканини ПЗ – інтраопераційно. У контрольній групі зразки тканини ПЗ було отримано під час проведення патологоанатомічного розтину 20 померлих пацієнтів, які за життя не мали патології ПЗ. Для одержання 10%-го гомогенату 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.

Фракцію ТСП отримували методом афінної хроматографії з сорбентом бензамідинсефарозою. Бензамідин – селективний інгібітор саме трипсиноподібних ферментів, тому застосування цього виду хроматографії є доцільним при дослідженні ТСП [7]. Використовували колонку з бензамідинсефарозою, попередньо врівноважену 10 об'ємами буфера тріс-НСІ (10 ммоль/л, рН 8,0). Для очищення від незв'язаного матеріалу після нанесення колонку промивали 15 об'ємами буфера тріс-НСІ (10 ммоль/л, рН 8,0). Для проведення елюції готували буферний розчин такого складу: 50 ммоль/л гліцин-НСІ і 1 моль/л NaCl (рН 3,0).

Враховуючи те, що концентрація загального білка у виділених фракціях ТСП

відповідає кількості досліджуваних ензимів, їх вміст у фракціях, отриманих із плазми та гомогенатів, визначали методом Бредфорд і виражали у міліграмах на 1 мл (плазма) та міліграмах на 1 г тканини (гомогенати).

Надалі готували проби для проведення електрофорезу в поліакриламідному гелі та ензим-електрофорезу. Для цього отримані в результаті афінної хроматографії аліквоти проб змішували з 25%-ю трихлороцтовою кислотою у співвідношенні 1:1 і залишали на 10 хв при кімнатній температурі, після чого центрифугували протягом 5 хв при 10000g. Надосадову рідину видаляли і замінювали на 96%-й етанол, а потім знову центрифугували за тих самих умов. Цю процедуру проводили двічі. Після випаровування залишків спирту до осаду додавали буфер для приготування проб для електрофорезу, що містив 0,005 моль/л тріс-НСІ-буфер (рН 8,8), 2%-й додецилсульфат натрію (ДСН), 10%-ву сахарозу та 0,01%-й бромфеноловий синій. Для подальшого проведення диск-електрофорезу зразки прогрівали впродовж 1 хв, тоді як проби для ензим-електрофорезу нагріванню не піддавали. Для проведення електрофорезу за відновлювальних умов до проб попередньо додавали β-меркаптоетанол.

Диск-електрофорез здійснювали за методом Леммлі у поліакриламідному гелі за наявності ДСН. Використання концентруючого гелю дає змогу результативно розділяти білки у діапазоні молекулярних мас від 10 до 150 кДа, що цілком відповідало вимогам експерименту. Електрофорез проводили у пластинах товщиною 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого гелю (4%) та 36 мА для розділяючого (10%). Після закінчення розділення досліджуваних зразків, яке контролювали за переміщенням фронту барвника, гелі поміщали у фіксуючозабарвлюючу суміш (2,5%-й кумасі діамантовий синій G-250, 10%-й етанол, 10%-ва оцтова кислота та 15%-й ізопропанол). Гелі фарбували протягом 15 хв із використанням автоматичного шейкера. Залишки барвника

видаляли кип'ятінням у 2–8%-му розчині оцтової кислоти.

Ензим-електрофоретичний аналіз проводили згідно з методом Остапченко та співавт. [8]. Розділяючий гель (12%) полімеризували за наявності желатину, фібриногену та колагену з розрахунку 1 мг/мл. Після закінчення електрофорезу гелі відмивали у 2,5%-му розчині тритону X-100 протягом 1 год для видалення залишків ДСН. Надалі їх заливали 0,05 моль/л тріс-НСІ-буфером, рН 7,4, що містив 0,13 моль/л NaCl, та інкубували протягом 12 год. Фарбували та фіксували гелі за стандартним протоколом.

Статистичну обробку результатів здійснювали 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 вірогідними при $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведених досліджень виявили зростання вмісту ТСП у плазмі крові хворих із патологією ПЗ (ХП – на 29%, рак – на 85% порівняно із контролем, $P < 0,05$) (рис. 1), тоді як їх вміст у тканині знижувався (ХП – на 69%; рак ПЗ – на 89% відносно контрольних значень, $P < 0,05$).

Ферменти з групи ТСП мають молекулярну масу 16–95 кДа і можуть існувати у моно- чи олігомерній формах [6]. Більшість цих ензимів є секреторними, але деякі з них містяться у субклітинних структурах або на поверхні клітин [9]. Найбільш дослідженими з них є компоненти коагуляційного каскаду й системи комплементу, а також триптаза, матриптаза, калікреїни тощо.

На наступному етапі дослідження було проведено диск-електрофорез фракцій ТСП, отриманих із плазми крові та гомогенатів тканини ПЗ пацієнтів досліджуваних груп, і здійснено аналіз білкових фракцій із використанням програми TotalLab. Фракція, отримана з плазми пацієнтів контрольної групи, за невідновлювальних умов проведення електрофорезу розподілилася на 4, фракція ТСП хворих на ХП – на 8, а хворих на рак ПЗ – на 13 фракцій (рис. 2, а). Отримані результати можуть свідчити про появу в плазмі за досліджуваних патологій нових білків із групи ТСП або ж бути наслідком вивільнення активних протеаз із комплексів з їх фізіологічними інгібіторами в умовах патологічного процесу.

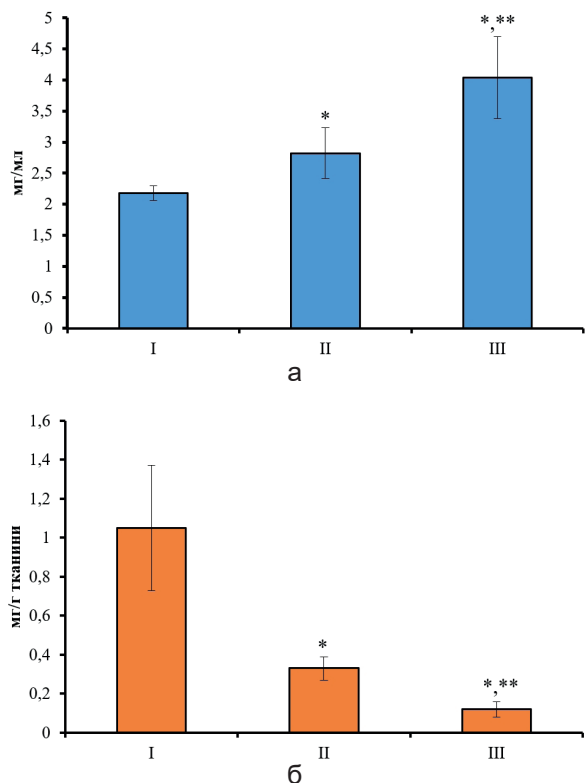


Рис. 1. Вміст трипсиноподібних серинових протеаз у плазмі крові (а) та в гомогенаті тканини підшлункової залози (б) хворих на хронічний панкреатит (ХП) та рак підшлункової залози (ПЗ): I – контроль, II – ХП, III – рак ПЗ; * $P < 0,05$ порівняно з контролем; ** $P < 0,05$ порівняно зі значенням відповідного показника у хворих на ХП

При проведенні електрофорезу у відновлювальних умовах фракція, отримана з плазми крові пацієнтів контрольної групи, розподілилася на 9, фракція ТСП хворих на ХП – на 12, а хворих на рак ПЗ – на 13 фракцій (див. рис. 2, б). Для зручності подальшого аналізу окремі фракції було об'єднано у групи відповідно до їх молекулярної маси: білки з дуже високою масою (≥ 150 кДа); високо- (150–100 кДа); середньо- (100–67 і 67–35 кДа); низькомолекулярні білки (35–10 кДа); пептиди (<10 кДа).

Згідно з цим розподілом, при проведенні електрофорезу в невідновлювальних умовах (див. рис. 2, а) збільшення кількості

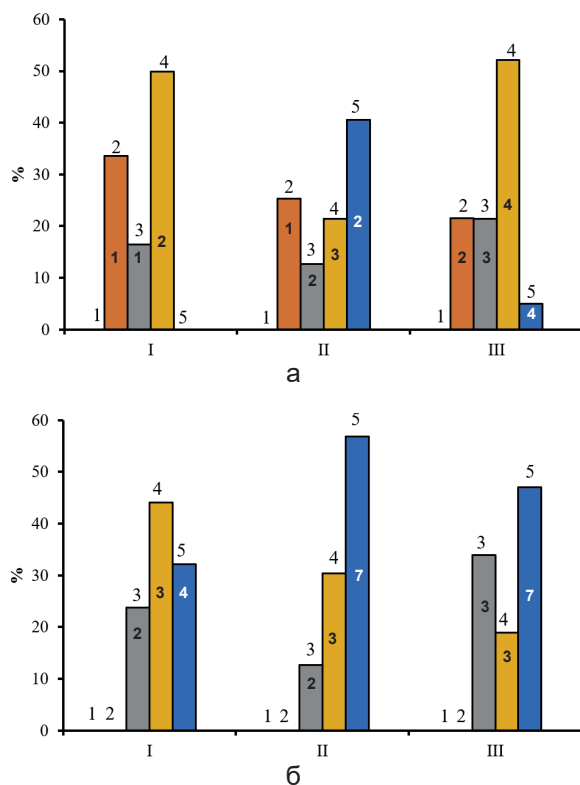


Рис. 2. Відсотковий вміст білків різної молекулярної маси у фракції трипсиноподібних серинових протеаз, отриманої з плазми крові хворих на хронічний панкреатит (ХП) та рак підшлункової залози (ПЗ) при проведенні електрофорезу за невідновлювальних (а) та відновлювальних (б) умов: I – контроль, II – ХП, III – рак ПЗ; 1 – ≥ 150 кДа, 2 – 150–100 кДа, 3 – 100–67 кДа, 4 – 67–35 кДа, 5 – 35–10 кДа; арабськими цифрами в межах стовпчиків позначено кількість фракцій білків у групі відповідної молекулярної маси

фракцій ТСП, отриманих із плазми хворих на ХП, відбулося внаслідок появи двох нових фракцій низькомолекулярних білків та двох фракцій середньомолекулярних протеїнів, а із плазми хворих на рак ПЗ – через появу додаткових фракцій високо- (+1), середньо- (+4) та низькомолекулярних білків (+4). При цьому в контролі у фракції ТСП переважали протеїни з високою та середньою молекулярною масою; у хворих на ХП і рак ПЗ знижувався вміст високомолекулярних білків (хоча у разі онкопатології додалася одна нова фракція), натомість у хворих на рак зростав відсоток середньомолекулярних білків, а у хворих на ХП – низькомолекулярних компонентів. При проведенні електрофорезу за відновлювальних умов (див. рис. 2, б) кількість фракцій ТСП плазми крові пацієнтів із обома патологіями збільшувалася внаслідок появи трьох нових фракцій низькомолекулярних білків – можливо, через руйнування димерних форм ензимів, стабілізованих дисульфідними зв'язками (адже більшість ТСП, у тому числі активатор плазміногену урокіназного типу – УАП, плазмін, тромбін, калікреїни тощо, під час посттрансляційної модифікації зазнають обмеженого протеолізу з подальшим формуванням таких димерів), а в хворих на рак ПЗ – також через появу додаткової фракції протеїнів із масою 100–67 кДа. Фракція високомолекулярних ТСП при цьому була відсутньою, а вміст фракції із молекулярною масою 67–35 кДа за умов патологій ПЗ знижувався.

Наявна в літературі інформація щодо молекулярних мас ТСП, залучених у патогенез онкологічних та запальних захворювань, підсумована у таблиці.

До високомолекулярних ТСП перш за все належать активна форма триптази (тетрамер, стабілізований нековалентними зв'язками), комплекси активованих ензимів з їх інгібіторами, а також неактивні чи заінгібовані форми матриптази. За фізіологічних умов у кров надходять неактивні мономери триптази, а тетрамери накопичуються у секреторних

Молекулярні маси деяких трипсиноподібних серинових протеаз, їх зимогенів та функціональних комплексів

| Молекулярна маса, кДа | Трипсиноподібні серинові протеази | |
|-----------------------|--|--|
| | Активні | Зимогени та заінгібовані |
| 150–100 | Триптаза (тетрамер), 134 кДа | Матриптаза (гомодимер), 140 кДа Комплекси низки активованих протеаз (у тому числі матриптази та тканинного активатору плазміногену) з їх фізіологічними інгібіторами (~120 кДа) |
| 100–67 | Тканинний активатор плазміногену, 68 кДа Плазмін, 83 кДа Матриптаза, 70 кДа | Комплекси низки протеаз (у тому числі активатора плазміногену урокіназного типу) з їх фізіологічними інгібіторами (для низько- й високомолекулярних форм активатора плазміногену урокіназного типу - 75–92 кДа) Плазміноген, 92 кДа Протромбін, 72 кДа Прекалікреїни, 85–88 кДа Матриптаза, 95 кДа |
| 67–35 | Високомолекулярний активатор плазміногену урокіназного типу, 54 кДа Тромбін, 37 кДа Трансмембранна серинова протеаза-4, 48,2 кДа | Попередник активатора плазміногену урокіназного типу, 50 кДа |
| 35–10 кДа | Низькомолекулярний активатор плазміногену урокіназного типу, 33 кДа Триптаза (мономер), 31–38 кДа Калікреїни, 28–33 кДа Трипсин, 24 кДа | Трипсиноген, 24 кДа |

гранулах мастоцитів, де стабілізуються за допомогою гепарину і вивільняються лише при їх активації. Тому активність триптази у системній циркуляції залежить від загальної кількості мастоцитів, статусу їх активації та генетично визначеного рівня біосинтезу триптаз [10]. Остання залучена в ангиогенез, деградацію ПМ та прогресування низки епітеліальних ракових захворювань – так, відомо, що при раку ПЗ строма пухлини інфільтрується мастоцитами, які підлягають активації й деградації [1]. Водночас слід зазначити,

що умови проведення електрофорезу в наших дослідженнях, а саме, застосування ДСН, спричиняють руйнування нековалентних зв'язків, і, отже, не дають змоги встановити наявність у досліджуваному матеріалі як тетрамера триптази, так і наведених у таблиці комплексів із високою та середньою молекулярною масою. Матриптази є трансмембранними ензимами, високі рівні експресії яких пов'язані з різними видами раку, проте в загальній циркуляції їх активність зазвичай не виявляється.

Доведене нами збільшення відсотка білків із масою 100–67 кДа у хворих на рак ПЗ може бути наслідком вивільнення при прогресуванні пухлини тканинного активатора плазміногену та (або) плазміну із комплексів з їх фізіологічними інгібіторами (див. таблицю). Плазмін утворюється із плазміногену за участю активаторів плазміногену урокіназного чи тканинного типу. Згідно з даними літератури, у гомогенатах тканин і плазмі крові хворих на рак ПЗ виявляють високий вміст обох активаторів, причому вміст тканинного активатора плазміногену (ТАП) у гомогенатах тканини ПЗ зростає у ряді: контроль, хворі на ХП, хворі на рак ПЗ. У пацієнтів з онкопатологією концентрації ТАП у крові є вищими порівняно з гомогенатами [11]. Плазмін може деградувати компоненти ПМ безпосередньо чи активувати інші ензими, що залучаються у ремоделювання матриксу. Також він активує низку асоційованих із ПМ латентних факторів росту, що сприяє проліферації та міграції пухлинних клітин, ангіогенезу та лімфангіогенезу.

До ТСП із молекулярною масою 67–35 кДа належить перш за все каталітично активний дволанцюговий високомолекулярний УАП, молекула якого містить дисульфідний зв'язок (див. таблицю). При його розщепленні низкою протеаз утворюється каталітично активний низкомолекулярний УАП [11]. Повідомляється про підвищений вміст активатора плазміногену цього типу при раку ПЗ, який корелює зі скороченням виживаності пацієнтів. УАП діє на широке коло субстратів і спричиняє неконтрольоване ремоделювання ПМ строми пухлини, сприяючи інвазії пухлинних клітин, міграції та метастазуванню.

Компоненти фібринолітичного шляху також відіграють певну роль у патогенезі ХП, призводячи до літичних уражень, індукованих плазміном, та викликаючи фібротичні ушкодження ПЗ через плазмінопосередковану активацію латентного трансформуючого фактора росту $\beta 1$ [12]. Інший представник

ТСП з групи протеїнів із молекулярною масою 67–35 кДа – тромбін (див. таблицю) – діючи через рецептор, що активується протеазою-1, залучається у фіброгенез та прогресію раку, індукуючи проліферацію клітин, ріст пухлини, ангіогенез і метастазування [6].

Поява низкомолекулярних білків загалом характерна для фракції ТСП плазми крові хворих із патологіями ПЗ і може бути спричинена як надходженням у кров ензимів із ушкодженого органа, так і індукцією при дії цитокінів, хемокінів, ростових факторів, активних форм кисню синтезу нових ферментів цієї групи, таких як низкомолекулярний УАП, мономери трипсази, калікреїни та трипсин (див. таблицю). Так, за фізіологічних умов основним джерелом трипсиногену є панкреатичні ацинарні клітини, що продукують панкреатичний ацинарний трипсиноген. У разі раку ПЗ виробляється асоційований із пухлиною трипсиноген. УАП активує обидва його типи, перетворюючи на трипсин, який залучається в деградацію ПМ та активацію латентних форм низки матриксних металопротеїназ та серинових протеаз, сприяючи інвазії та метастазуванню. Діючи через рецептор, що активується протеазою-2, трипсин не лише бере участь у пухлиногенезі, але й залучається у розвиток фіброзу при ХП. Калікреїни також відіграють важливу роль у ремоделюванні ПМ та ангіогенезі. При прогресуванні пухлини вони вивільняються із ракових і стромальних клітин у пухлинне середовище, де проявляють свою протеолітичну дію, активуючи сигнальні шляхи та модулюючи експресію генів і білків, важливих для росту та інвазії пухлини. Із 15 секретованих калікреїнів до ТСП належать калікреїн-1, -2, -4, -5, -6, -8, -10, -11, -12, -13, -14, -15. Калікреїн-6 і -10 мають виражену експресію в тканині ПЗ хворих на рак цього органа і корелюють з більш агресивним перебігом захворювання та поганим прогнозом для пацієнта [4]. Інші дослідження свідчать про те, що калікреїн-6, -7, -8, -10 і -11 є коексп-

ресованими та коактивованими в тканинах хворих на рак ПЗ, причому високі рівні їх експресії корелюють один з одним і пов'язані з меншою виживаністю [13]. Серед цього переліку калікреїн-6 є вихідною протеазою, що може активуватися плазміном і УАП, і експресія якої, ймовірно, корелює з диференціацією пухлини: недиференційовані пухлини з ядерною атипією зазвичай мають вищу експресію калікреїну цього типу [3].

Також нами було проведено аналіз гомогенатів тканини ПЗ. У контрольній групі після проведення диск-електрофорезу за невідновлювальних умов фракція ТСП розподілилася на 3, в хворих на ХП було

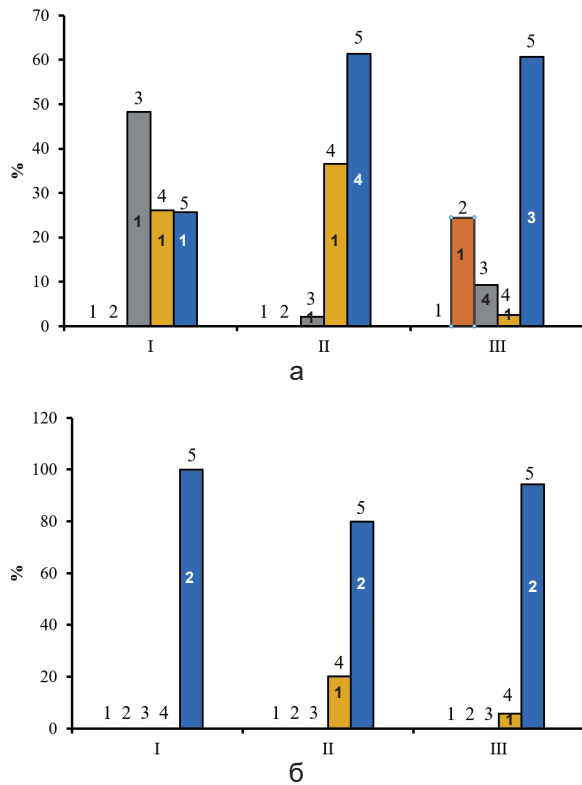


Рис. 3. Відсотковий вміст білків різної молекулярної маси у фракції трипсиноподібних серинових протеаз, отриманої з гомогенату тканини підшлункової залози (ПЗ) хворих на хронічний панкреатит (ХП) та рак ПЗ при проведенні електрофорезу за невідновлювальних (а) та відновлювальних (б) умов: I – контроль, II – ХП, III – рак ПЗ; 1 – ≥ 150 кДа, 2 – 150–100 кДа, 3 – 100–67 кДа, 4 – 67–35 кДа, 5 – 35–10 кДа; арабськими цифрами в межах стовпчиків позначено кількість фракцій білків у групі відповідної молекулярної маси

отримано 6, а в хворих на рак ПЗ – 9. За відновлювальних умов у контролі було виявлено 2 фракції, а в групах хворих із патологіями ПЗ – по 3 (рис. 3). За невідновлювальних умов кількість фракцій ТСП у хворих на ХП збільшувалася за рахунок появи трьох нових фракцій середньомолекулярних білків (67–35 кДа), а в хворих на рак ПЗ – через появу додаткових фракцій високо- (+1), середньо- (100–67 кДа; +3) та низькомолекулярних протеїнів (+2).

За відновлювальних умов виявлене нами незначне збільшення кількості фракцій у матеріалі, отриманому із гомогенатів тканини ПЗ хворих на обидві патології, відбулося внаслідок появи додаткової фракції у групі протеїнів із молекулярною масою 67–35 кДа. На відміну від фракцій, отриманих при розділенні ТСП плазми, високомолекулярні компоненти у фракціях цих ензимів, виділених із тканини, виявилися відсутніми як у контролі, так і в хворих на ХП. Також у фракціях, отриманих із гомогенатів тканини ПЗ хворих на обидві патології за невідновлювальних умов, знижувався вміст білків масою 100–67 кДа, натомість зростав відсоток низькомолекулярних протеїнів і становив близько 61%. Поясненням цього може бути вивільнення під час розвитку патологічних процесів низькомолекулярних ензимів (наприклад, УАП) із комплексів з їх інгібіторами або синтез нових ТСП відповідної маси (таких як мономери трипази, калікреїни, трипсин – див. таблицю).

Методика, використана у наших дослідженнях, не дала змоги виділити й виявити у тканині ПЗ такі протеази з трипсиноподібною активністю, як матрипаза і трансмембранна серинова протеаза-4 (див. таблицю). Водночас відомо про надмірну експресію обох ензимів у тканині ПЗ у хворих на рак, а також про зниження концентрації природного інгібітора матрипази, що унеможливує швидку інактивацію цього фермента [14]. Другий ензим є одним із прогностичних маркерів при раку ПЗ – він не експресується в ПЗ хворих

на панкреатити та здорових людей, а за умов онкопатології індукує дозрівання про-УАП і регулює низку сигнальних шляхів.

Ключовий етап у прогресуванні хвороб ПЗ – ремоделювання ПМ, безпосередньо пов'язане з фіброгенезом за ХП, а також з інвазивністю та метастазуванням пухлин. Важливими чинниками ремоделювання і деградації ПМ є протеази, у тому числі й ТСП. Тромбін може руйнувати фібриноген; також відомими є желатинолітична активність трипсину та спроможність плазміну гідролізувати колаген, желатин і фібриноген. Доведена желатино- й, можливо, колагенолітична активність тетрамерів триптази (у разі зниженого рН така здатність властива і мономерам цього ензиму) [15]. Матриптаза має фібриногено-, колагено- і желатинолітичну активності [16]. Колагенолітична активність характерна для калікреїну-2, -6, -13, -14, а у разі калікреїну-6 задокументовано й гідролітичну дію на фібриноген; калікреїн-4 деградує колагени I і IV й α -ланцюг фібриногену, а калікреїн-8 – желатин, колаген IV типу, фібриноген [17]. Водночас такі ензими, як УАП, ТАП, трансмембранна серинова протеаза-4 не здатні безпосередньо руйнувати ПМ і діють через активацію плазміну та матриксних металопротеїназ.

Для вивчення особливостей впливу компонентів фракцій ТСП, отриманих із плазми крові та гомогенатів тканини ПЗ пацієнтів досліджуваних груп, на елементи ПМ, надалі було проведено ензим-електрофорез із використанням фібриногену, желатину та колагену як субстратів та проаналізовано одержані зимограми. При дослідженні ТСП плазми крові та використанні фібриногену в контролі було виявлено 2 фракції ензимів з фібриногенолітичною активністю, а у хворих на обидві патології – по 3 фракції (див. рис. 4, а). Всі ферменти були середньомолекулярними білками; в контролі та в хворих на ХП переважали білки із молекулярною масою 100–67 кДа (згідно

з таблицею, ця фракція, ймовірно, відповідає плазміну), а в хворих на рак ПЗ – протеїни масою 67–35 кДа (вони, можливо, представлені тромбіном). Додаткова фракція

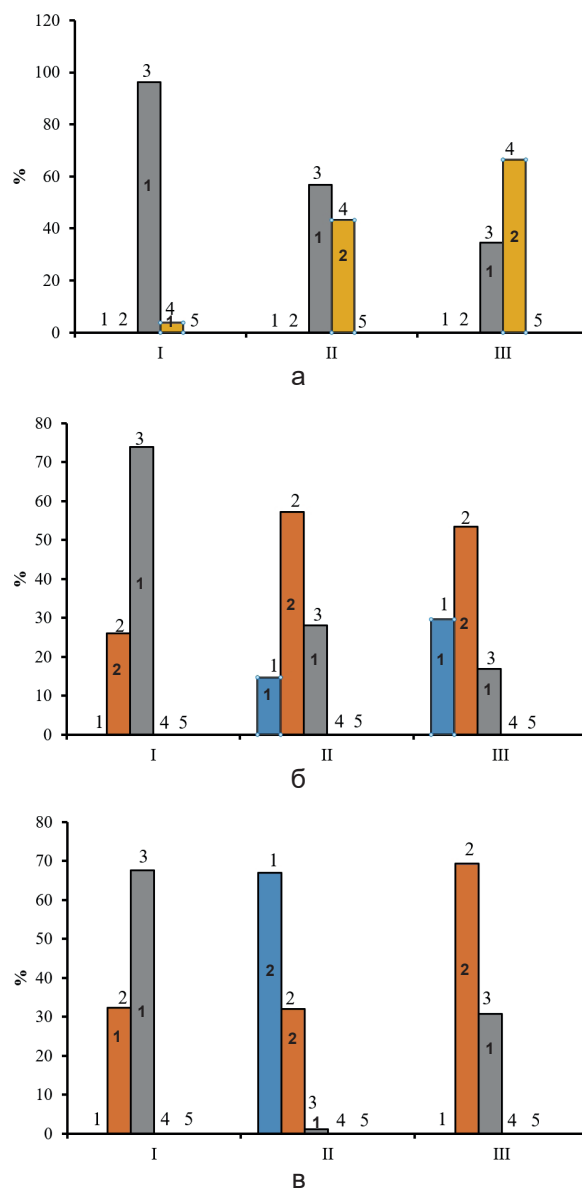


Рис. 4. Відсотковий вміст білків різної молекулярної маси у фракції трипсиноподібних серинових протеаз, отриманої з плазми крові хворих на хронічний панкреатит (ХП) та рак підшлункової залози (ПЗ) при проведенні ензим-електрофорезу із використанням фібриногену (а), желатину (б) та колагену (в) як субстратів: I – контроль, II – ХП, III – рак ПЗ; 1 – ≥ 150 кДа, 2 – 150–100 кДа, 3 – 100–67 кДа, 4 – 67–35 кДа, 5 – 35–10 кДа; арабськими цифрами в межах стовпчиків позначено кількість фракцій білків у групі відповідної молекулярної маси

ТСП у хворих із патологією ПЗ з'явилася серед білків масою 67–35 кДа.

За умов застосування желатину в контролі було виявлено 3 фракції желатиназ, а у хворих на обидві патології – по 4, причому ці ензими, навпаки, були представлені білками з дуже високою та високою молекулярною масою (вони переважали у хворих із патологією) та протеїнами масою 100–67 кДа, що переважали в контролі (див. рис. 4, б). Фракція середньомолекулярних білків при цьому, ймовірно, представлена плазмінном, а зниження її вмісту частково може бути зумовлене дією антиплазміну та інших інгібіторів – представників білків гострої фази, вміст яких за патологічних процесів зростає.

При використанні колагену в контролі було виявлено 2 фракції ферментів із колагенолітичною активністю, у хворих на ХП – 5, а в хворих на рак ПЗ – 3 фракції (див. рис. 4, в); подібно до желатиназ, ці ензими також були білками із дуже високою та високою молекулярною масою (вони, відповідно, переважали у плазмі хворих на ХП та рак ПЗ) та протеїнами масою 100–67 кДа (що переважали в контролі). Додаткові фракції у групах пацієнтів із патологією ПЗ, як і у разі желатиназ, з'явилися у групах білків із дуже високою (ХП – 2 фракції) та високою (за обох патологій – по одній фракції) масою.

Відомо, що плазмін також залучається у деградацію колагену. На відміну від желатиназної активності, притаманної білкам з дуже високою молекулярною масою у фракціях, отриманих з плазми хворих на обидві патології, колагенази масою понад 150 кДа у матеріалі пацієнтів, хворих на рак ПЗ, відсутні, що свідчить про суттєві відмінності у процесах ремоделювання ПМ за досліджуваних патологій.

При дослідженні фракції ТСП, отриманої з гомогенатів тканини ПЗ, та використанні фібриногену як субстрату було виявлено, що в усіх трьох групах пацієнтів фібриногенолітичну активність мають низь-

комолекулярні білки (рис. 5, а). Це узгоджується з результатами, отриманими нами при проведенні диск-електрофорезу відповідної

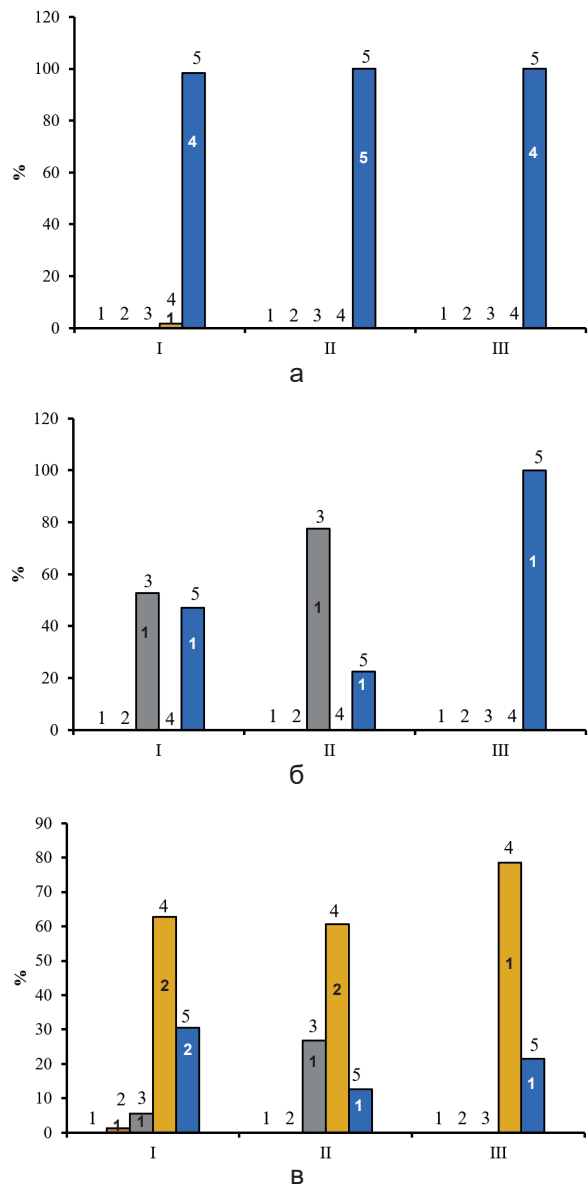


Рис. 5. Відсотковий вміст білків різної молекулярної маси у фракції трипсиноподібних серинових протеаз, отриманої з гомогенату тканини підшлункової залози (ПЗ) хворих на хронічний панкреатит (ХП) та рак ПЗ при проведенні ензим-електрофорезу із використанням фібриногену (а), желатину (б) та колагену (в) як субстратів: I – контроль, II – ХП, III – рак ПЗ; 1 – ≥150 кДа, 2 – 150–100 кДа, 3 – 100–67 кДа, 4 – 67–35 кДа, 5 – 35–10 кДа; арабськими цифрами в межах стовпчиків позначено кількість фракцій білків у групі відповідної молекулярної маси

фракції (див. рис. 3). У контролі та в хворих на рак ПЗ ензими були розподілені на 4, а в хворих на ХП – на 5 фракцій, що може свідчити про утворення за ХП специфічних протеаз, залучених у його розвиток, зокрема, калікреїну-4 та -6. У контролі також виявлено фракцію білків масою 67–35 кДа, яка становила дуже невеликий (1,66%) відсоток.

За умов застосування як субстрату желатину в контролі та в хворих на ХП було виявлено по 2 фракції желатиназ із груп середньо- (100–67 кДа) та низькомолекулярних білків (див. рис. 5, б). Білок із першої групи очевидно не був плазміном (на це вказує відсутність відповідної фракції в зимограмі, отриманій із використанням фібриногену як субстрату – водночас плазмін міг бути у досліджуваному матеріалі, отриманому з плазми). Фракція низькомолекулярних желатиназ, імовірно, була представлена трипсином. У контролі вміст цих фракцій був майже однаковим, тоді як у хворих на ХП переважала перша фракція. У хворих на рак ПЗ желатинази були представлені виключно низькомолекулярними білками – і можливо, вже не трипсином, а більш специфічним ферментом, що продукується у пухлинному середовищі, таким як калікреїн-8.

На відміну від ензимів з фібриногенотажелатинолітичною активністю, серед колагеназ у всіх трьох групах переважали білки із молекулярною масою 67 – 35 кДа (див. рис. 5, в). У контролі було виявлено 6 фракцій, що належали до груп високо- (1 фракція), середньо- (масою 100–67 кДа, 1 фракція, та 67–35 кДа, 2 фракції) та низькомолекулярних білків. Відомими низькомолекулярними білками з колагенолітичною активністю є калікреїн-2, -4, -6, -13, -14. Через відсутність фібриногенолітичної активності у фракції білків масою 100–67 кДа, колагенази цієї групи, ймовірно, як і у разі желатиназ, не є плазміном. У хворих на ХП було ідентифіковано 4, а в хворих на рак ПЗ – 2 фракції (при ХП – внаслідок втрати високомолекулярних та

однієї фракції низькомолекулярних білків, а за онкопатології – також двох фракцій із середньою молекулярною масою). Матеріал, отриманий із гомогенатів тканини ПЗ пацієнтів контрольної групи та хворих на ХП, містив певну кількість більш великих протеїнів, у разі раку ці фракції були відсутніми.

ВИСНОВКИ

1. Вміст ТСП у плазмі крові хворих із патологією ПЗ є вищим, а у гомогенатах тканини ПЗ – нижчим відносно значень відповідних показників у контролі.

2. Фракції ТСП, отримані з плазми крові пацієнтів усіх досліджуваних груп, містять велику кількість високомолекулярних протеїнів, тоді як ТСП, виділені з гомогенатів тканини ПЗ хворих із патологією, представлені в основному низькомолекулярними білками. При цьому в плазмі пацієнтів контрольної групи переважають протеїни з високою та середньою молекулярною масою, у хворих на ХП – низькомолекулярні, а на рак ПЗ – середньомолекулярні білки. Білки масою 100–67 кДа у фракціях, отриманих із плазми крові та тканини, ймовірно, є різними ензимами: у плазмі – мономерними білками (оскільки при проведенні електрофорезу за відновлювальних умов ця фракція залишається наявною), а в гомогенатах – комплексами, стабілізованими дисульфідними зв'язками (за відновлювальних умов вона зникає).

3. Серед ТСП, отриманих із плазми крові та гомогенатів тканини ПЗ, наявні ферменти із фібриногенотажелатинотажелатинолітичною активністю. У плазмі перші представлені середньомолекулярними білками, тоді як серед представників двох останніх груп переважають білки із великою (желатинази в хворих на ХП та рак ПЗ, колагенази в хворих на онкопатологію) та дуже великою (колагенази в пацієнтах з ХП) молекулярною масою. У гомогенатах фібриногенолітичну активність ма-

ють виключно низькомолекулярні білки, а желатинази і колагенази є середньо- та низькомолекулярними білками, причому у разі желатиназ переважають протеїни з масою 100–67 кДа (ХП) та 35–10 кДа (рак ПЗ), а серед колагеназ – 67–35 кДа.

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. Synelnyk¹, O.O. Kravchenko¹, O.S. Kostiuk¹,
O.M. Savchuk¹, S.A. Sukhodolia²,
L.I. Ostapchenko¹**

DISTRIBUTION OF SERINE PROTEASES IN BLOOD PLASMA AND PANCREAS IN CHRONIC PANCREATITIS AND ONCOPATHOLOGY

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Educational and Scientific Centre Institute of Biology and Medicine;

²National Pirogov Memorial Medical University of Vinnytsya; e-mail: synelnykt@gmail.com; maxima@knu.ua

The aim of our study was to evaluate the trypsin-like serine proteases (TLPs) distribution between systemic circulation and pancreatic tissue and to investigate the peculiarities of their involvement in the extracellular matrix components degradation in patients with pancreatic pathologies with electrophoretic analysis methods using. The 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, from which the TLPs fractions were subsequently obtained by the affinity chromatography method. The study showed that TLPs content in the blood plasma of patients with pancreatic pathologies is higher, and in tissue homogenates is lower relative to the values of the corresponding indicators in the control. Disk-electrophoresis using showed that TLPs fractions obtained from the blood plasma of patients of all studied groups contain a lot of high molecular weight (HMW) proteins, while TLPs from the pancreatic tissue homogenates of patients with pancreatic pathologies mainly consists of low molecular weight (LMW) proteins. Enzyme-electrophoresis results showed that all TLPs fractions include enzymes with fibrinogenolytic, gelatinolytic and collagenolytic activity. In plasma, the first were represented by medium molecular weight (MMW) proteins, and the last two groups included

a lot of HMW proteins as well as proteins with very high molecular weight. In homogenates, fibrinogenolytic activity was characteristic for LMW proteins only, whereas gelatinases and collagenases were represented by both MMW and LMW proteins. Our results indicate the differences in the TLPs fractions components obtained from blood plasma and pancreatic tissue of patients with investigated pathologies, as well as significant distinctions in the processes of extracellular matrix remodeling under CP and PC.

Key words: chronic pancreatitis; pancreatic cancer; trypsin-like serine proteases; electrophoresis.

REFERENCES

1. Kandikattu HK, Venkateshaiah SU, Mishra A. Chronic pancreatitis and the development of pancreatic cancer. *Endocrin Metab Immun Dis Drug Targets*. 2020; 20(8):1182-210.
2. Spagnolo DM, Greer PJ, Ohlsen CS, Mance S, Ellison M, Breze C, et al. Acute and chronic pancreatitis disease prevalence, classification, and comorbidities: A cohort study of the UK BioBank. *Clin Translat Gastroenterol*. 2022;13(1):e00455.
3. Tagirasa R, Yoo E. Role of serine proteases at the tumor-stroma interface. *Front Immunol*. 2022;13:832418
4. Vizovisek M, Ristanovic D, Menghini S, Christiansen MG, Schuerle S. The Tumor proteolytic landscape: A challenging frontier in cancer diagnosis and therapy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2514.
5. Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):D320-5.
6. Patel S. A critical review on serine protease: Key immune manipulator and pathology mediator. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2017;45(6):579-91.
7. Magdeldin S, Moser A. Affinity Chromatography. Principles and applications. In: *Affinity Chromatography*. Magdeldin S (ed.). [Internet]. London: IntechOpen; 2012.
8. Ostapchenko L, Savchuk O, Burlova-Vasilieva N. Enzyme electrophoresis method in analysis of active components of haemostasis system. *Advan Biosci Biotechnol*. 2011;2:20-6.
9. Martin CE, List K. Cell surface-anchored serine proteases in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2019;38(3):357-87.
10. Vitte J. Human mast cell tryptase in biology and medicine. *Mol Immunol*. 2015;63(1):18-24.
11. Kumar AA, Buckley BJ, Ranson M. The urokinase plasminogen activation system in pancreatic cancer: prospective diagnostic and therapeutic targets. *Biomolecules*. 2022;12(2):152.
12. Baluka D, Urbanek T, Lekstan A, Swietochowska E, Wiaderkiewicz R, Kajor M, et al. The role of the tissue plasminogen activator as a prognostic and differentiation factor in patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *J Physiol Pharmacol*. 2016;67(1): 93-101.
13. Candido JB, Maiques O, Boxberg M, Kast V, Peerani E, Tomás-Bort E, et al. Kallikrein-related Peptidase 6 is associated with the tumour microenvironment of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(16):3969.

14. Sakugawa C, Haruyama Y, Tanaka H, Fukushima T, Kawaguchi M, Kataoka H. Prognostic significance of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) immunoreactivity in pancreatic ductal adenocarcinoma. BMC Res Notes. 2017;10(1):674.
15. Fukuoka Y, Schwartz LB. Active monomers of human beta-tryptase have expanded substrate specificities. Int Immunopharmacol. 2007;7(14):1900-8.
16. Velasco G, Cal S, Quesada V, Sánchez LM, López-Otín C. Matriptase-2, a membrane-bound mosaic serine proteinase predominantly expressed in human liver and showing degrading activity against extracellular matrix proteins. J Biol Chem. 2002;277(40):37637-46.
17. Yu Y, Prassas I, Diamandis EP. Putative kallikrein substrates and their (patho) biological functions. Biol Chem. 2014; 395(9): 931-43.

*Матеріал надійшов
до редакції 14.09.2022*