

## ПРОТЕОЛІТИЧНИЙ ДИСБАЛАНС ЯК ФАКТОР РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПАНКРЕАТИТУ ОКРЕМО ТА ЗА НАЯВНОСТІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1 ТИПУ

<sup>1</sup>Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини»

Київського національного університету імені Тараса Шевченка (м. Київ)

<sup>2</sup>Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (м. Вінниця)

nkudina@ukr.net

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Робота виконана у рамках науково-дослідної теми «Біохімічні аспекти функціонування метаболічних та сигнальних шляхів за дії молекул білкової природи в умовах нормального та патологічно зміненого метаболізму» (№ д/р 0119У100168).

**Вступ.** Патології підшлункової залози, у тому числі хронічний панкреатит, за темпами розповсюдження, відсотком хворих, що тимчасово, а той і постійно втратили працездатність, без перебільшення можна віднести до вагомих медико-соціальних проблем сучасності [1]. Незважаючи на низку робіт у галузі дослідження патофізіологічних аспектів розвитку панкреатиту, зокрема його гострої форми, механізми, які обумовлюють хронічний перебіг даного захворювання, залишаються до кінця не з'ясованими. Серед ключових причин прогресування панкреатиту виділяють порушення протеолітичного балансу внаслідок неконтрольованої активації ферментів підшлункової залози на початкових етапах захворювання та посилення катаболізму білків у динаміці розвитку хвороби [2]. У цьому контексті увагу дослідників привертають ферменти родини матриксних металопротеїназ (ММП), які активно залучені у метаболізм білків позаклітинного матриксу. Дослідження вмісту та активності ММП за панкреатиту набувають особливої актуальності, беручи до уваги той факт, що трипсин здатен безпосередньо активувати деякі ММП [3]. Порушення механізмів контролю ММП характерне для патогенезу багатьох захворювань (серцево-судинних, нейродегенеративних, онкологічних, запальних) та належить до визначальних чинників, які не лише обумовлюють хронічний характер захворювання, а й сприяють розвитку супутніх патологій, у тому числі раку підшлункової залози та цукрового діабету 1 типу. Відповідно до статистики цукровий діабет на фоні панкреатиту розвивається у 50% пацієнтів, причому у половині випадків діабет є інсулінозалежним [4]. Тому обґрунтованим є пошук показників, які б слугували маркерами тяжкості та тривалості перебігу патологічного процесу як у хворих з хронічним панкреатитом окремо, так і за наявності цукрового діабету.

**Метою** представленого дослідження було оцінити інтенсивність протеолітичних процесів за вмістом у тканинах шурів загального білка, змінами якісного та кількісного складу пептидних пулів, а також з'ясувати внесок ММП-2 і ММП-9 у віддалені терміни розвитку хронічного панкреатиту окремо (ХП) та за наявності цукрового діабету 1 типу (ХП+ЦД1).

**Об'єкт і методи дослідження.** Умови проведення експерименту. Досліди проводили на білих нелінійних щурах-самцях масою 200±10 г. При роботі з лабораторними тваринами дотримувалися міжнародних

рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими І Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986). Експериментальні роботи зі щурами проводили у віварії Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Роботи з тваринами регламентувались правилами проведення експериментальних робіт з піддослідними тваринами, які були погоджені біоетичною комісією ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Тварини утримувалися на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до води. На час експерименту тварини знаходилися у пластикових клітках при кімнатній температурі 19-24°C, вологості не більше 50%, природному світловому режимі «день-ніч». Перед проведенням експериментів тварини проходили акліматизацію впродовж 14 діб. Хронічний панкреатит моделювали шляхом внутрішньочеревинного введення тваринам церилуїну (Sigma, США) в дозі 10 мкг/кг 5 разів на добу впродовж 5 днів [5]. Після останнього введення тварин утримували у стандартних умовах віварію впродовж 9 днів. На 14 день експерименту тваринам індукували цукровий діабет 1 типу, для цього щурам одноразово внутрішньочеревинно вводили розчин стрептозотоцину (Sigma, США) у дозі 65 мг/кг [6]. Щурам контрольної групи у відповідні терміни вводили аналогічні об'єми фізіологічного розчину (під час індукції хронічного панкреатиту) чи 10 мМ цитратного буферу (рН 4,5) (під час індукції цукрового діабету). Через дві доби після введення стрептозотоцину у крові експериментальних тварин перевіряли рівень глікемії натще. У подальших дослідах використовували тварин, концентрації глюкози у крові яких після 6-годинного голодування знаходилася у межах 22-32 ммоль/л. Тварин виводили з експерименту на 134 добу від початку введення церилуїну.

**Одержання сироватки крові.** Сироватку крові одержували з цільної крові без використання антикоагулянту [7]. Кров залишали при 37°C на 30 хв, після чого чистою сухою склянкою паличкою обережно відділяли згусток від стінок пробірки для пришвидшення отримання сироватки. Проби центрифугували впродовж 40 хв при 2000 г. Отриманий супернатант (сироватку) швидко відокремлювали від формених елементів крові, переносили в пробірки типу епендорф та заморожували при -20°C до подальшого використання.

*Одержання гомогенатів печінки та підшлункової залози.* Гомогенати тканини одержували відповідно до методу [8]. Ізольовану печінку та підшлункову залозу очищали від сполучної і жирової тканини та промивали охолодженням 0,9% NaCl. Печінку перфузували з використанням фізіологічного розчину. Для приготування 10% гомогенатів наважку тканини гомогенізували за допомогою гомогенізатора Поттера у 10 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4), що містив 2 мМ ЕДТА та 0,25 М сахарозу. Після гомогенізації проби центрифугували при 600 g 15 хв. Осад відкидали, а надосадову рідину піддавали повторному центрифугуванню при 15000 g впродовж 15 хв. Отриманий таким чином супернатант швидко відбавляли та заморожували при -20°C до подальшого використання. Усі маніпуляції, пов'язані з приготуванням гомогенатів тканини, проводили при +4°C.

*Визначення відносного вмісту цитокінів (інтерлейкіну-6, ФНПа) та матриксних металопротеїназ (ММП-2 та ММП-9).* Визначення вмісту цитокінів та матриксних металопротеїназ проводили за допомогою імуноферментного методу відповідно до [9]. Сироватку крові та гомогенати попередньо розводили до концентрації 1 мг/мл 0,05 М трис-НСІ буфером (рН 7,4). Досліджувані зразки в об'ємі 100 мкл вносили у лунки 96-лункової плашки та інкубували впродовж ночі при +4°C. Видалення несорбованого антигену проводили шляхом триразового промивання лунок 50 мМ трис-НСІ буфером (рН 7,4), що містив 0,05% Твін-20. Для блокування неспецифічних ділянок зв'язування використовували 5% розчин знежиреного молока. Первинні та вторинні антитіла готували відповідно до рекомендацій фірми виробника, інкубацію з антитілами проводили за 37°C впродовж 60 хв. Після кожного із етапів, плашки двічі відмивали 50 мМ трис-НСІ буфером (рН 7,4) та двічі цим же буфером з додаванням 0,05% Твін-20. Як субстрати пероксидазної реакції використовували о-фенілєндіамін (0,4 мг/мл) та пероксид водню (0,013%). Реакцію зупиняли 1М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Оптичну щільність проб вимірювали на мікропланшеточному спектрофотометрі  $\mu$ QuantTM (BioTek Instruments, Inc., США) за довжини хвилі 492 нм. У роботі було використано первинні та вторинні антитіла виробництва Santa Cruz Biotechnology, Inc. (США).

Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд відповідно до протоколу [10].

*Одержання пептидних пулів.* Одержання пептидного пулу проводили відповідно до методу В.В. Ніколайчук [11] з певними модифікаціями. Всі операції здійснювали при +4°C. Для одержання пептидного пулу до сироватки крові чи гомогенатів тканин додавали 1,2 М HClO<sub>4</sub> у співвідношенні 1:1. Проби залишали на 30 хв після чого центрифугували 15 хв при 1500 g. Надосадову рідину нейтралізували 5 н KOH до рН 7,0, залишали на 15 хв та центрифугували повторно. До одержаної на даному етапі надосадової рідини додавали 96 % етиловий спирт у співвідношенні 1:5, проби витримували 15 хв та знову центрифугували 15 хв при 1500 g. Надосадову рідину висушували шляхом ліофілізації. Концентрацію пептидного пулу визначали після розчинення ліофілізату у 50 мМ трис-НСІ буфері (рН 7,4), що містив 137 мМ NaCl. Оптичну щільність проб вимірювали на спектрофотометрі (SmartSpec Plus, BioRad, США) при 210

нм. Для побудови калібрувального графіку використовували дипептид N-карбокси-гліцил-гліцин.

*Фракціонування пептидних пулів методом хроматографії, що поділяє за розмірами.* Для фракціонування пептидного пулу використовували хроматографію, що розподіляє за розмірами, на колонці з Sephadex G 15 (Bio Rad, США) [12]. Ліофілізат пептидного пулу розчиняли у 50 мМ трис-НСІ буферу (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl; концентрація зразка при нанесенні становила 50 мкг/мл. Пробу наносили та збирали за швидкості потоку 0,5 мл/хв. Проходження розділення контролювали спектрофотометрично за допомогою напівавтоматичної системи «BioLogic LP» (BioRad, США). Одержані хроматограми аналізували за допомогою комп'ютерної програми OriginLab (v 9.1). Для оцінки молекулярних мас пептидів, колонку попередньо калібрували використовуючи речовини з відомою молекулярною масою – лізоцим (14,3 кДа); інсулін (5,7 кДа); вітамін B12 (1,35 кДа).

*Статистична обробка даних.* Статистичну обробку одержаних результатів проводили за допомогою методів варіаційної статистики з використанням комп'ютерної програми Excel (Microsoft corporation, США). Обраховували показники середньої арифметичної (M), середньої квадратичної помилки середньої арифметичної (m).

**Результати досліджень та їх обговорення.** Згідно сучасних уявлень структурно-функціональні порушення підшлункової залози за умов розвитку панкреатиту є наслідком каскаду молекулярних подій, спричинених неконтрольованою активацією панкреатичних ферментів [1]. Незважаючи на те, що даний чинник активно залучений на початкових стадіях захворювання, патогенез хронічного панкреатиту також тісно асоційований зі змінами у функціонуванні протеолітичної ланки, що є передумовою розвитку низки супутніх панкреатиту проявів. Одним із таких ускладнень є розвиток фіброзу та подальше виснаження екзокринної та ендокринної функцій підшлункової залози. Враховуючи, що основними ферментами, задіяними у підтримання метаболізму білків позаклітинного матриксу, є матриксні металопротеїнази [13], нами було визначено вміст даних ферментів у тварин з хронічним панкреатитом.

Відповідно до одержаних результатів (**таблиця 1**) розвиток хронічного панкреатиту супроводжується значним зростанням вмісту обох досліджуваних ММП, при цьому більш виражені зміни вмісту ММП-2 було виявлено у групі щурів з ХП+ЦД1, а вмісту ММП-9 – у групі тварин з ХП окремо. Так, вміст ММП-2 перевищував значення контролю у 3,18; 3,14 та 2,58 рази, відповідно, у сироватці, печінці та підшлунковій залозі тварин з ХП+ЦД, а вміст ММП-9 був вищим у 3; 2,82 та 3,11 рази у групі тварин з ХП.

Зростання відносного вмісту протеїназ у печінці тварин може бути одним з патогенетичних механізмів, що лежать в основі розвитку поліорганної недостатності, характерної для перебігу хронічного панкреатиту.

Беручи до уваги, що ММП-9 належить до індукційних ферментів, виявлене нами зростання відносного вмісту даного ферменту за умов розвитку досліджуваних патологій може бути безпосереднім наслідком накопичення низки медіаторів, зокрема цитокінів, здатних впливати на рівень експресії генів

**Таблиця 1 – Відносний вміст цитокінів та матриксних металопротеїназ у сироватці, печінці та підшлунковій залозі тварин з хронічним панкреатитом (ХП) окремо та за наявності цукрового діабету 1 типу (ХП+ЦД1)**

	Експериментальні групи	Цитокіни, %		Матриксні металопротеїнази, %	
		ІЛ-6	ФНП $\alpha$	ММП-2	ММП-9
Сироватка крові	Контроль	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5
	ХП	162 $\pm$ 8*	383 $\pm$ 20*	137 $\pm$ 7*	300 $\pm$ 16*
	ХП+ЦД1	287 $\pm$ 15*#	533 $\pm$ 26*#	318 $\pm$ 16*#	275 $\pm$ 13*
Печінка	Контроль	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5
	ХП	214 $\pm$ 10*	500 $\pm$ 25*	135 $\pm$ 6*	280 $\pm$ 14*
	ХП+ЦД1	271 $\pm$ 13*#	725 $\pm$ 36*#	314 $\pm$ 15*#	240 $\pm$ 12*#
Підшлункова залоза	Контроль	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5	100 $\pm$ 5
	ХП	246 $\pm$ 13*	466 $\pm$ 23*	266 $\pm$ 13*	316 $\pm$ 16*
	ХП+ЦД1	292 $\pm$ 15*#	766 $\pm$ 38*#	258 $\pm$ 12*	166 $\pm$ 10*#

**Примітка:** \* – статистично достовірно відносно контрольного показника,  $P \leq 0,05$ ; # – статистично достовірно відносно показника у групі тварин з ХП,  $P \leq 0,05$ .

**Таблиця 2 – Рівень загального білка та пептидного пулу у сироватці, печінці та підшлунковій залозі тварин з хронічним панкреатитом (ХП) окремо та за наявності цукрового діабету 1 типу (ХП+ЦД1)**

	Експериментальні групи	Загальний білок	Пептидний пул
		мг·мл <sup>-1</sup>	мг·мл <sup>-1</sup>
Сироватка крові	Контроль	26,32 $\pm$ 1,48	0,71 $\pm$ 0,01
	ХП	31,32 $\pm$ 1,56*	1,71 $\pm$ 0,08*
	ХП+ЦД1	28,74 $\pm$ 1,53	2,54 $\pm$ 0,12*
		<b>ум. од·г тканини<sup>-1</sup></b>	<b>ум. од·г тканини<sup>-1</sup></b>
Печінка	Контроль	42,75 $\pm$ 2,25	19,96 $\pm$ 0,99
	ХП	30,59 $\pm$ 1,52*	80,89 $\pm$ 4,00*
	ХП+ЦД1	23,93 $\pm$ 1,19*#	123,26 $\pm$ 6,22*#
Підшлункова залоза	Контроль	45,47 $\pm$ 2,27	113,39 $\pm$ 5,66
	ХП	37,89 $\pm$ 1,89*	124,41 $\pm$ 6,56
	ХП+ЦД1	30,17 $\pm$ 1,50#	163,02 $\pm$ 8,98*#

**Примітка:** \* – статистично достовірно відносно контрольного показника,  $P \leq 0,05$ ; # – статистично достовірно відносно показника у групі тварин з ХП,  $P \leq 0,05$ .

ММП-9 [14]. Тому нами було визначено відносний вміст ІЛ-6 та ФНП $\alpha$ , які належать до ключових молекул, асоційованих з розвитком запалення.

Як бачимо з даних, наведених у **таблиці 1**, перебіг хронічного панкреатиту як окремо, так і за умов наявності цукрового діабету 1 типу, супроводжувався відхиленням значень досліджуваних показників від контрольних величин. Такі результати однозначно вказують на існування вираженого запального процесу, а високі рівні запальних медіаторів у сироватці крові тварин дозволяють говорити про системний характер даного процесу. Незважаючи на значне зростання рівня ІЛ-6 та ФНП $\alpha$  у тварин обох дослідних груп, більш виражені зміни було виявлено у групі з ЦД1, що пов'язано з особливостями патогенезу даного захворювання, зокрема запаленням у тканинах підшлункової залози. Так, відносний вміст ІЛ-6 та ФНП $\alpha$  у підшлунковій залозі був найвищим і складав

292 $\pm$ 15% та 766 $\pm$ 38%. Відносний вміст ІЛ-6 у сироватці та печінці тварин з ЦД1 був відповідно у 2,87 та 2,71 рази вище за контроль, а вміст ФНП $\alpha$  у цих же тканинах перевищував значення контрольного показника у 5,33 та 7,25 рази. Варто відмітити, що наявність у сироватці крові тварин з хронічним панкреатитом значних рівнів прозапальних цитокінів, матриксних металопротеїназ опосередковано свідчить про порушення бар'єрної функції клітинних мембран внаслідок їх ферментного чи оксидативного пошкодження та зростання частки некротизованих клітин.

Останніми роками поширеним є уявлення щодо безпосередньої залученості деяких ММП у процеси канцерогенезу [15]. Низкою експериментальних робіт показано, що дані ферменти відіграють вирішальну роль під час неоангіогенезу, сприяючи формуванню судин на початкових стадіях васкуляризації пухлин. Окрім того, неконтрольована деградація білків екстрацелюлярного матриксу та індуковане ММП порушення міжклітинних взаємодій полегшує інвазію пухлинних клітин [16]. Отже, виявлене нами значне зростання вмісту ММП, зокрема ММП-9, на 134 добу розвитку хронічного панкреатиту може бути негативним прогностичним маркером, що вказує на потенційну загрозу виникнення раку підшлункової залози.

Певним підтвердженням активізації протеолітичних реакцій за патогенезу хронічного панкреатиту слугує встановлене у ході роботи зниження вмісту загального білка на фоні зростання вмісту пептидного пулу (**таблиця 2**). Відповідно до одержаних результатів, у печінці тварин з ХП вміст загального білка був 1,4 рази нижчим, а вміст пептидного пулу у 4 рази вищим у порівнянні з контролем.

Наявність у тварин ЦД1 обумовлювала більш виражені зміни показників – за цих умов вміст загального білка був нижче контролю у 1,8 рази, а вміст пептидного пулу перевищував контрольний рівень у 6,5 рази. Подібна тенденція спостерігалась і у підшлунковій залозі тварин за обох дослідних станів. Так, зниження вмісту білка певною мірою пов'язано з порушенням білоксинтезуючої здатності печінки та виснаженням ендокринної функції підшлункової залози у тварин з хронічним панкреатитом. На відміну від результатів у печінці та підшлунковій залозі, концентрація білка у сироватці крові тварин з ХП зростала у 1,2 рази та залишалась у межах контрольної величини для тварин з ХП+ЦД1. Також було виявлено зростання концентрації пептидного пулу у сироватці крові щурів з 0,71 $\pm$ 0,01 мг·мл<sup>-1</sup> у контролі до 1,71 $\pm$ 0,08 мг·мл<sup>-1</sup> для тварин з ХП та 2,54 $\pm$ 0,12 мг·мл<sup>-1</sup> у групі щурів з ХП+ЦД1. Вища концентрація пептидного пулу у групі тварин з цукровим діабетом частково може бути наслідком хронічного окисного стресу та інтенсифікації вільно радикальних реакцій, характерних для патогенезу даного захворювання.

Невід'ємною ланкою деструктивних та запальних захворювань, у тому числі ХП та ЦД1, є розвиток

ендогенної інтоксикації, характерною рисою якої є поява у тканинах та біологічних рідинах організму низькомолекулярних метаболітів, об'єднаних загальною назвою молекули середніх мас (МСМ) [17,18]. Оскільки пептиди є складовою фракції МСМ, їх накопичення дозволяє говорити про наявність у тварин з ХП та ХП+ЦД1 стану ендоксикації. Значне зростання рівня пептидного пулу є не лише маркером ендотоксикації, але й чинником, який ускладнює перебіг захворювання. Через структурну подібність до регуляторних пептидів, дані молекули можуть впливати на клітинний метаболізм. Подібний ефект реалізується завдяки здатності пептидів взаємодіяти з клітинними рецепторами чи зв'язуватися з регуляторними центрами ферментів. Відповідно до даних, наведених у літературі, частина пептидів здатна проникати в середину клітини і далі у ядро впливаючи, у такий спосіб, на експресію генів [19,20].

Враховуючи зміни вмісту пептидного пулу за умов нашого експерименту, надалі було проаналізовано якісний та кількісний склад пептидних пулів, одержаних з тканин тварин з ХП та ХП+ЦД1. Результати фракціонування пептидних пулів методом хроматографії, що поділяє за розмірами, представлено у таблиці 3. У цілому при ХП як окремо, так і за наявності ЦД1 відбуваються зміни якісного складу пептидів, які виявляються у появі молекул, відсутніх у контрольних зразках. Згідно одержаних результатів, сироватка крові контрольних тварин містить набір пептидів з молекулярною масою від 444 Да до 1017 Да, причому відсоток пептидів з найвищою молекулярною масою становить 50%. За ХП спостерігається поява низки молекул проміжної молекулярної маси, а також пептидів з молекулярною масою 1239 Да. У групі тварин з ХП+ЦД1 домінуючою (44%) є частка пептидів з молекулярною масою 645 Да. Оскільки рівень пептидів безпосередньо пов'язаний зі білковим метаболізмом, накопичення у крові даних сполук свідчить про активізацію протеолітичних процесів за обох досліджуваних патологій.

Молекулярна маса пептидів, одержаних з печінки тварин обох експериментальних груп, у цілому залишалась у діапазоні мас, характерних для контролю, проте спостерігався певний перерозподіл між вмістом даних пептидів. Так, відсоток пептидів з молекулярною масою біля 1000 Да знижувався до 12% за умов ХП та зростав до 72% для тварин з ХП+ЦД1 у порівнянні з 39% у групі контрольних тварин.

Аналіз якісного складу пептидів з підшлункової залози виявив, що на 134 добу експерименту кількість піків, що відповідають фракціям пептидів певної молекулярної маси, знижувалась до 4 та 3 піків, відповідно, у групі тварин з ХП та ХП+ЦД1. При цьому, якщо у контролі переважала частка пептидів з молекулярною масою 952 Да (43%) та 736 Да (30%), за патологій зростав відсоток пептидів вищої молекулярної маси – 1173 Да (60%) у випадку ХП окремо та 1040 Да (64%) для тварин з ЦД1.

З огляду на той факт, що якісно-кількісний склад пептидних пулів є досить стабільним параметром [21], виявлені нами зміни свідчать про значні метаболічні порушення за хронічного панкреатиту та активізацію катаболічних реакцій.

**Висновки.** Результати, одержані у ході проведеного дослідження, свідчать про високу активність

**Таблиця 3 – Результати хроматографічного розділення пептидних пулів, одержаних з сироватки, печінки та підшлункової залози тварин з хронічним панкреатитом (ХП) окремо та за наявності цукрового діабету 1 типу (ХП+ЦД1)**

		Кількість піків	Молекулярна маса пептидів (Да)	Площа під окремим піком (%)
Сироватка крові	Контроль	1	1017	50
		2	689	20
		3	545	18
		4	444	12
	ХП	1	1239	10
		2	1037	28
		3	800	20
		4	682	9
		5	579	9
		6	557	16
		7	434	8
	ХП+ЦД1	1	963	11
		2	829	26
3		645	44	
4		510	19	
Печінка	Контроль	1	1104	39
		2	748	61
	ХП	1	1084	12
		2	1016	36
		3	725	52
	ХП+ЦД1	1	1048	72
		2	745	28
Підшлункова залоза	Контроль	1	1110	9
		2	952	43
		3	736	30
		4	670	10
		5	399	8
	ХП	1	1173	60
		2	1033	8
		3	787	2
		4	737	30
	ХП+ЦД1	1	1202	10
		2	1040	64
		3	740	26

протеолітичних процесів у віддалені терміни патогенезу хронічного панкреатиту як окремо, так і за умов цукрового діабету 1 типу.

Посилення протеолізу певною мірою пов'язано зі значним накопиченням у сироватці крові, печінці та підшлунковій залозі тварин матриксних металопротеїназ. Надмірна активація останніх призводить до порушення стабільності якісного та кількісного складу пептидних пулів організму та може розглядатися, як одна з першопричин формування синдрому ендоксикації за умов хронічного панкреатиту.

**Перспективи подальших досліджень.** Виявлені відмінності якісного та кількісного складу пептидних пулів у тварин з хронічним панкреатитом обґрунтовують доцільність проведення подальших поглиблених досліджень, спрямованих на пошук молекул, здатних слугувати маркерами тяжкості та тривалості перебігу патологічного процесу.

## Література

1. Xiao AY, Tan ML, Wu LM, Asrani VM, Windsor JA, Yadav D, et al. Global incidence and mortality of pancreatic diseases: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression of population-based cohort studies. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2016;1(1):45-55.
2. Dixit A, Dawra RK, Dudeja V, Saluja AK. Role of trypsinogen activation in genesis of pancreatitis. *Pancreapedia.* 2016;1.0(24):1-10. DOI: 10.3998/panc.2016.25
3. Lindstad RI, Sylte I, Mikalsen SO, Seglen PO, Berg E, Winberg JO. Pancreatic trypsin activates human promatrix metalloproteinase-2. *J. Mol. Biol.* 2005;350(4):682-98.
4. Hardt PD, Killinger A, Nalop J, Schnell-Kretschmer H, Zekorn T, Klör HU. Chronic pancreatitis and diabetes mellitus. A retrospective analysis of 156 ERCP investigations in patients with insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Pancreatol.* 2002;2(1):30-3.
5. Aghdassi AA, Mayerle J, Christochowitz S, Weiss FU, Sendler M, Lerch MM. Animal models for investigating chronic pancreatitis. *Fibrogenesis and Tissue Repair.* 2011;4:26.
6. Zafar M, Naqvi S. Effects of STZ-Induced Diabetes on the Relative Weights of Kidney, Liver and Pancreas in Albino Rats: A Comparative Study. *Int. J. Morphol.* 2010;28(1):135-42.
7. Tokar AV, Makohonenko EM, Platonova TM. Suchasni metody laboratornoi diahnozyky vnutrishnovennoho mikrozsiddannia krovi (metodychni rekomendatsii). K.: Makkom; 1994. 22 s. [in Ukrainian].
8. Rybalchenko VK, Koganov MM. Struktura i funktsii membran: praktikum. K.: Vyischa shkola; 1988. 312 s. [in Russian].
9. Crowther JR. The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol.* 2000;149:III-IV:1-413.
10. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding. *Anal. Biochem.* 1976;86:193-200.
11. Nykolaychuk BB, Moyn VM, Kyrkovskyy VV. Method for determining of the peptide pool molecular. *Laboratory case.* 1991;10:13-8.
12. Paula H, Stephan K, Edouard E. Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates. *J Liquid Chromatography and Related Technologies.* 2012;35:2923-50.
13. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2016;31(S1):177-83.
14. Roupakia Eu, Markopoulos GS, Kolettas E. IL-12-mediated transcriptional regulation of matrix metalloproteinase. *Bioscience Reports.* 2018; 38:1-7.
15. Śmigiełski J, Piskorz Ł, Talar-Wojnarowska R, Malecka- Panas E, Jabłoński S, Brocki M. The estimation of metalloproteinases and their inhibitors blood levels in patients with pancreatic tumors. *World J Surgical Oncology.* 2013;11:137.
16. Khalid A, Javaid MA. Matrix Metalloproteinases: New Targets in Cancer Therapy. *J Cancer Sci Ther.* 2016;8:6.
17. Sidel'nikova VI, Chernitskiy AE, Retsky MI. Endogenous intoxication and inflammation: reaction sequence and informativity of the markers (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [agricultural biology].* 2015;50:2:152-61.
18. Yakovlev My. Elements of endotoxin theory of human physiology and pathology. *Human Physiology.* 2003;29(4):476-86.
19. Havinson VH, Tarnovskaya SI, Linkova NS. Korotkie peptidy, pronikayuschie v kletku: model vzaimodeystviya s promotornymi uchastkami genov. *Byull. eksp. biol. med.* 2012;10:391-6. [in Russian].
20. Karyakina EV, Belova SV. Molekulyi sredney massyi kak integralnyiy pokazatel metabolicheskikh narusheniy. *Klin. lab. diagnostika.* 2004;3:4-8. [in Russian].
21. Havinson VH, Ryzhak GA. Peptidnaya regulyatsiya osnovnykh funktsiy organizma. *Vestnik Roszdravnadzora.* 2010;6:58-62. [in Russian].

### ПРОТЕОЛИТИЧНИЙ ДИСБАЛАНС ЯК ФАКТОР РОЗВИТКУ ХРОНІЧНОГО ПАНКРЕАТИТУ ОКРЕМО ТА ЗА НАЯВНОСТІ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ 1 ТИПУ

Ракша Н. Г., Галенова Т. І., Вовк Т. Б., Суходоля С. А., Берегова Т. В., Остапченко Л. І.

**Резюме.** У ході проведеного дослідження встановлено значне зростання відносного вмісту матриксних металопротеїназ-2 та -9, зниження вмісту загального білка та зростання рівня пептидного пулу у печінці і підшлунковій залозі щурів на 134 добу патогенезу хронічного панкреатиту окремо та за умов цукрового діабету 1 типу, що свідчить про високу активність протеолітичних процесів у віддалені терміни захворювань. Виявлені зміни супроводжуються підвищенням рівня інтерлейкіну-6 та ФНПа, поява яких у кровотоці вказує на системний характер запалення. За обох патологічних станів відбуваються зміни якісного та кількісного складу пептидних пулів, одержаних з сироватки, печінки та підшлункової залози тварин, які виявляються у появі низки молекул, що відсутні у контрольних зразках.

**Ключові слова:** хронічний панкреатит, цукровий діабет 1 типу, протеоліз, пептидний пул.

### ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ ДИСБАЛАНС КАК ФАКТОР РАЗВИТИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ПАНКРЕАТИТА ОТДЕЛЬНО И ПРИ НАЛИЧИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 1 ТИПА

Ракша Н. Г., Галенова Т. И., Вовк Т. Б., Суходоля С. А., Береговая Т. В., Остапченко Л. И.

**Резюме.** В ходе проведенного исследования установлено значительное увеличение относительного содержания матриксных металлопротеиназ-2 и -9, снижение содержания общего белка и возрастание уровня пептидного пула в печени и поджелудочной железе крыс на 134 сутки патогенеза хронического панкреатита отдельно и при наличии сахарного диабета 1 типа, что свидетельствует о высокой активности протеолитических процессов в отдаленные сроки развития заболеваний. Выявленные изменения сопровождаются повышением уровня интерлейкина-6 и ФНПа, появление которых в кровотоке указывает на системный характер воспаления. При обоих патологических состояниях происходят изменения качественного и количественного состава пептидных пулов в сыворотке, печени и поджелудочной железе животных, которые проявляются в появлении молекул, отсутствующих в контрольных образцах.

**Ключевые слова:** хронический панкреатит, сахарный диабет 1 типа, протеолиз, пептидный пул.

### PROTEOLYTIC IMBALANCE AS A KEY FACTOR OF THE DEVELOPMENT OF CHRONIC PANCREATITIS WITH AND WITHOUT TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Raksha N. G., Halenova T. I., Vovk T. B., Sukhodolia S. A., Bereгова T. V., Ostapchenko L. I.

**Abstract.** According to world statistics, the overall incidence of chronic pancreatitis is about 50 per 100.000 people, but its prevalence tend to grow rapidly. Despite a numerous researches, the underlying mechanisms, which cause the progression of chronic pancreatitis and increase risk of pancreatitis-associated complications have not

been clearly elucidated. Pancreatitis is accompanied by the progressive tissue damage leading to the functional insufficiency of the pancreas. Among these disturbances is the pancreatic fibrosis, which firstly resulted from the disorders of extracellular matrix proteins metabolism. The main enzymes involved in extracellular matrix remodeling are matrix metalloproteinases. The present finding has shown the increase of the level of MMPs, such as MMP-2 and MMP-9 in the liver and pancreas of the rats with CP as well as CP+DT1. Besides the local action within the organs, MMPs could release from the damaged tissue into the bloodstream and affect distant organs. The increased level of both MMPs in the serum of the rats with CP and CP+DT1 confirms the systemic effect of the pancreatitis.

It is well known that the chronic pancreatitis is strongly related to inflammation. Inflammatory reactions first occur in a pancreas as local, but may amplify and lead to development of systemic inflammation. Long-term inflammatory process mediates irreversible destruction of pancreatic parenchyma and ductal structures with further fibrous scar tissue formation. These alterations are considered as key triggers of some pancreatitis-associated complications, namely fibrosis or/and malignant transformation. The significant increase of the level of cytokines in the serum, pancreas, and liver at the 134th day of experiment could serve as evidence of the immune imbalance and has indicated the development both systemic and local inflammation.

The protein level under the pancreatitis condition has also been investigated. In our experiment, the reduction of protein content was observed in the liver and pancreas of the rats with CP and CP+DT1. Since diabetes type 1 has been recognized as inflammatory state, this may be the reason that mediated more significant change of total protein concentration in the group of the rats suffering from diabetes type 1. The opposite change of protein level was detected in the serum of the rats – in this case the protein concentration was increased in the rats both experimental groups.

The concentration of peptides in the serum and their content in the liver and pancreas of the rats were also increased. It could be due to the intensification of catabolic processes as well as the impairment elimination of these molecules from the bloodstream. A set of peptides in the biological fluids and tissues represents the peptide pools, which are important for maintenance of homeostasis. The components of the peptide pools exert a modulation effect on nervous, endocrine, immune, cardiovascular and other systems. This effect is complex and implemented by all peptides presented in the pool. The results of chromatographic analysis of the peptide pools derived from the tissue of the rats with chronic pancreatitis revealed the alterations of peptide repertoire. The main change includes the appearance of peptides that were absent in the control group.

**Key words:** chronic pancreatitis, diabetes type 1, proteolysis, peptide pool.

*Рецензент – проф. Непорада К. С.  
Стаття надійшла 13.07.2019 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2019-3-152-191-195

УДК 579.2:579.61:616.6-07

*Старішко О. М., Воронкова О. С.*

### ЛАКТОБАЦИЛИ У СКЛАДІ МІКРОБІОТИ УРОГЕНІТАЛЬНОГО ТРАКТУ ЖІНОК, ЯКІ ВЕДУТЬ ЗДОРОВИЙ СПОСІБ ЖИТТЯ І ТИХ, ЯКІ ПАЛЯТЬ

Дніпровський національний університет ім. Олеся Гончара (м. Дніпро)

oksanson@i.ua

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Дослідження виконано у рамках науково-дослідної теми кафедри сучасних технологій діагностично-лікувального процесу факультету медичних технологій діагностики та реабілітації Дніпровського національного університету імені Олеся Гончара «Моніторинг стану здоров'я населення Дніпропетровської області з аналізом клініко-лабораторних показників» (ФМТДР-81-19, № державної реєстрації 0119U101044).

**Вступ.** В останні роки відмічається ріст дисбіотичних проявів уrogenітального тракту у жінок [1,2,3,4]. Зміни екологічного стану довкілля, нераціональне харчування, перенесені гострі кишкові інфекції, хронічні захворювання та дисфункція шлунково-кишкового тракту, широке застосування антибіотиків, зниження імунологічної реактивності організму, довготривале використання пероральних контрацептивів, порушення гормонального статусу, який супроводжується порушенням менструального циклу – можуть бути причинами порушень рівноваги представників резидентної мікрофлори і виникнення дисбактеріозу піхви [5,6,7]. Діагностика інфекційно-запальних захворювань уrogenітального тракту

набуває актуальності в акушерсько-гінекологічній практиці [8,9,10].

Вплив цих факторів на організм жінки сприяє виникненню дисбалансу між нормофлорою, умовно-патогенною та патогенною мікрофлорою. Частина цих патологій може протікати безсимптомно або з мінімальною симптоматикою, що не викликає занепокоєння у жінки чи сприймається як варіант норми [3,11]. Безсимптомний перебіг такого роду захворювань може призвести до пізнього звернення за медичною допомогою та розвитку, внаслідок цього, серйозних ускладнень, стати причиною порушення репродуктивної функції. Для своєчасної клініко-лабораторної діагностики захворювань уrogenітального тракту інфекційного характеру існує спосіб дослідження нормофлори, умовно-патогенної та патогенної мікрофлори, який заснований на комплексній оцінці основних груп мікроорганізмів, що формують уrogenітальний біоценоз, методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу [8,9]. В основу способу покладена комплексна кількісна оцінка мікробіоти молекулярно-генетичним методом з проведенням порівняльного аналізу конкретних представників нормо- і умовно-патоген-