

УДК 577.15

І. Л. Вовчук, канд. біол. наук, докторант

Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова,
кафедра біохімії,
вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна.
Тел: (0482) 68-78-75 e-mail: irvov@mail.ru

АКТИВНІСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А В НОВОУТВОРЕННЯХ ЯЄЧНИКА

Досліджена активність карбоксипептидази А доброякісних та злоякісних новоутворень яєчника. Встановлено підвищення активності ферменту за наявності новоутворень. В злоякісних новоутвореннях активність ферменту зворотнопропорційна ступеню диференціації пухлинних клітин.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, яєчник, пухлина.

Оскільки протеолітичний потенціал клітин в значному ступені визначається лізосомним апаратом, дослідження маловивчених лізосомальних екзопептидаз, зокрема карбоксипептидази А, викликає особливу зацікавленість.

Лізосомальна карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1) синтезується у вигляді неактивного попередника, який перетворюється в активну форму під впливом трипсину, хімотрипсину, субтилісину, урокінази.

Карбоксипептидаза містить атоми Zn^{2+} , має пептидазну та естеразну активність та широко використовується в препаративній біохімії для визначення С-кінцевих амінокислот [1]. Будучи типовою пептидазою, вона розщеплює С-кінцевий пептидний зв'язок поряд з ароматичною амінокислотою в звичайних білках та в низькомолекулярних синтетичних субстратах [2, 3].

Збільшення активності карбоксипептидази А виявлено у епітеліальній трансплантованій ацинарній карциномі підшлункової залози щурів [4], за експериментальної глюкокортикостероїдної міопатії у кролів [5], в клітинах підшлункової залози великої рогатої худоби за вірусіндукованого діабету [6] та при захворюваннях підшлункової залози, які супроводжуються появою двох форм карбоксипептидази, відсутніх у здорових людей [7]. Підвищення активності ферменту виявлено в доброякісних новоутвореннях тканин тіла матки [8], молочної залози [9] та в асцитній рідині жінок, хворих на карциному яєчника. Встановлена антиканцерогенна дія карбоксипептидази А, яка індукує диференціацію проліферуючих клітин [10, 11], диференціацію мукозних клітин в серозні [12], а в культурі клітин андрогеннезалежного раку простати вона викликає гіперацетилюючу дію на гістони [13].

Однак, у світовій літературі нами не виявлено досліджень, присвячених визначенню активності карбоксипептидази А в пухлинних тканинах яєчника, незважаючи на те, що в останні роки вона викорис-

товується як складова частина моноклональних препаратів в хіміотерапії онкозахворювань [14–19].

Мета роботи — дослідження активності карбоксипептидази А в тканинах новоутворень яєчника за наявності доброякісного та злоякісного процесу з урахуванням вікових особливостей жіночого організму.

Матеріали і методи

Досліджували гомогенати неураженої тканини та зразки новоутворень яєчника, вилучених операційним шляхом у жінок, які не отримували медикаментозного доопераційного лікування. Патоморфологічні діагнози були верифіковані за міжнародною класифікацією ВОЗ із визначенням морфологічного стану і ступеня диференціації трансформованих клітин пухлинної тканини [20].

Тканини гомогенізували в 0,9 % розчині NaCl (у співвідношенні 1:10) і центрифугували при 12000 обертів/хв (при +4 °C) протягом 45 хвилин.

У супернатанті визначали активність карбоксипептидази А по гідролізу синтетичного субстрату карбобензоксифеніл-ала — 2 мМ [21] та вміст білка — за методом Lowry [22]. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 570 нм, відносну активність ферментів виражали в ммоль фенілаланіну на мг тканини за 30 хв інкубації при 37 °C, питому активність — в мкмоль фенілаланіну на мг білка. Статистичну значимість відмінностей між вибірками визначали за допомогою критерія Ст'юдента [23].

Результати та їх обговорення

Вивчення активності карбоксипептидази А в тканинах яєчника непухлинного походження та в тканині доброякісного новоутворення — цисаденоми, показало вірогідне збільшення відносної активності ферменту в 1,8–2,9 рази, а питомої — в 1,5–2,5 рази щодо показників тканині неушкодженого яєчника (табл. 1).

Найменша активність карбоксипептидази, яка незначно відрізняється від показників неураженої тканини, встановлена при рубцовому склерозі, а найбільша — при кістозній хворобі та в рубцовій тканині білих тіл (табл. 1), що може свідчити про участь ферменту в процесі ремоделювання сполучної тканини.

Збільшення активності ферменту може здійснюватися за рахунок більш інтенсивної експресії генів, кодуєчих його структуру, що було показано роботами Kikuchi (1989) на трансгенних щурах, в цитоплазмі яких виявлено збільшення кількісного рівня мРНК за наявності пухлин [10]. Іншою причиною може бути активація ферментів під впливом метаболітів пухлини.

Вивчення активності карбоксипептидази А за злоякісного процесу виявило збільшення відносної та питомої активності ферменту (відносно показників неураженої тканини яєчника) в 1,5–2,16 та 1,3–2,5 рази, відповідно, за винятком високодиференційованої форми аденокарциноми та ембріонального раку (табл. 2).

Таблиця 1
Активність карбоксипептидази А в тканині яєчника жінок з непухлинною та доброякісною патологією

Патоморфологічний критерій	n	С білка, г/г тканини	ммоль фен/ мг тканини	мкмоль фен/мг білка
Тканина неураженого яєчника	150	0,096±0,010	0,173±0,018	1,80±0,187
Непухлинні патології яєчника:	48	0,089±0,009	0,171±0,019	1,92±0,200
рубцовий склероз	21	0,117±0,019	0,502±0,051↑*	4,29±0,437↑*
кіста	15	0,066±0,008	0,184±0,019	2,78±0,284↑
рубцовий склероз + кіста	22	0,119±0,013	0,531±0,057↑*	4,46±0,462↑*
рубцові білі тіла	37	0,115±0,013	0,314±0,034↑*	2,73±0,292↑
Доброякісні новоутворення:				
цисаденома				

Примітка: ↑ — вірогідне збільшення активності карбоксипептидази А в тканині яєчника з непухлинною та доброякісною патологією в порівнянні з неушкодженою тканиною (p<0,05); * — вірогідне збільшення активності карбоксипептидази А в тканині яєчника з непухлинною та доброякісною патологією в порівнянні з тканиною рубцового склерозу (p<0,05).

Таблиця 2
Активність карбоксипептидази А в тканині злоякісних новоутворень яєчника

Патоморфологічний критерій	n	С білка, г/г тканини	ммоль фен/ мг тканини	мкмоль фен/мг білка
Тканина неураженого яєчника	150	0,096±0,010	0,173±0,018	1,80±0,187
Злоякісні новоутворення:				
низькодиференційована аденокарцинома	24	0,113±0,012	0,298±0,032↑	2,64±0,281↑
помірnodиференційована аденокарцинома	46	0,109±0,009	0,260±0,029↑	2,39±0,241
високodиференційована аденокарцинома	17	0,125±0,014	0,227±0,026	1,82±0,196
ембріональний рак	12	0,106±0,013	0,214±0,024	2,02±0,218
ендодермальна пухлина	12	0,083±0,010	0,374±0,041↑*	4,51±0,471↑*
гранульозоклітинна пухлина	11	0,102±0,016	0,309±0,040↑	2,58±0,263↑

Примітка: ↑ — вірогідне збільшення активності карбоксипептидази А в тканині злоякісних новоутворень в порівнянні з неушкодженою тканиною (p<0,05); * — вірогідне збільшення активності карбоксипептидази А в тканині злоякісних новоутворень в порівнянні з високodиференційованою формою аденокарциноми (p<0,05).

Нами було встановлена найвища активність ферменту в ендодермальній та гранульозотканинній пухлинах, і по мірі зниження ступеня диференціації клітин пухлинної тканини аденокарциноми яєчника активність досліджуваного ферменту зростає. Ці результати істотно відрізняються від результатів, отриманих нами в дослідженнях пухлин ендометрію [8], і співпадають з результатами наших досліджень

Таблиця 3

Активність карбоксипептидази А в тканині яєчника у жінок різного віку

Вік, років	Неушкоджена тканина				Доброякісні новоутворення				Злоякісні новоутворення			
	п	С білка, г/г тканини	ммоль фен/мг тканини	ммоль фен/мг білка	п	С білка, г/г тканини	ммоль фен/мг тканини	ммоль фен/мг білка	п	С білка, г/г тканини	ммоль фен/мг тканини	ммоль фен/мг білка
21-30	25	0,101±0,012	0,176±0,019	1,74±0,182	10	0,085±0,010	0,181±0,020	2,13±0,121	10	0,076±0,009	0,183±0,020	3,27±0,346†
31-40	25	0,094±0,011	0,182±0,020	1,94±0,201	11	0,082±0,010	0,278±0,031†	3,39±0,362†	11	0,093±0,011	0,373±0,041†	4,01±0,423†
41-50	25	0,096±0,010	0,209±0,022	2,17±0,221	24	0,086±0,011	0,392±0,043†	4,58±0,489†	49	0,122±0,014	0,369±0,039†	3,03±0,329†
51-60	25	0,103±0,013	0,216±0,022	2,09±0,220	47	0,109±0,012	0,451±0,052†	4,14±0,443†	31	0,126±0,014	0,296±0,033	2,35±0,270
61-70	25	0,120±0,014	0,167±0,019	1,39±0,146	41	0,108±0,014	0,267±0,031†	2,47±0,271†	11	0,118±0,013	0,258±0,029	2,19±0,237
Більше 70	25	0,081±0,010	0,114±0,013	1,40±0,152	10	0,113±0,013	0,236±0,027†	2,09±0,260	10	0,085±0,010	0,171±0,019	2,02±0,221

Примітка: † — вірогідне підвищення активності карбоксипептидази А відносно показників неураженої тканини у відповідних вікових групах, $p < 0,05$. Найбільша відносна та питома активності ферменту були встановлені у жінок з доброякісною патологією у віці від 41 до 60 років, коли в організмі відбуваються гормональні перебудови, а у жінок із злоякісною патологією — у віці від 31 до 50 років, що свідчить про вікові особливості досліджуваних процесів.

щодо іншого гормончутливого органа — молочної залози [9], що може свідчити про неспецифічність досліджуваного процесу (табл. 2).

Порівняльне вивчення активності карбоксипептидази А в тканинах неураженого яєчника не виявило вірогідної різниці у жінок різного віку, але має тенденцію до зниження у жінок після 60 років (табл. 3).

Наявність доброякісної та злоякісної патології у жінок однієї вікової групи характеризувалася завжди підвищенням відносної та питомої активностей карбоксипептидази А щодо жінок з неураженим яєчником (табл. 3).

Висновки

1. За доброякісних та злоякісних новоутворень активність карбоксипептидази А в тканині яєчника зростає.

2. Активність досліджуваного ферменту в тканині аденокарциноми яєчника змінюється зворотньопропорційно ступеню диференціації пухлинних клітин.

3. Активність карбоксипептидази А за наявності доброякісної патології яєчника зростає у жінок у віці від 41 до 60 років, за наявності злоякісного процесу — у жінок віком від 31 до 50 років і має тенденцію до зниження з віком у жінок, які не мають патологій.

Література

1. Peterson L. M., Holmquist B. Human serum procarboxypeptidase A // *Biochemistry*. — 1983. — V. 22. — № 13. — P. 3077–3082.
2. Spilburg C. A., Bethune J. L., Valee B. L. Kinetik properties of crystalline enzymes. Carboxypeptidase A // *Biochemistry*. — 1977. — № 16. — P. 1142–1150.
3. Niesel D. W., Pan Y. C., Bewley G. C., Armstrong F., Li S. S. Structural analysis of adult and larval isozymes of sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Drosophila melanogaster* // *J. Biol. Chem.* — 1982. — V. 257. — № 2. — P. 979–983.
4. Hansen L. J., Mangkornkanok/Mark M., Reddy J. Immunohistochemical localization of pancreatic exocrine enzymes in normal neoplastic pancreatic acinar epithelium of rat // *J. Histochem. Cytochem.* — 1981. — V. 29. — № 2. — P. 309–313.
5. Sohar I., Nagy I., Heiner I., Kovacs I., Cuba F. Proteases and proteinase inhibitors in experimental glycocorticosteroid myopathy // *Acta Physiol. Sci Hung.* — 1982. — V. 60. — № 1–2. — P. 43–51.
6. Bendayan M., Ito S., Manocchio I. Alterations of exocrine pancreatic enzymes in virusinduced diabetic cattle as revealed by immunohistochemistry // *Diabetologia*. — 1982. — V. 23. — № 1. — P. 65–68.
7. Borulf S., Lindberg T., Hansson L. Agarose gel electrophoresis of duodenal juice in normal condition and in children with malabsorption // *Scand. J. Gastroenterol.* — 1979. — V. 14. — № 2. — P. 151–160.
8. Вовчук І. Л., Чернадчук С. С., Блохін Ю. В., Раздражнюк Г. С. Активність карбоксипептидаз у тканинах новоутворень тіла матки // *Вісник ОНУ*. — 2004. — Т. 9, вип. 1. — С. 25–33.
9. Вовчук І. Л., Чернадчук С. С., Мотрук Н. В., Філіпцова К. А., Каланча С. І., Буюклі Л. М. Активність карбоксипептидази А в новоутвореннях молочної залози // *Вісник ОНУ*. — 2004. — Т. 9, вип. 5. — С. 29–35.
10. Kikuchi M., Fukuyama K., Hirayama K., Epstein W. Purification and characterization of carboxypeptidase from terminally differentiated rat epidermal cell // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1989. — V. 991. — № 1. — P. 19–24.

11. Scher W., Scher B. W., Waxman S. Proteases act synergistically with low molecular weight inducers to stimulate mouse erythroleukemia cell differentiation // *Exp. Hematol.* — 1983. — V. 6. — № 11. — P. 490–498.
12. Serafin W. E., Dayton E. T., Gravallesse P. M., Austen K., Steven R. Carboxypeptidase A in mouse mast cells. Identification, characterization, and use as differentiation marker // *J. Immunol.* — 1987. — V. 139. — № 11. — P. 3771–3776.
13. Сологуб Л. І., Пашковська І. С., Антоняк Г. Л. Протеази клітин та їх функція — К: Наукова думка. — 1992. — 195 с.
14. Jaime J., Page M. Paclitaxel immunoconjugate for the specific treatment of ovarian cancer in vitro // *Anticancer Res.* — 2001. — V. 21. — № 2a. — P. 1119–1128.
15. Katzav-Gozansky T., Hanan E., Solomon B. Effect of monoclonal antibodies in preventing carboxypeptidase A aggregation // *Biotechnol. Appl. Biochem.* — 1996. — V. 23. — № 3. — P. 227–230.
16. Perron M. J., Page M. Activation of methotrexate-phenylalanine by monoclonal antibody-carboxypeptidase A conjugate for the specific treatment of ovarian cancer in vitro // *Br. J. Cancer.* — 1996. — V. 73, № 3. — P. 281–287.
17. Deckert P.M., Bornmann W. G., Ritter G. et al. Specific tumour localisation of a huA33 antibody — carboxypeptidase A conjugate and activation of methotrexate-phenylalanine // *Int. J. Oncol.* — 2004. — V. 24, № 5. — P. 1289–1295.
18. Wright J. E., Rosowsky A. Synthesis and enzymatic activation of N-[N(alpha)-(4-amino-4-deoxypteroyl)-N(delta)-hemiphthaloyl-L-ornithinyl]-L-phenylalanine, a candidate for antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT) // *Bioorg. Med. Chem.* — 2002. — V. 10, № 3. — P. 493–500.
19. Shi P. T., Hao X. K., Chen Y. et al. The solid-phase synthesis of methotrexate-alpha-peptides // *Yao Xue Xue Bao.* — 1997. — V. 32, № 2. — P. 106–109.
20. Всемирная Организация Здравоохранения // Материалы ежегодных отчетов. — Санкт-Петербург. — 1981. — 286 с.
21. Bradshaw R. S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* — 1969. — V. 63. — P. 1389–1394.
22. Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Fan A. Z., Randol R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193. — P. 265–275.
23. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высш. Школа. — 1967. — 326 с.

И. Л. Вовчук

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра биохимии,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина.
Тел: (0482) 68-78-75 e-mail: irvov@mail.ru

АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А В НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЯИЧНИКА

Резюме

Исследована активність карбоксипептидази А доброкачественных и злокачественных новообразований яичника. Установлено повышение активности фермента при наличии новообразований. В злокачественных новообразованиях активность фермента обратнопропорциональна степени дифференциации опухолевых клеток.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, яичник, опухоль.

I. L. Vovchuk

Odessa National I. I. Mechnikov University,
Department of Biochemistry,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine.
Tel: (0482) 68-78-75 e-mail: irvov@mail.ru

CARBOXYPEPTIDASE A ACTIVITY IN THE OVARY NEOPLASM

Summary

Carboxypeptidase A activity in the benignant and malignant tumors of ovaries has been researched. It has been found the increasing of the enzyme activity at the presence of neoplasms. In the malignant tumors the activity of the enzyme is inversely proportional to the tumor cell differentiation level.

Keywords: carboxypeptidase A, ovarian, tumor.