

УДК 577.15.152:577.15.072

©Коллектив авторов

ЭСТРОГЕНЫ, ТРИПСИНОПОДОБНЫЕ ПРОТЕАЗЫ И КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А И В ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ТЕЛА МАТКИ ЖЕНЩИН

И.Л. Вовчук, С.С. Чернадчук, С.А. Петров*

Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, биологический факультет, кафедра биохимии; 65023 Украина, г. Одесса, пер. Шампанский, 2; тел.: (0482) 68-78-75; эл. почта: irgov@mail.ru

В работе исследована взаимосвязь между активностью трипсиноподобных протеаз, карбоксипептидаз А и В и уровнем эстрогенов в тканях тела матки. Использование корреляционного анализа позволило предположить существование индукции эстрогенами трипсиноподобных протеаз, которые, в свою очередь, активируют карбоксипептидазы А и В из их зимогенов. Показано, что карбоксипептидазы могут играть существенную роль в процессе малигнизации.

Ключевые слова: карбоксипептидазы, трипсиноподобные протеиназы, эстрогены, опухоль.

ВВЕДЕНИЕ. Лизосомальные карбоксипептидаза А (КФ 3.4.17.1.) и карбоксипептидаза В (КФ 3.4.17.1) действуют согласованно с эндопептидазами и наиболее активны на последних стадиях расщепления белков, осуществляя быстрое разрушение пептидов путем последовательного отщепления С-концевых остатков аминокислот. Обе карбоксипептидазы относятся к А/В субсемейству Zn-содержащих, Са-зависимых карбоксипептидаз, активация которых из зимогенов может происходить под действием *in vitro* химотрипсина и плазмина, *in vivo* субтилизина и урокиназы [1-3].

Изучение активности этих карбоксипептидаз при патологических состояниях организма показало увеличение активности тканевой карбоксипептидазы А (сопровожаемое появлением двух новых форм) при заболеваниях поджелудочной железы [4] и увеличение активности карбоксипептидазы В при остром панкреатите [5]. В предыдущих исследованиях нами было установлено повышение активности карбоксипептидаз А и В в опухолевых тканях: яичников [6], тела матки [7] и молочной железы [8] по сравнению с немалигнизированными тканями этих органов. Однако, вопрос о возможных регуляторных механизмах этого процесса остается открытым.

Поэтому целью исследования было изучение активности карбоксипептидаз и возможных механизмов, ответственных за увеличение активности этих ферментов в тканях тела матки женщин при онкопатологиях.

МЕТОДИКА. Биологическим источником исследуемых ферментов служили образцы немалигнизированного, гиперпластического эндометрия и ткань злокачественной опухоли эндометрия, которые были получены операционным путем у женщин, не проходивших дооперационного медикаментозного лечения. Патоморфологические диагнозы были верифицированы по международной классификации ВОЗ [9].

*Адресат для переписки

ЭСТРОГЕНЫ И ПРОТЕАЗЫ ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ МАТКИ

Образцы тканей гомогенизировали в 0,9% NaCl (в соотношении 1:10) и центрифугировали при 9000 g при +4°C в течение 45 минут. В супернатанте определяли активность карбоксипептидазы А, карбоксипептидазы В, активность трипсиноподобных протеиназ и содержание суммарной фракции эстрогенов.

Активность карбоксипептидаз определяли спектрофотометрически при 570 нм по гидролизу 2 мМ синтетических субстратов: карбобензоксифенилаланина (для определения карбоксипептидазы А) и карбобензоксипептидазы В (для определения карбоксипептидазы В) [10]. Удельную активность ферментов выражали – в мкмоль фенолаланина (для карбоксипептидазы А) или аргинина (для карбоксипептидазы В) на мг белка за 1 мин инкубации при 37°C.

Активность трипсиноподобных протеиназ определяли по методу Kunitz в модификации Левицкого [11] по гидролизу 2% раствора казеина. Удельную активность выражали в мкмоль тирозина на мг белка за 1 мин инкубации при 37°C.

Общее содержание эстрогенов определяли по методу Jayle и Crepy [12] по образованию фенолсерного комплекса при 530 нм и выражали в мкг эстрадиола на мг ткани.

Содержание белка определяли по методу Lowry [13].

Статистическую обработку результатов проводили по общепринятым методам с определением коэффициента Стьюдента (t) и коэффициента корреляции (r) [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Изучение активности карбоксипептидаз А и В в тканях доброкачественных патологий миометрия, по сравнению с миометрием без новообразований, показало достоверное увеличение активности ферментов (в 2,1 и 3,5 раза соответственно) при наличии новообразований с большим пролиферативным потенциалом (табл. 1).

Таблица 1. Активность карбоксипептидаз, трипсиноподобных протеиназ и содержание суммарной фракции эстрогенов в ткани доброкачественных новообразований миометрия.

Патоморфологическое состояние ткани	n	Карбокси- пептидаза А, мкмоль Фен / мг белка в мин	Карбокси- пептидаза В, мкмоль Арг / мг белка в мин	Соотношение карбокси- пептидаз		Трипсино- подобные протеиназы, мкмоль Тир / мг белка в мин	Суммарные эстрогены, мкг/мг
				А/В	В/А		
Немалигни- зированный миометрий	102	71,87±6,03	802,60±79,02	0,090	1,17	0,35±0,03	72,80±7,64
Фибромио- миома	42	69,77±7,26	1170,53±121,14	0,060	6,78	0,40±0,03	647,14±69,38*
Фибромио- миома пролифери- рующая	31	152,13±16,32*	2829,03±297,32*	0,054	8,60	0,84±0,07*	750,35±73,87*

Примечание: * - достоверное изменение по отношению к немалигнизированной ткани (p<0,05).

Активность трипсиноподобных протеиназ в новообразованиях миометрия находилась на уровне аналогичных показателей немалигнизированного миометрия или в 2,4 раза возрастала в тканях с выраженным пролиферативным потенциалом опухоли.

Повышение активности исследуемых протеиназ при развитии доброкачественного патологического процесса, может свидетельствовать о прогрессии данного процесса, который характеризуется нарушением целостности ткани и стабильности клеточных мембран. Можно предположить, что исследуемые ферменты принимают участие в дальнейшем развитии процессов малигнизации и пролиферации клеток.

Далее исследовали уровни активности указанных выше ферментов и возможную индукцию их синтеза эстрогенами в матке при малигнизации.

По мнению некоторых исследователей, усиление пролиферативных процессов может быть обусловлено абсолютной или относительной хронической гиперэстрогенией, которая способна индуцировать также синтез протеиназ [15, 16]. Однако содержание эстрогенов непосредственно в малигнизированной ткани тела матки практически не исследовано. Нами было установлено увеличение содержания суммарной фракции эстрогенов, по сравнению с немалигнизированным миометрием в 8,89–10,31 раз по мере возрастания пролиферативного потенциала клеток доброкачественной опухоли.

Исследования, проведенные с образцами злокачественных опухолей эндометрия, показали (табл. 2), что при злокачественном процессе активность трипсиноподобных протеиназ достоверно ниже, чем в доброкачественных опухолях, но остается выше, чем в ткани без новообразований [17]. В ткани эндометрия, подверженного гиперпластическим и воспалительным процессам (железисто-кистозная гиперплазия, эндометриоз+железисто-кистозная гиперплазия), активность трипсиноподобных протеиназ увеличивалась в 1,99 и 1,5 раза соответственно, по отношению к немалигнизированной ткани. Наличие аденоматоза (*cancer in situ*) и аденоматоза, отягощенного железисто-кистозной гиперплазией, характеризовалось увеличением активности исследуемых протеиназ в 2,0–3,4 раза (табл. 1 и 2). Увеличение активности трипсиноподобных протеиназ при онкопроцессе было обнаружено и в опухолях молочной железы [15]. Наличие доброкачественной патологии в эндометрии характеризовалось значительным (до 10 раз) увеличением содержания эстрогенов, наиболее выраженным в гиперплазированной ткани.

Таблица 2. Активность карбоксипептидаз, трипсиноподобных протеиназ и содержание суммарной фракции эстрогенов в ткани эндометрия.

Патоморфологическое состояние ткани	n	Карбокси-пептидаза А, мкмоль Фен / мг белка в мин	Карбокси-пептидаза В, мкмоль Арг / мг белка в мин	Соотношение карбокси-пептидаз		Трипсиноподобные протеиназы, мкмоль Трир / мг белка в мин	Суммарные эстрогены, мкг/мг
				А/В	В/А		
Немалигнизированная ткань эндометрия	102	86,21±8,96	971,84±95,17	0,089	11,27	0,33±0,02	79,42±8,14
Железисто-кистозная гиперплазия	12	100,77±11,06	1801,55±191,14*	0,056	17,88	0,64±0,06*	577,98±59,11*
Эндометриоз+ железисто-кистозная гиперплазия	11	94,29±9,78	942,26±97,45	0,101	9,99	0,50±0,04*	988,31±102,19*
Аденоматоз	15	140,48±12,73*	2403,81±237,64*	0,058	17,11	0,64±0,06*	595,63±61,32*
Аденоматоз+ железисто-кистозная гиперплазия	15	126,3±11,92*	2442,11±261,82*	0,052	19,34	1,13±0,10*	903,93±92,41*
Эндометриоз+ аденоматоз+ железисто-кистозная гиперплазия	27	238,38±22,19*	1887,88±197,31*	0,127	7,92	0,86±0,07*	895,69±91,27*

Примечание: * - достоверное изменение по отношению к немалигнизированной ткани (p≤0,05).

ЭСТРОГЕНЫ И ПРОТЕАЗЫ ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ МАТКИ

Нами было установлено снижение активности трипсиноподобных протеиназ, карбоксипептидазы А и карбоксипептидазы В и содержания эстрогенов по мере снижения степени дифференциации опухолевых клеток аденокарциномы – злокачественной опухоли эндометрия (табл. 3).

Таблица 3. Активность карбоксипептидаз, трипсиноподобных протеиназ и содержание суммарной фракции эстрогенов в ткани эндометрия.

Патоморфологическое состояние ткани	n	Карбокси-пептидаза А, мкмоль Фен / мг белка в мин	Карбокси-пептидаза В, мкмоль Арг / мг белка в мин	Соотношение карбокси-пептидаз		Трипсино-подобные протеиназы, мкмоль Трир / мг белка в мин	Суммарные эстрогены, мкг/мг
				А/В	В/А		
Немалигнизированная ткань эндометрия	102	86,21±8,96	971,84±95,17	0,089	11,27	0,33±0,02	79,42±8,14
Высокодифференцированная аденокарцинома	14	124,00±13,82	1358,18±142,84*	0,091	10,95	0,43±0,03	1055,60±117,19*
Умереннодифференцированная аденокарцинома	19	88,60±9,16	1640,00±169,52*	0,054	18,51	0,39±0,04	839,18±85,31*
Низкодифференцированная аденокарцинома	28	67,42±6,32	1080,81±106,27	0,062	16,03	0,34±0,03	410,10±43,42*

Примечание: * - достоверное изменение по отношению к немалигнизированной ткани (p≤0,05).

Уменьшение активности данных протеаз в низкодифференцированных, быстро делящихся, бластоматозных клетках злокачественной опухоли свидетельствует о частичном изменении биологической роли данных ферментов и возможной элиминации карбоксипептидаз из процесса обмена белков, так как эти клетки интенсивно обеспечиваются поступлением свободных аминокислот. Уменьшение содержания эстрогенов можно объяснить тем, что основная масса клеточной популяции низкодифференцированных раков эндометрия представлена стволовыми раковыми клетками, лишенными рецепторов стероидных гормонов [16]. Эти клетки в нормальном, высокодифференцированном и умереннодифференцированном опухолевом эндометрии, в отличие от низкодифференцированного, обладают способностью к преобразованию в специализированные гормоночувствительные клетки, имеющие рецепторы стероидных гормонов.

Для изучения возможностей компенсаторных переключений отдельных ферментов протеолитической системы нами был использован онтогенетический подход, поскольку онтогенез является одной из наиболее показательных моделей, в которых реализуются переключения одних энзимных систем на другие в ходе развития и, особенно – геронтогенеза.

При анализе возрастных изменений активности трипсиноподобных протеиназ, нами было обнаружено увеличение активности ферментов в тканях тела матки с онкопатологией у женщин в возрасте 51-70 лет (табл. 4).

Таблица 4. Активность карбоксипептидаз, трипсиноподобных протеиназ и содержание суммарной фракции эстрогенов в тканях тела матки в разные физиолого-возрастные периоды женщин.

Возрастной период	Карбокси-пептидаза А, мкмоль Фен / мг белка в мин	Карбокси-пептидаза В, мкмоль Арг / мг белка в мин	Соотношение карбокси-пептидаз А/В В/А	Трипсино-подобные протеиназы, мкмоль Тир / мг белка в мин	Суммарные эстрогены, мкг/кг
Немалигнизированная ткань					
31 – 40 лет (n=27)	55,88±4,93	935,53±89,56	0,060 16,74	0,36±0,03	66,18±6,48
41 – 50 лет (n=25)	62,34±7,03	897,84±92,62	0,069 14,40	0,42±0,03	92,65±8,63
51 – 60 лет (n=25)	78,45±8,54	784,33±80,25	0,100 10,00	0,47±0,05	66,18±5,94
61 – 70 лет (n=25)	93,47±9,70	1263,58±114,32	0,074 13,52	0,32±0,02	33,09±3,07
Ткань доброкачественных новообразований					
31 – 40 лет (n=33)	99,04±10,10*	1904,28±175,26*	0,052 19,20	0,40±0,03	589,68±54,03*
41 – 50 лет (n=53)	103,12±9,12*	1829,94±191,52*	0,056 17,75	0,40±0,03	647,16±65,46*
51 – 60 лет (n=45)	102,70±9,14*	2077,72±195,98*	0,049 20,23	0,54±0,05	745,31±73,35*
61 – 70 лет (n=25)	123,12±9,89*	1410,62±125,65*	0,087 11,23	0,37±0,04	829,97±89,14*
Ткань злокачественного новообразования					
31 – 40 лет (n=15)	83,01±7,51*	1612,25±148,53*	0,051 19,42	0,02±0,003	570,41±61,82*
41 – 50 лет (n=15)	115,75±10,49*	1860,42±150,26*	0,062 16,07	0,42±0,03	615,49±59,62*
51 – 60 лет (n=22)	100,00±9,84*	1914,59±201,10*	0,052 19,15	0,67±0,07*	814,49±87,14*
61 – 70 лет (n=9)	87,61±9,62	1328,28±112,30	0,066 15,16	0,40±0,03	1029,67±111,29*

Примечание: * - достоверное изменение по отношению к немалигнизированной ткани (p<0,05).

Исследование онтогенетических особенностей функционирования карбоксипептидаз показало, что активность карбоксипептидаз А и В в тканях тела матки без новообразований имела тенденцию к увеличению с возрастом. При наличии доброкачественных процессов максимальная активность карбоксипептидазы А была зарегистрирована у женщин после 60 лет, а максимальная активность карбоксипептидазы В – после 50 лет.

В образцах злокачественных новообразований активность исследуемых пептидаз достоверно снижалась у женщин с онкопроцессом в климактерический период (после 60 лет). В пределах одного возраста активность карбоксипептидаз достоверно увеличивалась в тканях с доброкачественными и злокачественными патологиями по отношению к показателям ткани тела матки без новообразований. Следует отметить, что активность обеих пептидаз была выше в тканях доброкачественных новообразований по отношению к тканям злокачественных опухолей, что может свидетельствовать об участии данных ферментов в процессе инициации малигнизации клеток.

ЭСТРОГЕНЫ И ПРОТЕАЗЫ ПРИ НОВООБРАЗОВАНИЯХ МАТКИ

Общее содержание эстрогенов в ткани эндометрия без новообразований незначительно увеличивается (в 1,2 раза) в конце репродуктивного периода. В каждой возрастной группе исследованных женщин, наличие доброкачественных или злокачественных опухолей в тканях тела матки сопровождается достоверным увеличением содержания эстрогенов от 8 (в репродуктивный период) до 30 раз (после 60 лет), что может свидетельствовать о преимущественном экстрагонадном синтезе гормонов при неопластических процессах.

Корреляционный анализ обнаруженных однонаправленных изменений активности протеаз и эстрогенов показал, что увеличение активности карбоксипептидаз А и В по мере усиления пролиферативного потенциала опухолевых клеток при доброкачественном процессе в миометрии, положительно коррелирует с высокой активностью трипсиноподобных протеиназ ($r = +0,9934$ и $r = +0,9969$ соответственно), высоким содержанием эстрогенов в опухолевой ткани ($r = +0,5996$ и $r = +0,7427$) и предполагает эстрогенную индукцию трипсиноподобных протеиназ ($r = +0,6877$).

Увеличение активности карбоксипептидаз А и В при доброкачественном процессе в трансформированных клетках эндометрия также положительно коррелирует с высокой активностью трипсиноподобных протеиназ ($r = +0,9322$ и $r = +0,6128$ соответственно), предполагает эстрогенную индукцию трипсиноподобных протеиназ ($r = +0,6381$), но в меньшей степени, чем в миометрии коррелирует с повышением содержания эстрогенов в опухолевой ткани ($r = +0,4743$ и $r = +0,2924$ соответственно).

Снижение степени дифференциации опухолевых клеток аденокарциномы эндометрия, которое сопровождается увеличением активности карбоксипептидаз А и В, положительно коррелирует с высокой активностью трипсиноподобных протеиназ ($r = +0,9934$ и $r = +0,9969$, соответственно) и достаточно высоко коррелирует с повышением содержанием эстрогенов ($r = +0,5996$ и $r = +0,7427$ соответственно) и, вероятно, свидетельствует об индукции трипсиноподобных протеиназ эндогенными эстрогенами ($r = +0,6877$).

Корреляционный анализ онтогенетических особенностей функционирования карбоксипептидаз не позволил в достаточной мере проследить изучаемые закономерности. Положительная онтогенетическая корреляция активности трипсиноподобных протеиназ и содержания эстрогенов ($r = +0,6473$) установлена у женщин без новообразований тела матки и между высокой активностью карбоксипептидазы А и содержанием эстрогенов ($r = +0,8583$) при наличии доброкачественных новообразований тела матки. С другой стороны, при злокачественном процессе увеличение активности пептидаз положительно коррелирует с активностью трипсиноподобных протеиназ ($r = +0,5486$ и $r = +0,4291$ соответственно) и свидетельствует о преимущественной активации карбоксипептидазы А и эстрогенной индукции трипсиноподобных протеиназ ($r = +0,4948$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Peterson L.M., Holmquist B. (1983) *Biochemistry*, **22**, 3077-3082.
2. Funakoshi T., Kuromatsu K., Kojima S. (1996) *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.*, **92**, 245-252.
3. Reznik S.E., Fricker L.D. (2001) *Cell. Mol. Life. Sci.*, **58**, 1790-1804.
4. Borulf S., Lindberg N., Hansson L. (1979) *Scand. J. Gastroenterol.*, **14**, 151-160.
5. Muller C.F., Apperlos S., Unk W., Buchler M. et al. (2002) *Gastroenterol.*, **51**, 229-235.
6. Вовчук І.Л. (2005) *Вісник ОНУ*, **10**, 36-41.
7. Вовчук І.Л., Чернадчук С.С., Блохін Ю.В., Раздражнюк Г.С. (2004) *Вісник ОНУ*, **9**, №1, 25-33.

8. *Вовчук І.Л., Чернадчук С.С., Мотрук Н.В., Філіпцова К.А., Каланча С.І., Буюкчі Л.М.* (2004) Вісник ОНУ, **9**, №5, 29-37.
9. *Всемирная Организация Здравоохранения* (1981)
10. *Bradshaw R., Ericsson L., Walsh K., Neurath H.* (1969) Proc. Natl. Acad. Sci USA, **63**, 1389-1394.
11. *Kunitz M.* (1947) J. Gen. Physiol., **30**, 291-310.
12. *Jayle F.M., Crepy O.* (1950) Bul. Soc. Chim. Biol., **32**, 1067.
13. *Lowry O.H., Rosebrough N.I., Farr A.Z., Randal R.J.* (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
14. *Рокицкий П.Ф.* (1973) Биологическая статистика. – Минск: Вышш. школа.
15. *Близнюк Б.Ф.* (1988) Протеолитические ферменты и их ингибиторы у больных раком молочной железы. Автореф. дисс. канд. наук, Медицинский институт, Томск.
16. *Хмельницкий О.К.* (1994) Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний, Санкт-Петербург, с. 155-300.
17. *Вовчук И.Л., Бендерская Н.В., Чернадчук С.С., Мотрук Н.В.* (2001) Ученые записки ТНУ им. В.И. Вернадского, **14**, №2, 17-20.

Поступила: 03. 07. 2006.

**ESTROGENS, TRYPSYNE-LIKE PROTEINASES AND CARBOXYPEPTIDASES A AND B
AT WOMB BODY TUMORS**

I.L. Vovchuk, S.S. Chernadchuk, S.A. Petrov

Mechnicov Odessa National University, Shampansky per., 2, Odessa, 65023 Ukraine;
tel.: (0482) 68-78-75; e-mail: irvov@mail.ru

The correlation between activity of trypsin-like proteases, carboxypeptidases A and B and estrogen level in the womb body has been studied. Correlation analysis suggest the existence of induction of trypsin-like proteases by estrogens, these proteases activate carboxypeptidases A and B. It has been shown, that carboxypeptidases can play sufficient role in the malignisation process.

Key words: carboxypeptidases, trypsin-like proteinases, estrogens, tumor.