

УДК 577.156:577.322.4

**И. Л. Вовчук**, канд. биол. наук, доц.,  
Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова,  
кафедра биохимии,  
ул. Дворянская 2, Одесса, 65082, Украина. Тел: (0482)687875,  
e-mail: irvov@mail.ru

### РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А ЭНДОМЕТРИЯ ЖЕНЩИН НЕКОТОРЫМИ ИНГИБИТОРАМИ И АКТИВАТОРАМИ

Исследование влияния ингибиторов и активаторов на активность препаратов карбоксипептидазы А из ткани эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, и опухолевых тканей эндометрия показало, что каталитическая функция этого фермента осуществляется с участием гидроксильных групп серина, карбоксильной группы аспарагиновой кислоты и тиоловой группы цистеина. Выявлены различия в реакции ферментов из опухолевых тканей эндометрия и эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, на присутствие ингибиторов и активаторов.

**Ключевые слова:** карбоксипептидаза А, ингибиторы, активаторы, эндометрий, опухоль

Согласно данным литературы, карбоксипептидазы, в отличие от других протеаз, нельзя четко разделить на тиоловые, сериновые, металлсодержащие и карбоксильные [1, 2]. Почти все карбоксильные карбоксипептидазы являются SH-зависимыми и в некоторых случаях — сериновыми. В то же время щелочные ферменты содержат металл и в некоторых случаях представляют собой SH-зависимые белки. Классические карбоксипептидазы А и В содержат в активном центре цинк, а SH-группы являются его лигандами [3].

Несмотря на то, что гомогенный препарат карбоксипептидазы А был получен из некоторых органов и тканей человека, а именно — легких [4], поджелудочной железы [5], плаценты [6], почек [7], семенной жидкости [8], культуры клеток карциномы легких [9], биохимические свойства выделенных ферментов не были всесторонне изучены.

Цель данного исследования состояла в изучении влияния отдельных активаторов и ингибиторов на активность карбоксипептидазы А, полученной из немалигнизированной и опухолевых тканей эндометрия.

#### Материалы и методы

Исследования проводили с препаратами карбоксипептидаз А, полученными из ткани эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, и ферментом, полученным из опухолевых тканей эндометрия. Гомогенность выделенных ферментов была подтверждена методом электрофореза в системе SDS. Влияние ингибиторов и активаторов на активность фермента исследовали, прединкубируя равные объемы: 0,1 мл реагента и 0,1 мл фермента (концентрация белка — 20 мкг в 0,1 мл) в течение 1 часа при + 37°C. Конечные концентрации реагентов в пробе составляли: 2-меркаптоэтанола — 4,27, 8,54 и 12,81 мМ; парахлормеркурибензоата (ПХМБ) — 0,17 и 0,33 мМ; тритона X-100 — 8,33 и 16,7 мкг/мл;

ингибитора трипсина из сои — 0,017 и 0,034 мкг/мл; лейпептина — 0,017 и 0,034 мкг/мл; пепстатина — 0,017 и 0,034 мкг/мл; фенолметилсульфонилфторида (ФМСФ) — 0,17 и 0,34 мМ; ЭДТА — 0,085, 0,17 и 0,34 мМ; 1,10-фенантролина — 0,17, 0,34 и 0,67 мМ; цистеина — 0,008 и 0,017 мМ; дитиотреитола — 0,17 и 0,34 мМ; уксусно-кислого цинка — 0,08, 0,17 и 0,34 мМ и добавки аминокислот — гистидина, триптофана и тирозина — до 0,17 мМ в пробе. Соответствующие количества ингибиторов растворяли в 0,2 М уксусно-ацетатном буфере pH 5,2, а ПХМБ — в минимальном количестве 10%-ного метилцеллюлозольва. Активность определяли по гидролизу 2,0 мМ карбобензоксиглутамил-фенилаланина за 30 мин инкубации при + 37°С. Ингибирование либо активирование фермента выражали в процентах по отношению к его активности в пробах без добавления ингибиторов или активаторов.

Статистическую обработку результатов проводили по общепринятой схеме с использованием методов вариационного анализа [10].

### Результаты и их обсуждение

Для качественного определения функционально активных группировок, участвующих в биокатализе, был проведен ингибиторный анализ с применением специфических ингибиторов.

Результаты ингибиторного анализа свидетельствуют о том, что детергент тритон X-100 как в малой, так и в большой концентрации полностью подавлял активность пептидазы, выделенной из эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, а активность фермента опухолевых тканей эндометрия в значительной степени (на 35,0–67,0%) снижалась только в присутствии высокой концентрации этого реагента (рис. 1, 2, 3).

Активность карбоксипептидазы А доброкачественной и злокачественной опухолей эндометрия (рис. 2, 3) в большей степени, чем активность фермента эндометрия, не затронутого опухолевым процессом (рис. 1), снижалась в присутствии возрастающих концентраций пепстатина — нековалентного ингибитора аспартильных протеаз (на 72,5–77,8%, соответственно). Эти результаты позволяют предположить, что в каталитической функции карбоксипептидазы А опухолевых тканей эндометрия принимает участие карбоксильная группа, вероятно, аспарагиновой кислоты.

В отличие от карбоксипептидазы А эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, которая была нечувствительной к действию синтетического ковалентного ингибитора сериновых протеиназ — ФМСФ, активность аналогичного фермента опухолевых тканей эндометрия (в большей степени активность фермента доброкачественной опухоли), на 11,1–86,2% угнеталась этим ингибитором (рис. 1, 2, 3).

Белковый ингибитор трипсина из сои в незначительной степени снижал активность пептидазы опухолевых тканей эндометрия, в то время как активность карбоксипептидазы А эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, была нечувствительная к действию синтетического ингибитора сериновых протеиназ — ФМСФ и полностью подавлялась ингибитором трипсина из сои (рис. 1, 2, 3).

Прединкубация карбоксипептидазы А эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, и доброкачественной опухоли эндометрия с лейпептином — ингибитором как цистеиновых, так и сериновых ферментов — приводила к ингибированию данной пептидазы. Степень ингибирования была прямо пропорциональна концентрации ингибитора, в то время как фермент злокачествен-

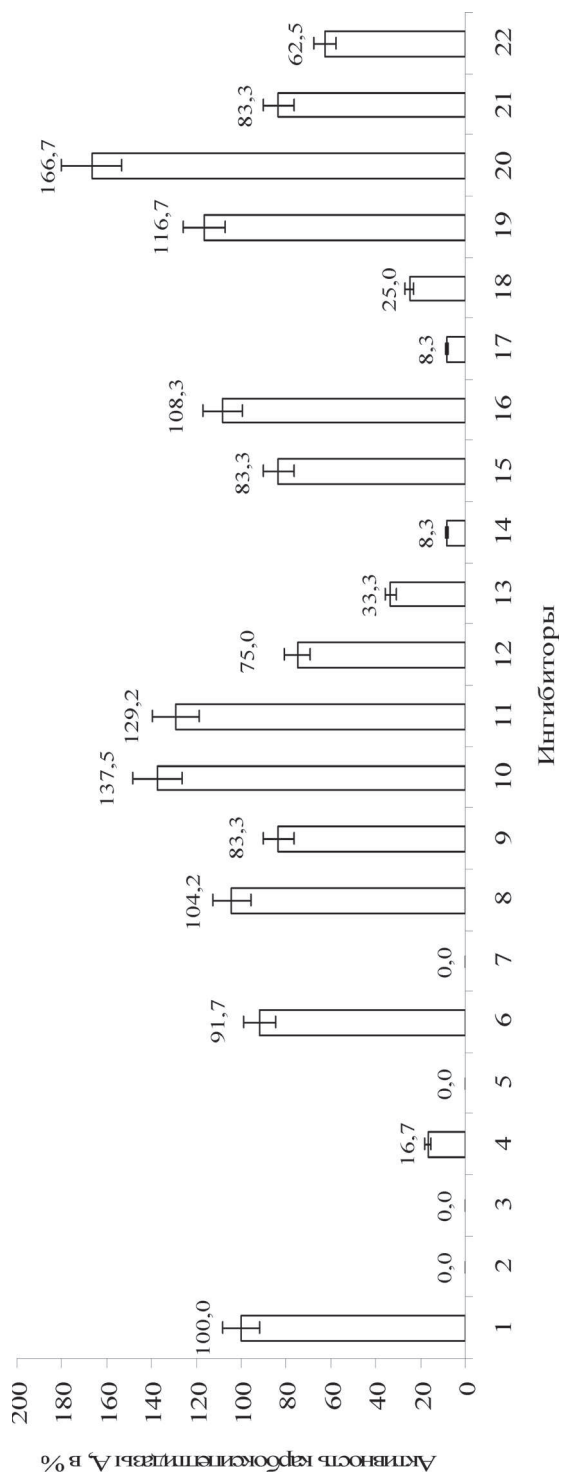


Рис. 1. Влияние ингибиторов на активность карбоксипептидазы А немалигнизированной ткани эндометрия (M ± m; n = 6)

Примечание: 1 — контроль; 2 — тригон X-100 8,33 мкг; 3 — тригон X-100 16,7 мкг; 4 — ингибитор трипсина из сои 0,017 мкг; 5 — ингибитор трипсина из сои 0,034 мкг; 6 — лейпептин 0,034 мкг; 7 — лейпептин 0,017 мкг; 8 — пепстатин 0,017 мкг; 9 — пепстатин 0,034 мкг; 10 — ФМСФ 0,17 мМ; 11 — ФМСФ 0,34 мМ; 12 — ПХМБ 0,17 мМ; 13 — ПХМБ 0,34 мМ; 14 — ЭДТА 0,085 мМ; 15 — ЭДТА 0,17 мМ; 16 — ЭДТА 0,34 мМ; 17 — 1,10 — фенантролин 0,17 мМ; 18 — 1,10 — фенантролин 0,34 мМ; 19 — 1,10 — фенантролин 0,68 мМ; 20 — тистидин 0,17 мМ; 21 — триптофан 0,17 мМ; 22 — тирозин 0,17 мМ.

Остаточная активность фермента представлена в % по отношению к показаниям контроля, принятым за 100%.

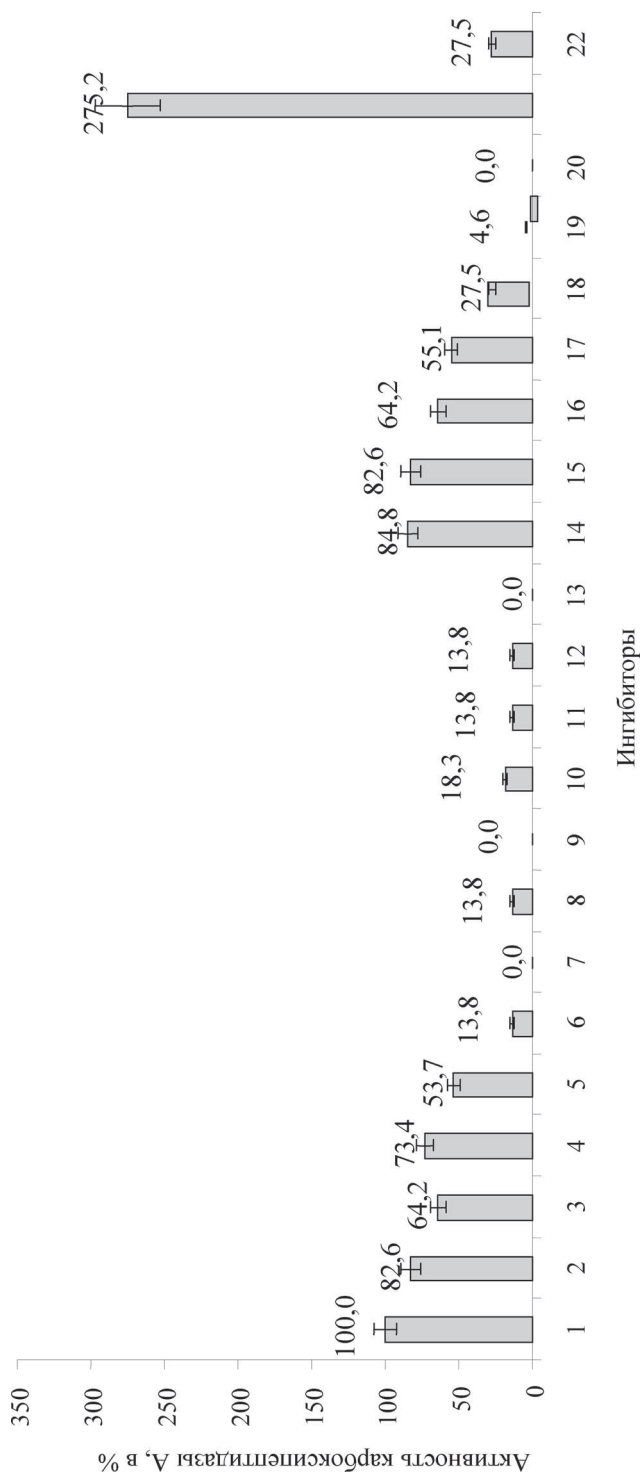


Рис. 2. Влияние ингибиторов на активность карбоксипептидазы А доброкачественной опухоли эндометрия (M ± m, n = 6)

Примечание: 1 — контроль; 2 — тригон X-100 8,33 мкг; 3 — тригон X-100 16,7 мкг; 4 — ингибитор трипсина из сои 0,017 мкг; 5 — ингибитор трипсина из сои 0,034 мкг; 6 — лейпептин 0,017 мкг; 7 — лейпептин 0,034 мкг; 8 — пепстагин 0,017 мкг; 9 — пепстагин 0,034 мкг; 10 — ФМСФ 0,17 мМ; 11 — ФМСФ 0,34 мМ; 12 — ПХМБ 0,17 мМ; 13 — ПХМБ 0,34 мМ; 14 — ЭДТА 0,085 мМ; 15 — ЭДТА 0,17 мМ; 16 — ЭДТА 0,34 мМ; 17 — 1,10 — фенантролин 0,17 мМ; 18 — 1,10 — фенантролин 0,34 мМ; 19 — 1,10 — фенантролин 0,68 мМ; 20 — гистидин 0,17 мМ; 21 — триптофан 0,17 мМ; 22 — тирозин 0,17 мМ.

Остаточная активность фермента представлена в % по отношению к показаниям контроля, принятым за 100%.

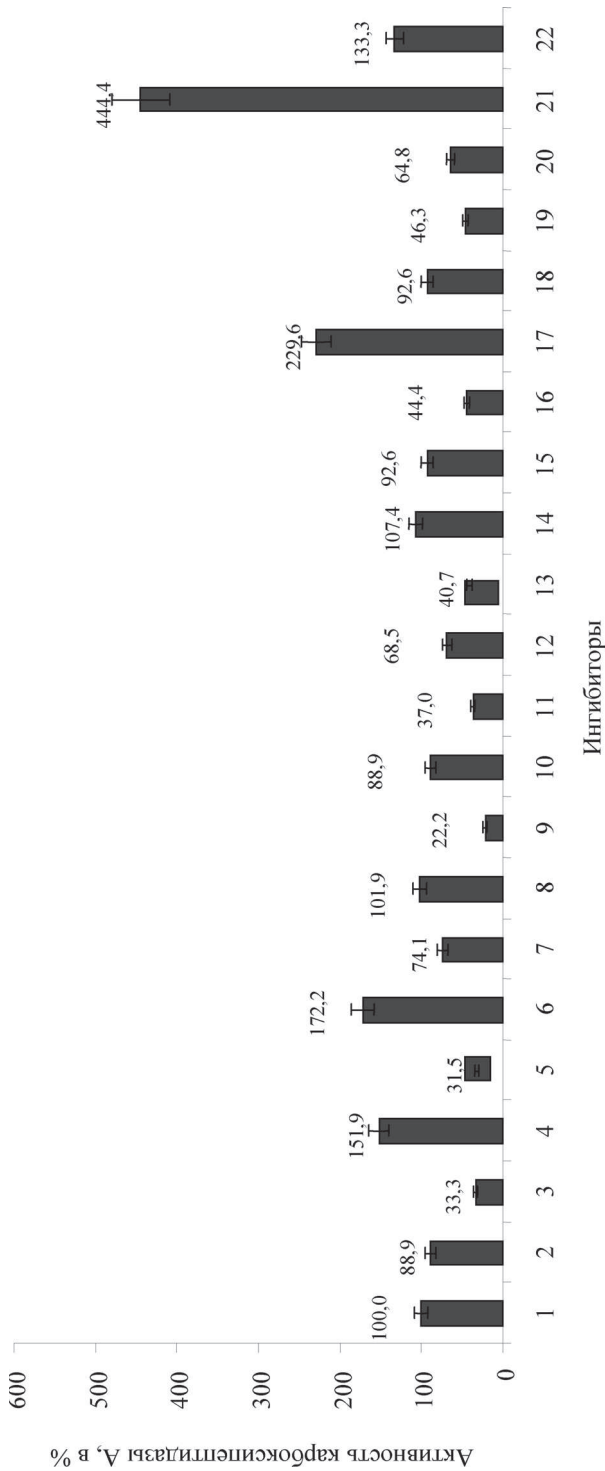


Рис. 3. Влияние ингибиторов на активность карбоксипептидазы А злокачественной опухоли эндометрия (M ± m; n = 6)

Примечание: 1 — контроль; 2 — трипон X-100 8,33 мкг; 3 — трипон X-100 16,7 мкг; 4 — ингибитор трипсина из сои 0,017 мкг; 5 — ингибитор трипсина из сои 0,034 мкг; 6 — лейпептин 0,017 мкг; 7 — лейпептин 0,034 мкг; 8 — пепстатин 0,017 мкг; 9 — пепстатин 0,034 мкг; 10 — ФМСФ 0,17 мМ; 11 — ФМСФ 0,34 мМ; 12 — ПХМБ 0,17 мМ; 13 — ПХМБ 0,34 мМ; 14 — ЭДТА 0,085 мМ; 15 — ЭДТА 0,17 мМ; 16 — ЭДТА 0,34 мМ; 17 — 1,10 — фенантролин 0,17 мМ; 18 — 1,10 — фенантролин 0,34 мМ; 19 — 1,10 — фенантролин 0,68 мМ; 20 — гистидин 0,17 мМ; 21 — триптофан 0,17 мМ; 22 — тирозин 0,17 мМ.

Остаточная активность фермента представлена в % по отношению к показаниям контроля, принятым за 100%.

ной опухоли эндометрия был менее чувствительным к действию данного ингибитора (рис. 1, 2, 3).

Прединкубация карбоксипептидазы А эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, и пептидазы А злокачественной опухоли эндометрия с возрастающими концентрациями ПХМБ приводила к значительному (на 66,7 и 59,3% соответственно) снижению активности фермента и к полному его ингибированию в случае препарата из доброкачественной опухоли эндометрия (рис. 1, 2, 3).

Известно, что активность многих ферментов угнетается аминокислотами, которые входят в состав синтетических полиаминокислотных субстратов или являются продуктами реакции [11]. Прединкубация карбоксипептидазы А с триптофаном приводила к незначительному снижению активности пептидазы эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, и к заметному повышению активности пептидазы опухолевых тканей пропорционально степени малигнизации (рис. 1, 2, 3). Ароматическая аминокислота тирозин, наоборот, увеличивала активность карбоксипептидазы А эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, и снижала активность пептидазы опухолевых тканей, особенно в случае фермента доброкачественной опухоли (рис. 1, 2, 3).

Прединкубация с гистидином приводила к значительному снижению (на 72,5%) активности карбоксипептидазы А из опухолей эндометрия и увеличивала активность пептидазы эндометрия, не затронутого опухолевым процессом (рис. 1, 2, 3).

Хелатные реагенты — ЭДТА и в большей степени 1,10-фенантролин — во всех случаях снижали активность карбоксипептидазы А, а степень ингибирования была прямо пропорциональна концентрации ингибитора. Это свидетельствует о том, что в молекуле фермента металл ( $Zn^{2+}$ ) расположен вблизи поверхности белковой молекулы, что делает его доступным для действия хелатного реагента (рис. 1, 2, 3).

Активность карбоксипептидазы А эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, восстанавливалась в присутствии 2,0 мМ дитиотреитола, что свидетельствует об участии SH-групп в каталитической функции этого фермента (рис. 4 а). В отличие от этого, активность карбоксипептидазы А опухолевых тканей эндометрия повышалась в присутствии как дитиотреитола, так и цистеина (рис. 4 б, в). Это также свидетельствует об участии SH-групп в каталитической функции этих ферментов.

Возрастающие концентрации ионов цинка полностью подавляли активность фермента, выделенного из ткани эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, а также ткани доброкачественной опухоли и в меньшей степени влияли на активность карбоксипептидазы А злокачественной опухоли эндометрия (рис. 4 а, б, в).

Таким образом, изучение действия ингибиторов и активаторов на активность карбоксипептидазы А эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, и карбоксипептидазы А опухолевых тканей эндометрия показало, что между физико-химическими свойствами этих пептидаз имеются существенные различия. В гидролизе карбобензоксиглутамилфенилаланина карбоксипептидазой А эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, и ферментом опухолевых тканей эндометрия могут принимать участие гидроксильные группы серина, карбоксильная группа аспарагиновой кислоты и тиоловая группа цистеина, которая имеет немаловажное значение для проявления ферментативной активности карбоксипептидазы А этих тканей.

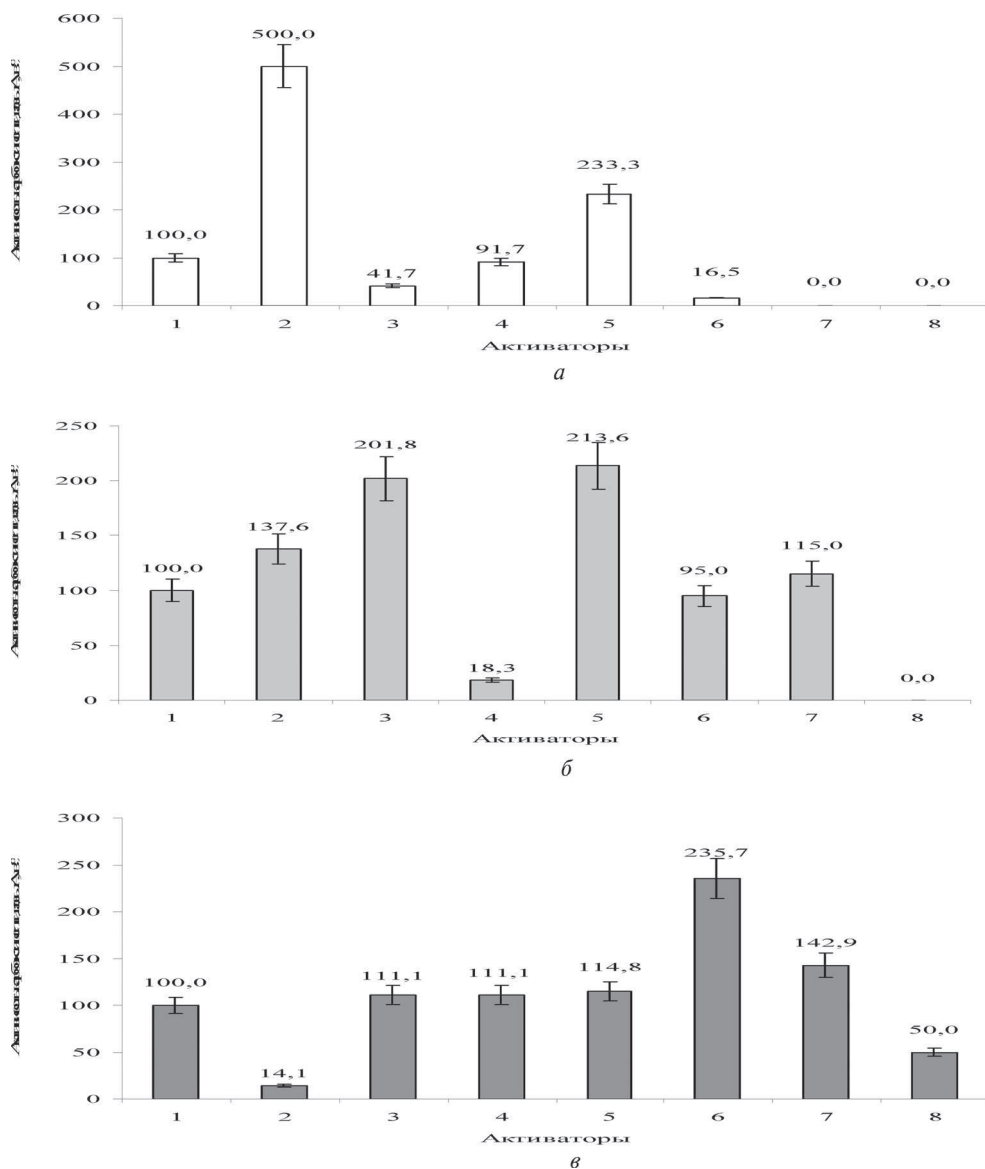


Рис. 4. Влияние активаторов на активность карбоксипептидазы А немалигнизированного эндометрия (а), доброкачественной (б) и злокачественной (в) опухоли эндометрия (M ± m, n = 4)

Примечание: 1 — контроль; 2 — цистеин 0,008 мМ; 3 — цистеин 0,017 мМ; 4 — дитиотреитол 0,17 мМ; 5 — дитиотреитол 0,34 мМ; 6 — Zn<sup>++</sup> 0,08 мМ; 7 — Zn<sup>++</sup> 0,17 мМ; 8 — Zn<sup>++</sup> 0,34 мМ.

Остаточная активность фермента представлена в % по отношению к показаниям контроля, принятым за 100%.

## Выводы

1. Малигнизация эндометрия характеризуется снижением чувствительности карбоксипептидазы А к хелатным реагентам и возрастающим концентрациям цинка.

2. Активность карбоксипептидазы А эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, увеличивается в присутствии дитиотреитола, а активность пептидазы опухолевых тканей — в присутствии цистеина и дитиотреитола.

3. Триптофан незначительно снижает активность пептидазы эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, и повышает активность пептидазы опухолевых тканей по мере увеличения степени малигнизации ткани.

4. Гистидин значительно снижает активность карбоксипептидазы А доброкачественной и злокачественной опухоли эндометрия и увеличивает активность пептидазы эндометрия, не затронутого опухолевым процессом.

5. Карбоксипептидазы А эндометрия, не затронутого опухолевым процессом, и опухолевой тканей эндометрия являются сериновыми карбоксипептидазами, в каталитической функции которых принимают участие карбоксильная группа аспарагиновой кислоты, гистидин и SH-группа цистеина.

## Литература

1. Колодзейская М. В., Пилявская А. С. Пептидазы. — К.: Наук. думка, 1982. — 176 с.
2. Пилявская А. С. Выделение и свойства карбоксипептидазы *Streptomyces Griseus*. — К., 1977. — 133 с.
3. Неорганическая биохимия. — М.: Мир, 1978. — Т. 1. — С. 504–505.
4. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization / S. M. Goldstein, C. E. Kaempfer, J. T. Kealey, B. U. Wintroub // *J. Clin. Invest.* — 1989. — Vol. 83, № 5. — P. 1630–1636.
5. Purification and properties of five different forms of human procarboxy-peptidases / R. Pascual, F. J. Burgos, M. Salva, F. Soriano, E. Mendez, F. X. Aviles // *Eur. J. Biochem.* — 1989. — Vol. 179, № 3. — P. 609–616.
6. Skidgel R. A., Davis R. M., Tan F. Human carboxypeptidase M. Purification and characterization of a membranebound carboxypeptidase that cleaves peptide hormones // *J. Biol. Chem.* — 1989. — Vol. 264, № 4. — P. 2236–2241.
7. Cleavage of atrial natriuretic peptide by a kidney membrane-bound carboxypeptidase A / A. Michel, J. Nortier, A. Humblet, C. Paradis, E. De Prez, M. Deschodt-Lanckman // *Peptides.* — 1998. — Vol. 19, № 5. — P. 907–912.
8. Skidgel R. A., Deddish P. A., Davis R. M. Isolation and characterization of a basic carboxypeptidase from human seminal plasma // *Arch. Biochem. Biophys.* — 1988. — Vol. 267. — № 2. — P. 660–667.
9. Construction and chemotherapeutic potential of carboxypeptidase A/mono-clonal antibody conjugate / A. Esswein, E. Hanseler, Y. Montejano, K. S. Vitols, F. M. Huennekens // *Adv. Enzyme. Regul.* — 1991. — Vol. 31. — P. 3–12.
10. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высшая школа, 1967. — 326 с.
11. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М: Мир, 1966. — С. 388–389.

**І. Л. Вовчук**

Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,  
кафедра біохімії,  
вул. Дворянська 2, Одеса, 65082, Україна. Тел: (0482)687875,  
e-mail: irvov@mail.ru

**РЕГУЛЯЦІЯ АКТИВНОСТІ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А ЕНДОМЕТРІЯ ЖІНОК  
ДЕЯКИМИ ІНГІБІТОРАМИ ТА АКТИВАТОРАМИ**

**Резюме**

Дослідження впливу інгібіторів та активаторів на активність препаратів карбоксипептидази А тканини ендометрію, неуразеного пухлинним процесом, та пухлинної тканини ендометрію показало, що каталітична функція цього ферменту здійснюється з участю гідроксильних груп серину, карбоксильної групи аспарагинової кислоти та тіолової групи цистеїну. Виявлені відмінності в реакції ферментів з пухлинної тканини та ендометрію, неуразеного пухлинним процесом, на присутність інгібіторів та активаторів.

**Ключові слова:** карбоксипептидаза А, активатори, інгібітори, ендометрій, пухлина.

**I. L. Vovchuk**

Odessa I. I. National Mechnikov University,  
Department of Biochemistry,  
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65082, Ukraine. Tel: (0482)687875,  
e-mail: irvov@mail.ru

**ACTIVATORS AND INHIBITORS REGULATION OF ACTIVITY  
OF CARBOXYPEPTIDASE A FROM WOMEN'S ENDOMETRIUM**

**Summary**

The investigation of inhibitors and activators effects has shown that serine hydroxo groups of active center of carboxypeptidase A carboxy group of aspartate and tiol group of cysteine take part in catalysis of carboxypeptidase A from nonmalignant tissue and from benign tumor of endometrium. Distinctions in reaction of enzymes from tumoral and nonmalignant tissue on presence inhibitors and activators are revealed.

**Key words:** carboxypeptidase A, activators, inhibitors, endometrium, tumour.