

УДК 577.15

І. Л. Вовчук¹, канд. біол. наук, доц., С. С. Чернадчук¹, асп.,
Ю. В. Блохін², доц., Г. С. Раздражнюк³, зав. патоморфологічної лаб.

¹ 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

² Одеський медичний університет ім. В. І. Пірогова,
кафедра судової медичної експертизи,
пр. Валівський, 2, Одеса, 65026, Україна

³ Одеський хірургічний онкологічний диспансер,
патоморфологічна лабораторія,
вул. Нежданова, 32, Одеса, 65007, Україна. Тел: (0482) 732-72-03

АКТИВНІСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗ У ТКАНИНАХ НОВОУТВОРЕНЬ ТІЛА МАТКИ

Досліджена активність карбоксипептидаз А і В доброякісних та злоякісних новоутворень тіла матки. Встановлено, що у доброякісних новоутвореннях активність карбоксипептидаз змінюється в залежності від проліферуючого потенціалу пухлинних клітин міометрія та ендометрія. Активність карбоксипептидаз А і В в злоякісній епітеліальній пухлині ендометрія — аденокарциномі — прямопропорційна ступеню диференціації пухлинних клітин.

Ключові слова: карбоксипептидаза, ендометрій, міометрій, аденокарцинома, пухлина.

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

Основними представниками лізосомальних екзопептидаз є карбоксипептидази А і В (КФ 3.4.12A.1.).

Лізосомальна карбоксипептидаза А синтезується у підшлунковій залозі у вигляді неактивного попередника — прокарбоксипептидази А, яка може перетворюватися в активний фермент під впливом трипсину, хімотрипсину, плазміну, субтилізіну, урокінази. Дана карбоксипептидаза містить атоми Zn^{2+} та широко використовується в препаративній біохімії для визначення С-кінцевих амінокислот [1].

Що стосується специфічності карбоксипептидази В, то вона здатна гідролізувати С-кінцеві пептидні зв'язки багатьох природних пептидів і поліпептидів — глюкагону, А- і В-ланцюгів інсуліну, брадикініну, ангіотензинів І і ІІ та окситоцину [8].

Карбоксипептидази А і В мають пептидазну та естеразну активність. Будучи типовими пептидазами, вони діють як на білки, так і на низькомолекулярні субстрати [2].

Збільшення активності карбоксипептидази А виявлено за епітеліальної трансплантованої ацинарної карциноми підшлункової залози щурів [3], експериментальної глюкокортикостероїдної міопатії у кролів [4], в клітинах підшлункової залози великої рогатої худоби при вірусіндукованому діабеті [5] та при захворюваннях підшлункової залози, які супроводжуються появою 2-х форм карбоксипептидази, відсутніх у здорових людей [6].

Окремими дослідниками була встановлена антиканцерогенна дія карбоксипептидази А, яка індукує диференціацію проліферуючих клітин при еритролейкемії у щурів [7], а в культурі клітин андрогеннезалежного раку простати виявлена її гіперацитилуюча дія на гістони [8].

Активність карбоксипептидази В значно збільшується при гострому панкреатиті, що дозволило використовувати метод визначення активності даного ферменту для діагностики і прогнозування панкреатичних некрозів [9]. Однак, у світовій літературі нами не виявлено досліджень, присвячених активності карбоксипептидаз А і В за онкопатології тканин тіла матки.

Мета нашої роботи — дослідження активності карбоксипептидаз А і В в тканинах новоутворень тіла матки з урахуванням вікових змін жіночого організму.

Матеріали і методи

Досліджували гомогенати неуразеної тканини тіла матки та зразки новоутворень ендометрія та міометрія, вилучених операційним шляхом у жінок, які не отримували медикаментозного доопераційного лікування.

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

Патоморфологічні діагнози були верифіковані за міжнародною класифікацією ВОЗ із визначенням морфологічного стану і ступеня диференціації трансформованих клітин пухлинної тканини [10].

У супернатанті визначали активність карбоксипептидази А по гідролізу синтетичного субстрату Hippuryl-Phe — 2 мМ [11], активність карбоксипептидази В — по гідролізу Hippuryl-Arg — 2 мМ [11] та вміст білка — за методом Lowry [12].

Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 570 нм, відносну активність ферментів виражали в ммольх фен (арг) / мг тканини за 30 хв. інкубації при 37 °C, питому активність — в ммольх фен (арг) / мг білка.

Статистичну значимість відмінностей між вибірками визначали за допомогою критерія Ст'юдента [13].

Результати та їх обговорення

Дослідження активності карбоксипептидаз А і В в тканинах тіла матки без патології не виявило вірогідної різниці показників у жінок

різного віку (табл. 1, табл. 2). В той же час активність досліджуваних екзопептидаз у зразках доброякісних та злоякісних новоутворень вірогідно зменшувалась у жінок віком після 60—70 років (табл. 1, табл. 2). У жінок однієї вікової групи активність карбоксипептидази А (табл. 1) вірогідно збільшувалась у тканинах злоякісних пухлин як у порівнянні з неураженою тканиною тіла матки, так і по відношенню до тканин доброякісних новоутворень. З цього правила виняток складають жінки віком 61—70 років. Активність карбоксипептидази В (табл. 2), також як і активність карбоксипептидази А, вірогідно збільшувалась у тканинах злоякісних пухлин у порівнянні з неураженою тканиною, однак, навідмінно від карбоксипептидази А, досліджуваний показник не змінювався за розвитку неопластичних процесів у тілі матки жінок однієї вікової групи (табл. 2).

Вивчення активності карбоксипептидаз А і В в тканинах новоутворень міометрія, у порівнянні з тканинами неущожденного міометрія, показало вірогідне збільшення відносної (в 1,4 і 2,1 рази відповідно) та питомої (в 2,1 і 3,4 рази) активності ферментів за наявності новоутворень з великим проліферативним потенціалом (табл. 3).

У зразках новоутворень ендометрія у порівнянні з неураженою тканиною встановлено збільшення активності досліджуваних ферментів (в 1,4—2,2 рази) за наявності одночасно гіперпластичних і неопластичних процесів (табл. 3). Збільшення активності цих ферментів може здійснюватися за рахунок більш інтенсивної експресії генів, кодуючих їх структуру, що було показано роботами Kikuchi (1989) на трансгенних щурах, в цитоплазмі яких доведено збільшення кількісного рівня мРНК [7] за наявності пухлин. Іншою причиною може бути активація ферментів під впливом метаболітів пухлини. Крім того, слід зазначити, що при гіперпластичних процесах (ендометріоз, аденоматоз, аденоматоз + залозо-кістозна гіперплазія, ендометріоз + аденоматоз + залозо-кістозна гіперплазія) нами встановлено значне зниження вмісту білка, що, можливо, є одним із пояснень збільшення питомої активності ферментів.

Вивчення активності карбоксипептидаз А і В за злоякісного процесу в тканинах тіла матки виявило збільшення активності ферментів (відносно до показників неураженої тканини), за винятком зразків низькодиференційованої аденокарциноми (табл. 4).

Дослідження активності карбоксипептидаз у зразках аденокарциноми різного ступеня диференціації (табл. 4) виявило, що по мірі зниження ступеня диференціації пухлинних клітин активність досліджуваних ферментів падає.

Зниження активності карбоксипептидаз в низькодиференційованих, бластоматозних злоякісних пухлинах, на наш погляд, може свідчити про порушення біологічних функцій даних ферментів та виключення їх з процесу обміну білків.

Таблиця 1

Активність карбоксипептидази А у тканинах тіла матки жінок різного віку

Вік. років	Неуражена тканина			Доброякісні новоутворення			Злоякісні пухлини		
	С білка, г/г тканини	ммоль фен/ мг тканини	мкмоль фен/мг білка	С білка, г/г тканини	ммоль фен/ мг тканини	мкмоль фен/мг білка	С білка, г/г тканини	ммоль фен/ мг тканини	мкмоль фен/ мг білка
30-40	0,068±0,008 (n=27)	0,094±0,010	1,382±0,120	0,042±0,003 (n=45)	0,125±0,011	2,976±0,312 [*]	—	—	—
41-50	0,060±0,006 (n=25)	0,099±0,010	1,650±0,179	0,045±0,004 (n=55)	0,115±0,013	2,555±0,267 [*]	0,047±0,006 (n=10)	0,175±0,038 ^{* #}	3,723±0,413 ^{* #}
51-60	0,063±0,005 (n=25)	0,080±0,009	1,269±0,128	0,037±0,003 (n=52)	0,106±0,009	2,864±0,333 [*]	0,037±0,004 (n=14)	0,160±0,034 ^{* #}	4,324±0,497 ^{* #}
61-70	0,046±0,004 (n=25)	0,070±0,008	1,521±0,163	0,032±0,002 (n=37)	0,126±0,011 [*]	3,937±0,402 [*]	0,067±0,007 (n=7)	0,206±0,042 ^{* #}	3,074±0,407 ^{* #}
Більше 70	—	—	—	0,058±0,007 (n=25)	0,021±0,003 [↓]	0,362±0,024 [↓]	0,056±0,006 (n=5)	0,112±0,029 [#]	2,000±0,307 ^{↓ #}

Примітка: * — вірогідне збільшення активності ферменту за патології у порівнянні з неураженими тканинами;

↓ — вірогідне зниження активності ферменту за патології, пов'язане з віком досліджуваних осіб;

— вірогідна різниця між показниками тканин злоякісних пухлин тіла матки і тканинами доброякісних новоутворень у жінок однієї вікової групи

Таблиця 2

Активність карбоксипептидази В у тканинах тіла матки жінок різного віку

Вік, років	Неуражена тканина			Доброякісні новоутворення			Злоякісні пухлини		
	С білка, г/г тканини	ммоль арг/ мг тканини	мкмоль арг/ мг білка	С білка, г/г тканини	ммоль арг/ мг тканини	мкмоль арг/ мг білка	С білка, г/г тканини	ммоль арг/ мг тканини	мкмоль арг/ мг білка
30-40	0.068±0.008 (n=27)	1.908±0.200	28.058±2.656	0.042±0.003 (n=45)	2.400±0.236	57.142±5.678*	0.051±0.004 (n=5)	2.346±0.251	46.000±5.025*
41-50	0.060±0.006 (n=25)	1.616±0.154	26.940±2.512	0.045±0.004 (n=55)	2.433±0.228*	54.066±5.395*	0.047±0.006 (n=10)	2.623±0.280*	55.808±6.621*
51-60	0.063±0.005 (n=25)	1.560±0.160	24.761±2.501	0.037±0.003 (n=52)	2.322±0.220*	62.756±6.321*	0.037±0.004 (n=14)	2.125±0.200*	57.432±6.802*
61-70	0.046±0.004 (n=25)	1.445±0.138	31.413±3.450	0.032±0.002 (n=37)	1.560±0.148↓	48.750±5.007*↓	0.067±0.007 (n=7)	2.289±0.237*#	34.164±4.387#
Більше 70	—	—	—	0.058±0.007 (n=25)	1.324±0.123↓	22.827±2.311↓	0.056±0.006 (n=5)	1.257±0.102↓	22.446±2.428↓

Примітка: * — вірогідне збільшення активності ферменту за патології у порівнянні з неураженими тканинами;

↓ — вірогідне зниження активності ферменту за патології, пов'язане з віком досліджуваних осіб;

— вірогідна різниця між показниками тканин злоякісних пухлин тіла матки і тканинами доброякісних новоутворень у жінок однієї вікової групи

Таблиця 3

Активність карбоксипептидаз А і В в тканинах тіла матки

Патоморфологічний критерій	n	С білка, г/г тканини	Карбоксипептидаза А		Карбоксипептидаза В	
			ммоль фен/ мг тканини	ммоль фен/ мг білка	ммоль арг/ мг тканини	ммоль арг/ мг білка
Тканина неуразеного міометрія	102	0.064±0.006	0,122±0,011	1,906±0,198	1,561±0,145	24,390±2,278
Доброякісні новоутворення міометрія: фібролейоміома	42	0.043±0.004↓	0,074±0,006↓	1,720±0,164	1,510±0,146	35,116±2,845↑
фібролейоміома проліферуюча	31	0.039±0.003↓	0,178±0,014↑	4,564±0,476↑	3,311±0,311↑	84,871±7,986↑
Тканина неуразеного ендометрія	102	0.058±0.006	0,106±0,009	1,827±0,167	1,700±0,165	29,310±3,015
Доброякісні новоутворення ендометрія: кістотатозна атрофія	16	0.058±0.006	0,102±0,008	1,758±0,154	2,652±0,221↑	45,683±3,980↑
ендометріоз	29	0.032±0.003↓	0,133±0,011	4,156±0,398↑	1,000±0,087	31,252±3,074
залозо-кістозна гіперплазія	12	0.043±0.003↓	0,116±0,010	2,697±0,234↑	2,320±0,227↑	50,431±4,963↑
ендометріоз + залозо-кістозна гіперплазія	11	0.056±0.006	0,199±0,020↑	3,553±0,370↑	1,583±0,127	25,950±2,111
аденоматоз	15	0.038±0.004↓	0,144±0,012↑	3,789±0,378↑	2,703±0,288↑	71,050±6,131↑
аденоматоз + залозо-кістозна гіперплазія	15	0.033±0.002↓	0,099±0,007	3,000±0,313↑	1,871±0,149	53,434±4,960↑
ендометріоз + аденоматоз + залозо-кістозна гіперплазія	27	0.035±0.003↓	0,236±0,018↑	6,742±0,689↑	2,520±0,231↑	76,360±6,838↑

Примітка: ↑, ↓ — вірогідна різниця між показниками неуразених тканин тіла матки і тканинами новоутворень (P<0,05)

Таблиця 4

Активність карбоксипептидази А і В в тканині ендометрія

Патоморфологічний критерій	n	С білка, г/г тканини	Карбоксипептидаза А		Карбоксипептидаза В	
			ммоль фен/мг тканини	мкмоль фен/мг білка	ммоль арг/мг тканини	мкмоль арг/мг білка
Тканина неуразеного ендометрія	102	0,058 ± 0,006	0,106 ± 0,009	1,827 ± 0,167	1,700 ± 0,165	29,310 ± 3,015
Високодиференційована аденокарцинома	14	0,055 ± 0,004	0,152 ± 0,010*	2,760 ± 0,270*	2,711 ± 0,250*	49,207 ± 4,678*
Помірнодиференційована аденокарцинома	19	0,055 ± 0,004	0,132 ± 0,011*	2,406 ± 0,244*	2,427 ± 0,205*	44,000 ± 3,927*
Низькодиференційована аденокарцинома	8	0,066 ± 0,006	0,102 ± 0,011↓	1,308 ± 0,107↓	2,142 ± 0,193↓	32,428 ± 3,180↓

Примітка: * — вірогідне збільшення активності ферментів у тканинах пухлин;

↓ — вірогідне зниження активності ферментів низькодиференційованої аденокарциноми по відношенню до пухлин іншого ступеня диференціювання клітин

Висновки:

1. За доброякісних новоутворень ендометрія та міометрія активність карбоксипептидаз А і В в тканинах змінюється в залежності від проліферуючого потенціалу пухлинних клітин.
2. Активність карбоксипептидаз А і В злоякісної епітеліальної пухлини ендометрія — аденокарциноми — прямопропорційна ступеню диференціації пухлинних клітин.
3. Активність карбоксипептидаз А і В в новоутвореннях тіла матки вірогідно зменшується у жінок після 70 років у порівнянні з жінками інших вікових груп.

Література

1. Peterson L. M., Holmgvist B. Human serum procarboxypeptidase A // *Biochemistry*. — 1983. — V. 22. — № 13. — P. 3077—3082.
2. Spilburg C. A., Bethune J. L., Valee B. L. Kinetic properties of crystalline enzymes. Carboxypeptidase A // *Biochemistry*. — 1977. — № 16. — P. 1142—1150.
3. Hansen L. J., Mangkorkanok/Mark M., Reddy J. Immunohistochemical localization of pancreatic exocrine enzymes in normal and neoplastic pancreatic acinar epithelium of rat // *J. Histochem. Cytochem.* — 1981. — V. 29. — № 2. — P. 309—313.
4. Sohar I., Nagy I., Heiner I., Kovacs I., Cuba F. Proteases and proteinase inhibitors in experimental glyccorticosteroid myopathy // *Acta Physiol. Sci Hung.* — 1982. — V. 60. — № 1—2. — P. 43—51.
5. 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.
6. 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.
7. Kikuchi M., Fukuyama K., Hirayama K., Epstein W. Purification and characterization of carboxypeptidase from terminally differentiated rat epidermal cells // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1989. — V. 991. — № 1. — P. 19—24.
8. Сологуб Л. І., Пашковська І. С., Антоняк Г. Л. Протеази клітин та їх функція — К: Наукова думка. — 1992. — 195 с.
9. Serum levels of procarboxypeptidase B and its activation peptide in patients with acute pancreatitis and non- pancreatic diseases / Muller C. A., Apperlos S., Unk W., Buchler M et al. // *Gast.* — 2002. — V. 51. — N 2. — P. 229—235.
10. Всемирная Организация Здравоохранения // Материалы ежегодных отчетов. — Санкт-Петербург. — 1981. — 286 с.
11. Bradshaw R. S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. — 1969. — V. 63. — P. 1389—1394.
12. Protein measurement with the Folin phenol reagent / Lowry O. H., Rosenbrough N. I., Fan A. Z., Randol R. J. // *J. Biol. Chem.* — 1951. — V. 193. — P. 265—275.
13. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высш. Школа. — 1967. — 326 с.

И. Л. Вовчук, С. С. Чернадчук, Ю. В. Блохин, Г.С. Раздражнюк

Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова,
кафедра биохимии,

ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина. e-mail: irvov@mail.ru

Одесский медицинский университет им. В. И. Пирогова,

кафедра судебной медицинской экспертизы,

пр. Валиховский, 2, Одесса, 65026, Украина.

Одесский хирургический онкологический диспансер,

патоморфологическая лаборатория,

ул. Нежданова, 32, Одесса, 65007, Украина.

АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗ В ТКАНЯХ НОВООБРАЗОВАНИЙ ТЕЛА МАТКИ

Резюме

Изучена активность карбоксипептидаз А и В в доброкачественных и злокачественных новообразованиях тела матки. Установлено, что в доброкачественных новообразованиях активность карбоксипептидаз изменяется в зависимости от пролиферативного потенциала опухолевых клеток миометрия и эндометрия. Активность карбоксипептидаз А и В в злокачественной эпителиальной опухоли эндометрия — аденокарциноме — прямопропорциональна степени дифференциации опухолевых клеток.

Ключевые слова: карбоксипептидазы, эндометрий, миометрий, аденокарцинома, опухоль.

I. L. Vovchuk, S. S. Chernadchuk, U. V. Blohin, G. S. Razdrzhnuk

Odessa National I. I. Mechnikov University,

Department of Biochemistry,

Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine, e-mail: irvov@mail.ru

Odessa Medical V. I. Pirogova University,

Department of legal expertise,

Valihovskiy St., 2, Odessa, 65026, Ukraine.

Odessa dispanser of oncology and surgery, patomorfology laboratory,

Nezhdanova St., 32, Odessa, 65007, Ukraine.

TISSUE CARBOXYPEPTIDASES ACTIVITY OF THE WOMEN WITH WOMB BODY ONCOPATHOLOGY

Summary

A and B carboxypeptidases activity was studied in the benignant and the malignant tumors of the womb body. It was determined that the activity of carboxypeptidases depending on the vastness and depth of the oncoprocess in the benignant tumors is defined by proliferating potential of tumor cells of miometrial and endometrial. The A and B carboxypeptidases activity in malignant epithelial tumor of endometrial — adenocarcenoma — is inversely proportional to the level of differentiation of the tumor cells.

Keywords: carboxypeptidases , endometrial, miometrial, adenocarcenoma, tumor.