

УДК 577.15

І. Л. Вовчук, канд. біол. наук, докторант, **С. С. Чернадчук**, асп.,
Н. В. Мотрук, асп., **К. А. Філіпцова**, студ., **С. І. Каланча**, студ.,
Л. М. Буюклі, студ.

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 МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ

Досліджена активність карбоксипептидази А доброякісних та злоякісних новоутворень молочної залози. Встановлено підвищення активності карбоксипептидази А за наявності пухлинного процесу. В доброякісних новоутвореннях активність ферменту змінюється в залежності від проліферуючого потенціалу пухлинних клітин молочної залози, а в злоякісній пухлині - зворотньопропорційна ступеню диференціації пухлинних клітин.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, молочна залоза, пухлина.

Лізосомальна карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1) в значній мірі забезпечує протеолітичний потенціал клітини [1]. Вона синтезується у вигляді неактивного попередника, який перетворюється в активну форму під впливом трипсину, хімотрисину, субтилізіну, урокінази.

Карбоксипептидаза А розщеплює С-кінцевий пептидний зв'язок поряд з ароматичною амінокислотою в звичайних білках та в низькомолекулярних синтетичних субстратах: карбобензокси-L-фенілаланіні, карбобензокси-L-триптофані та карбобензокси-L-тирозині [2, 3]. Фермент приймає участь у клітинному метаболізмі звичайних та аномальних білків: гемоглобін [4], імуноглобулін [5], антигену гепатиту В [6], нейротоксину III [7]; в протеолітичному процесингу брадикініну [8], інсуліну [9], агоністів опіоїдних гормонів [10]; обмеженому протеолізі попередників ферментів [11-13], а також в анаболізмі дипептидів [14] та глюкагону [15].

Збільшення активності карбоксипептидази А виявлено у епітеліальній трансплантованій ацинарній карциномі підшлункової залози щурів [16], за експериментальної глюкокортикостероїдної міопатії у кролів [17], в клітинах підшлункової залози великої рогатої худоби за вірусіндукованого діабету [18] та при захворюваннях підшлункової залози, які супроводжуються появою двох форм карбоксипептидази, відсутніх у здорових людей [19]. Встановлена антиканцерогенна дія карбоксипептидази А, яка індукує диференціацію проліферуючих клітин [20, 21], диференціацію мукозних клітин в серозні [22], а в культурі клітин андрогеннезалежного раку простати вона викликає гіперацетилюючу дію на гістони [23].

Однак, у світовій літературі нами не виявлено досліджень, присвячених визначенню активності карбоксипептидази А в пухлинних тка-

нинах молочної залози, незважаючи на те, що в останні роки карбоксипептидаза А використовується як складова частина моноклональних препаратів в хіміотерапії онкозахворювань [24, 25].

Мета нашої роботи — дослідження активності карбоксипептидази А в тканинах новоутворень молочної залози.

Матеріали і методи

Досліджували гомогенати постмортальної тканини та зразки новоутворень молочної залози, 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 [26].

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 Hippuryl-Pep — 2 мМ [27] та вміст білка — за методом Lowry [28]. 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 [29].

Результати та їх обговорення

Вивчення активності карбоксипептидази А в тканинах доброякісних новоутворень молочної залози в порівнянні з тканинами неушкодженої молочної залози показало вірогідне збільшення відносної та питомої активностей ферменту в середньому в 2,1–2,6 рази (табл. 1).

Серед доброякісних новоутворень найменша активність карбоксипептидази А, яка незначно відрізняється від показників неураженої тканини, встановлена при фіброзно-кістозній хворобі, ускладненій папіломатозом, а найбільша — за умов інтенсивно проліферуючої фіброзно-кістозної хвороби та у зразках доброякісної листовидної пухлини. 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 [20]. Іншою причиною може бути активація ферментів під впливом метаболітів пухлини.

Вивчення активності карбоксипептидази А за злоякісного процесу виявило збільшення активності ферменту (відносно показників неураженої тканини молочної залози), за винятком зразків високодиференційованої інфільтруючої форми протокового раку молочної залози (табл. 2).

Таблиця 1

Активність карбоксипептидази А в тканинах молочної залози

Патоморфологічний критерій	n	Концентрація білка, г білка / г тканини	Активність карбоксипептидази А	
			ммоль фен / мг тканини	мкмоль фен / мг білка
Тканина неураженої молочної залози	76	0,092 ± 0,012	0,116 ± 0,021	1,26 ± 0,15
Доброякісні патології молочної залози:				
ФКХ не проліферуюча	41	0,072 ± 0,009	0,210 ± 0,033↑	2,92 ± 0,33↑
ФКХ проліферуюча	20	0,073 ± 0,009	0,264 ± 0,028↑	3,61 ± 0,39↑
ФКХ проліферуюча + папіломатоз	13	0,055 ± 0,007	0,177 ± 0,020↑	3,22 ± 0,36↑
Інтраканалікулярна ФБА	12	0,077 ± 0,009	0,227 ± 0,031↑	2,95 ± 0,31↑
Периканалікулярна ФБА	19	0,079 ± 0,009	0,240 ± 0,030↑	3,04 ± 0,33↑
Доброякісна листовидна пухлина	12	0,086 ± 0,009	0,284 ± 0,032↑	3,30 ± 0,38↑

Примітка: ↑ — вірогідне збільшення в порівнянні з неушкодженою тканиною
 ФКХ — фіброзно-кістозна хвороба
 ФБА — фіброаденома

Таблиця 2

Активність карбоксипептидази А тканин інфільтруючого протокового раку молочної залози

Патоморфологічний критерій	n	Концентрація білка г білка / г тканини	Активність карбоксипептидази А	
			ммоль фен / мг тканини	мкмоль фен / мг білка
Тканина неураженої молочної залози	76	0,092 ± 0,012	0,116 ± 0,021	1,26 ± 0,15
Високодиференційована форма інфільтруючого протокового раку	16	0,057 ± 0,007	0,107 ± 0,014	1,88 ± 0,24
Помірнодиференційована форма інфільтруючого протокового раку	42	0,093 ± 0,011	0,230 ± 0,028↑*	2,47 ± 0,29↑*
Низькодиференційована форма інфільтруючого протокового раку	26	0,086 ± 0,009	0,238 ± 0,026↑*	2,76 ± 0,30↑*

Примітка: ↑ — вірогідне збільшення в порівнянні з неураженою тканиною
 * — вірогідне збільшення в порівнянні з високодиференційованою формою

Нами було встановлено, що по мірі зниження ступеня диференціації клітин пухлинної тканини активність досліджуваного ферменту зростає. Ці результати істотно відрізняються від результатів, отриманих нами в попередніх дослідженнях пухлин ендометрію [30], що може свідчити про тканинну специфічність досліджуваного процесу.

Нами було встановлено підвищення активності карбоксипептидази А в процесі розвитку пухлинної тканини (табл. 3).

Таблиця 3

Активність карбоксипептидази А в тканині молочної залози на різних стадіях розвитку злоякісної пухлини

Стадії розвитку злоякісної пухлини	n	Концентрація білка г білка / г тканини	Активність карбоксипептидази А	
			ммоль фен / мг тканини	мкмоль фен / мг білка
Тканина неураженої молочної залози	76	0,092 ± 0,012	0,116 ± 0,021	1,26 ± 0,15
I стадія	13	0,080 ± 0,009	0,254 ± 0,030↑	3,18 ± 0,36↑*
I – II стадія	11	0,058 ± 0,007	0,293 ± 0,032↑	5,05 ± 0,57↑*
II стадія	23	0,095 ± 0,011	0,253 ± 0,031↑	2,66 ± 0,31*
II – III стадія	11	0,087 ± 0,010	0,196 ± 0,023	2,25 ± 0,26
III стадія	16	0,108 ± 0,013	0,285 ± 0,032↑	2,64 ± 0,29*
III – IV стадія	10	0,052 ± 0,007	0,308 ± 0,037↑	5,92 ± 0,67↑*

Примітка: ↑ — вірогідна різниця відносно неураженої тканини

* — вірогідна різниця поміж стадіями розвитку пухлини

На стадіях проліферації (I–II стадія) активність ферменту зростає у порівнянні з неураженою тканиною в 2,5–4,0 рази, що може свідчити про високу інтенсивність метаболічних процесів в пухлинних клітинах, в яких цей фермент може приймати участь у синтезі дипептидів [14, 15]. Наступне підвищення активності в 4,7 рази порівняно з неураженою тканиною припадає на III–IV стадії розвитку — стадію некрозу. Вірогідно, на цій стадії зростає активність ферментів, що беруть участь у катаболізмі білків, одним із таких ферментів є карбоксипептидаза А.

Порівняльне вивчення активності карбоксипептидази А в тканинах неураженої молочної залози та в зразках новоутворень у жінок одного віку виявило вірогідне зростання активності фермента в 1,8–2,9 рази за наявності пухлинного процесу (табл. 4).

Таблиця 4

Активність карбоксипептидази А в тканинах молочної залози у жінок різного віку

Вік	Без патології			
	n	С білка, г білка/г тканини	ммоль фен/мг тканини	мкмоль фен/мг білка
20-30	—	—	—	—
31-40	12	0,090±0,006	0,126±0,011	1,400±0,126
41-50	15	0,094±0,007	0,116± 0,013	1,234±0,140
51-60	17	0,105±0,009	0,120± 0,011	1,143±0,123
61-70	15	0,090±0,007	0,121± 0,011	1,344±0,129
71 і більше	17	0,082±0,006	0,093 ± 0,008	1,134±0,130
Вік	Доброякісні новоутворення			
	n	С білка, г білка/г тканини	ммоль фен/мг тканини	мкмоль фен/мг білка
20-30	13	0,074± 0,007	0,239±0,019	3,229±0,401*
31-40	22	0,098± 0,008	0,223±0,018*	2,276±0,191*
41-50	55	0,076± 0,007	0,225±0,018*	2,961±0,267*
51-60	12	0,077± 0,007	0,229±0,018*	2,974±0,267*
61-70	10	0,070± 0,006	0,226±0,019*	3,228±0,401*
71 і більше	5	0,061± 0,005	0,214±0,018*	3,508±0,421*

Закінчення таблиці 4

Вік	Злоякісні новоутворення			
	n	С білка, г білка/г тканини	ммоль фен/мг тканини	мкмоль фен/мг білка
20-30	—	—	—	—
31-40	9	0,098±0,010	0,277±0,030*↑	2,826±0,333*
41-50	14	0,064±0,007	0,260±0,030*	4,062±0,497*↑
51-60	38	0,087±0,009	0,224±0,024*	2,574±0,303*
61-70	15	0,080±0,009	0,236±0,027*	2,950±0,317*
71 і більше	8	0,080±0,009	0,256±0,036*	3,200±0,390*

Примітка: * — вірогідне збільшення активності ферменту за патології у порівнянні з неуразеними тканинами
 ↑ — вірогідна різниця між показниками тканин злоякісних пухлин молочної залози і тканинами доброякісних новоутворень у жінок однієї вікової групи

Встановлено, що активність карбоксипептидази А зменшується у жінок із злоякісними новоутвореннями молочної залози віком 50 років і більше. Однак найбільша питома активність цього ферменту виявлена у жінок віком 41–50 років, в організмі яких відбуваються гормональні перебудови, що супроводжується значним підвищеннями кількості злоякісних новоутворень.

Висновки:

1. За доброякісних новоутворень активність карбоксипептидази А в тканині молочної залози змінюється в залежності від проліферуючого потенціалу пухлинних клітин.
2. Активність ферменту в тканинах інфільтруючої протокової форми раку молочної залози змінюється зворотнопропорційно ступеню диференціації пухлинних клітин.
3. На стадіях проліферації та некрозу злоякісної пухлини активність карбоксипептидази А зростає.
4. Вікових особливостей активності карбоксипептидази А в неуразеній тканині молочної залози не виявлено. У жінок зі злоякісними пухлинами найбільша питома активність ферменту спостерігалася в предклімактеричний період.

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. Ohe M., Kajita A. Studies on the heterotrophik interaction of hemoglobin J. Mass spectrometrik method for defermination of the pKa of the beta 146 histidine residue in human hemoglobin // *J. Biochim. (Tokyo)*. — 1977. — V. 81. — № 2. — P. 431–434.
5. Bijlenga R. X., Briottek C., Jatou J. C. Structural differences between heavy chains of secreted and membrane - bound JgM of a human lymphoblastoid cell line // *Mol. Immunol.* — 1982. — V. 9. — № 1. — P. 45–49.
6. Peterson D. L. Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen // *J. Biol. Chem.* — 1981. — V. 256. — № 13. — P. 6975–6983.
7. Kopeyan C., Martinez G., Rochat H. Amino acid sequence of neurotoxin III of the scorpion *Androctonus australis Hector* // *Eur. J. Biochem.* — 1979. — V. 94. — № 2. — P. 609–615.
8. Claeson G., Fareed J., Larsson C., Kindel G., Arielly S., Simonsson R., Messmore H. L., Balis J. U. Inhibition of the contractill action of bradykinin on isolated smooth muscle preparations by derivatives of low molecular weight peptides // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 1979. — № 120. — P. 691–713.
9. Schmitt E. W., Gattner H. G. Impoved preparation of des-alany IB 30-insulin // *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* — 1978. — V. 359. — № 7. — P. 799–802.
10. Cohen M. L., Shuman R. T., Osborn J. J., Gesellchen P. Opioid agonist activity of ICI 174864 and its carboxypeptidase degradation product, LY 281217 // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1986. — V. 238. — № 3. — P. 769–772.
11. Takai S., Sahaguchi M., Jin D., Miyazaki M. A new metods for simultaneous measurements of mast cell proteases in human vascular tissue // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* — 2000. — V. 97. — № 9. — P. 700–704.
12. Kominami E., Hashida S., Katunuma N. Proteolytic modification of rat liver fructose-1,6-bisphosphate aldolase by administration of leupeptin in vivo // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1981. — V. — 659. — № 2. — P. 378–389.
13. Stromqvist M. Characterization of recombinant human extracellular superoxide dismutase // *J. Chromatogr.* — 1993. — V. 621. — № 2. — P. 139–148.
14. Vertesi A., Simon L. M. Carboxypeptidase catalyzed dipeptide synthesis in organic media // *J. Biotechnol.* — 1998. — V. 66. — № 1. — P. 75–82.
15. Frandsen E. K., Thim L., Moody A. J., Markussen J. Structure-function relationships in glucagon Re-evaluation of glucagon — (1–2) // *J. Biol. Chem.* — 1985. — V. 260. — № 12. — P. 7581–7584.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. Borulf S., Lindberg T., Hansson L. Agarose gel electrophoresis of duodenal juice in normal condition and in children with malabsonption // *Scand. J. Gastroenterol.* — 1979. — V. 14. — № 2. — P. 151–160.
20. Kikuchi M., Fukuyama K., Hirayama K., Epstein W. Purification and characterization of carboxypeptidase from terminally differentiated rat epidermal cell // *Biochim. Biophys. Asta.* — 1989. — V. 991. — № 1. — P. 19–24.

21. 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.
22. Serafin W. E., Dayton E. T., Gravalles 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.
23. Сологуб Л. І., Пашковська І. С., Антоняк Г. Л. Протеази клітин та їх функція — К: Наукова думка. — 1992. — 195 с.
24. Jaime J., Page M. Paclitaxel immunoconjugate for the specific treatment of ovarian cancer in vitro // *Anticancer Res.* — 2001. — V. 21. — № 2a. — P. 1119–1128.
25. 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.
26. *Всемирная Организация Здравоохранения // Материалы ежегодных отчетов.* — Санкт-Петербург. — 1981. — 286 с.
27. Bradshaw R. S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* — 1969. — V. 63. — P. 1389–1394.
28. 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.
29. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: Высш. Школа. — 1967. — 326 с.
30. 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.

**І. Л. Вовчук, С. С. Чернадчук, Н. В. Мотрук, Е. А. Філіпцова,
С. І. Каланча, Л. Н. Буюкли**

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 МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Резюме

Исследована активність карбоксипептидази А в тканих доброкачественных и злокачественных новообразований молочной железы. Установлено увеличение активности карбоксипептидазы А при наличии опухолевого процесса. В тканях доброкачественных новообразований активность фермента изменяется в зависимости от пролиферативного потенциала опухолевых клеток молочной железы, а в злокачественной опухоли — обратнопропорционально степени дифференциации опухолевых клеток.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, молочная железа, опухоль.

**I. L. Vovchuk, S. S. Chernadchuk, N. V. Motruk, E. A. Filipcova,
S. I. Kalancha, L. N. Buykli**

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 TUMOR OF
THE MAMMALIAN GLAND**

Summary

Carboxypeptidase A activity was studied in the malignant and benignant tumor tissue of mamalian gland. Carboxypeptidase A activity increase was established at the presense of the tumor process. Activity of the enzyme in the benignant tumors changes depending on the proliferation potential of the tumor cells of mammalian gland. In malignant tumors carboxypeptidase A activity is inversely proportional to the tumor cell's differentiation level.

Keywords: carboxypeptidase A, mamalian gland, tumor.