

УДК 577.152.34:612.62:616

І. Вовчук, д-р біол. наук
Одеський медичний університет ім. І. І. Мечникова, Одеса**ВПЛИВ КАТІОНІВ ДВОВАЛЕНТНИХ МЕТАЛІВ НА АКТИВНІСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А НЕМАЛІГНІЗОВАНОГО ТА ПУХЛИННОГО ЯЄЧНИКА**

Досліджено вплив катіонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А, яка була отримана із немалігнізованого та пухлинних тканин яєчника жінок. Встановлено, що всі досліджені катіони двовалентних металів проявляли негативний вплив на активність карбоксипептидази А як неуразеного, так і пухлинного яєчника, однак потужність впливу була неоднаковою. Ензим, який був виділений із злоякісної пухлини яєчника найбільш чутливий до впливу катіонів двовалентних металів.

Ключові слова: карбоксипептидаза А, пухлина, яєчник.

Вступ. Лізосомальна карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1), що гідролізує амінокислоти з С-кінця (за винятком аргініну, лізину та проліну) отримана з деяких тканин людини: підшлункової залози [12, 14], легенів [11], шкіри [11] і нирок [13].

Згідно з дослідженнями деяких авторів на активацію та каталітичну активність протеолітичних ензимів негативно впливають такі катіони важких металів, як Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , а негативний вплив Mg^{2+} , Ca^{2+} є незначним [5, 15, 16, 19].

За літературними даними більшість карбоксипептидаз є або класичними металоензимами, або метало залежними пептидазами, для прояву активності яких необхідні певні катіони одно- або, найчастіше – двовалентних металів [4, 8, 17].

Для більшості відомих карбоксипептидаз іони Mn^{2+} , Mg^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} є активаторами, а іони Ca^{2+} , в більшості випадків, стабілізаторами активності ензиму [1, 4, 8, 17]. Проте, відомості про структуру і фізико-хімічні властивості виділених ферментів в більшості випадків є неповними.

У зв'язку з цим мета наших досліджень полягала у вивченні впливу катіонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А, виділеної з тканини немалігнізованого яєчника, доброякісної і злоякісної пухлин яєчника жінок.

Матеріали та методи. Матеріал для дослідження був наданий патоморфологічною лабораторією Одеського обласного онкологічного диспансеру. Патоморфологічну і гістологічну верифікацію діагнозів по вимогах ВОЗ [6] проводили гістологи сертифікованої і ліцензованої патоморфологічної лабораторії Одеського обласного онкологічного диспансеру. Отримання анатомічних матеріалів для досліджень, дотримання етичних і правових норм згідне: Гельсінської Декларації (1964 р.), Конвенції про захист прав і достоїнств людини у зв'язку з викорис-

танням досягнень біології і медицини (Конвенція про права людини і біомедицину 1996 р.), закону України "Про трансплантацію органів і інших анатомічних матеріалів людині" (1999 р.) забезпечувалося медичною установою, що надавала матеріал для дослідження, згідно з угодою про спільні дослідження. Пацієнтки були поінформовані та дали письмову згоду на використання біологічного матеріалу для біохімічних досліджень.

Для дослідження впливу катіонів на активність карбоксипептидази А, виділеної з немалігнізованого і пухлинного яєчника, 0,1 мл розчину ензиму і 0,1 мл розчину катіону в концентрації 5×10^{-4} М інкубували протягом 60 хв при температурі 37°C . Про ефективність дії катіонів судили за величиною гідролізу 2,0 мМ карбобензоксиглутамілфенілаланіну за 30 хв інкубації при 37°C при рН 5,2 [3, 9]. Використовували водні розчини солей двовалентних металів: хлоридів Hg^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , Ba^{2+} , Mg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} і ацетатів – Pb^{2+} , Zn^{2+} . Інгібування або активування ензиму виражали у відсотках по відношенню до його активності в пробі без катіону двовалентного металу.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою U-критерію Мануа-Уїтні [2].

Результати та їх обговорення. Було встановлено, що за оптимального значення рН активність карбоксипептидази А як немалігнізованого так і пухлинного яєчника не збільшувалася у присутності катіонів, що є найбільш поширеними активаторами або стабілізаторами металоензимів (рис. 1). Всі досліджені катіони двовалентних металів пригнічували активність карбоксипептидази А немалігнізованого яєчника та ензима доброякісної і злоякісної пухлини яєчника, проте величина цієї дії, була неоднаковою.

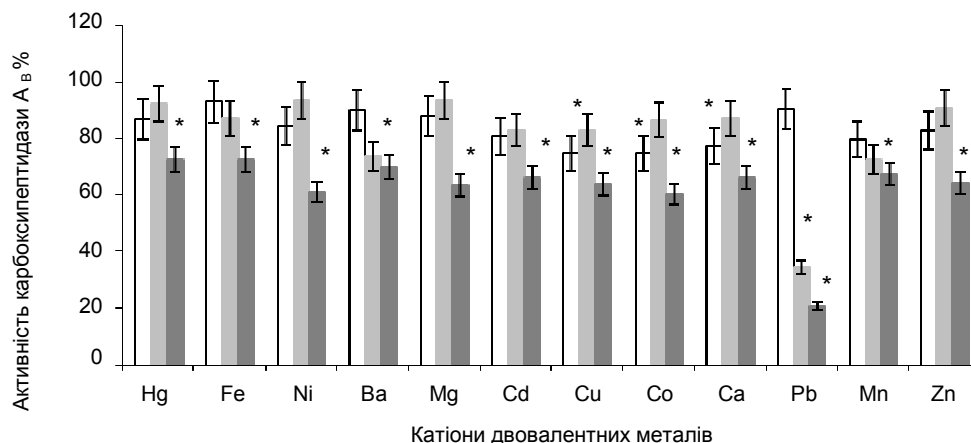


Рис. 1. Вплив катіонів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А немалігнізованого та пухлинного яєчника (n = 6)

Примітка: активність ензиму представлена в % по відношенню до показників контролю (0,1 мл розчину ензиму без катіонів, який був прогрітий 60 хв при 37°C), що були прийняті за 100%; $P < 0,05$ по відношенню до контролю.

□ – немалігнізований яєчник; ■ – доброякісна пухлина яєчника; ■ – злоякісна пухлина яєчника.

Найбільш чутливою до дії як іонів важких металів так і до дії металів-активаторів і стабілізаторів був ензим злорякисної пухлини яєчника, активність якого у присутності цих модифікаторів знижувалася в середньому на 31,2 %. Активність карбоксипептидази А немалігнізованого яєчника на 21,7 % знижувалася у присутності іонів Cd^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} а інші іони, включаючи й іони важких металів Hg^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} проявляли менш виражену негативну дію.

Активність карбоксипептидази А доброякісної пухлини яєчника в досить високій мірі знижувалася лише у присутності іонів Ba^{2+} і Mn^{2+} (в середньому на 26,7 %), а негативний ефект інших іонів не перевищував 17,5 %.

Карбоксипептидаза А немалігнізованого яєчника була малочутливою до дії важкого металу Pb^{2+} (рис. 2), а чутливість збільшувалася за посилення малігнізації та збільшення концентрації іонів Pb^{2+} в інкубаційному середовищі (зниження активності на 34,7 і 79,1 %, відповідно).

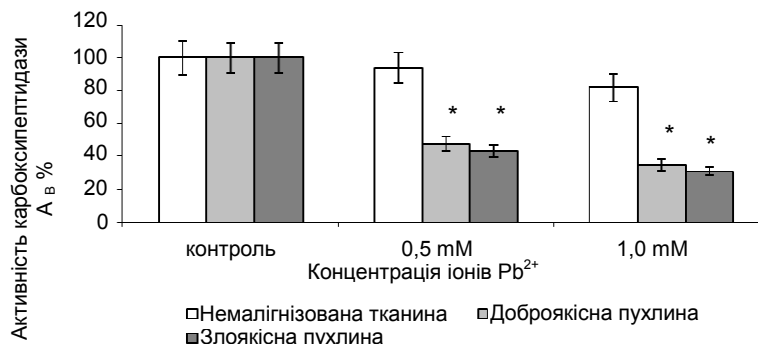


Рис. 2. Вплив катіонів Pb^{2+} на активність карбоксипептидази А немалігнізованого та пухлинного яєчника (n = 6)

Примітка: активність ензима вказана по відношенню до показників контролю (без іонів Pb^{2+}), прийнятому за 100 %; * - вірогідне ($P < 0,05$) зменшення активності ензима по відношенню до показників немалігнізованого яєчника

Низька чутливість ферменту немалігнізованого яєчника до іонів Pb^{2+} , що діють на SH – групи ензима може бути пояснена з одного боку високим вмістом SH – груп в молекулі ензима, а з іншого боку, можливо, особливістю просторової структури ензима немалігнізованого яєчника, що приводить до просторової "захищенності" цієї функціональної групи.

Понижений вміст SH-груп в молекулі ензима, пухлини яєчника, що було встановлено нами в попередніх дослідженнях, вірогідно сприяє зміні просторової конфігурації даного ензима. Такі зміни, у свою чергу, приводять до підвищення чутливості до іонів Pb^{2+} ензима патологічно зміненого яєчника, чутливість якого прямо пропорційна посиленню малігнізації.

Таким чином, з одного боку, дія катіонів проявляється у вигляді неспецифічного інгибування активності карбоксипептидази А як немалігнізованого так і пухлинного яєчника, а з іншого боку чутливість виділеного ензима до дії катіонів безпосередньо залежить від особливостей структури ферменту. Одним з можливих механізмів дії катіонів металів може бути вплив останніх на конформаційні зміни в активному центрі. Так, на прикладі серінових протеаз було показано інгибування активності протеаз катіонами важких металів за рахунок взаємодії з тристином каталітичної триади [5].

Чутливість карбоксипептидази А яєчника до дії катіонів двовалентних металів знижується в наступному ряду:

а) ензим немалігнізованого яєчника:
 Cu^{2+} і $\text{Co}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Fe}^{2+}$

б) ензим доброякісної пухлини яєчника:
 $\text{Pb}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Ni}^{2+}$ і Mg^{2+}

в) ензим злорякисної пухлини яєчника:
 $\text{Pb}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Hg}^{2+}$

Отримані нами результати частково збігаються з результатами досліджень інших авторів [10, 7, 18], які встановили посилену сорбцію іонів нікелю гепатоцитами щурів [18] і показали, що активність карбоксипептидази А кишківника щурів знижується у присутності іонів кадмію [10].

Висновок. Отримані нами результати дозволяють заключити, що катіони досліджених двовалентних металів негативно впливають на активність карбоксипептидази А немалігнізованого та пухлинного яєчника. Більш чутливою до дії як важких металів так і модифікаторів є карбоксипептидаза А злорякисної пухлини яєчника.

Список використаних джерел

1. Колодзейская М.В., Пилявская А.С. Пептидазы / Под ред. М. В. Колодзейской – Киев: Наук. Думка, 1982.
2. Лапач С.Н. Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / Под ред. С. Н. Лапач – К.: Морион, 2000.
3. Олешко Г.И., Ярыгина Т.И., Зорина Е.В. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах // Фармация. – 2011. – № 3. – Р. 14–17.
4. Пилявская А.С. Выделение и свойства карбоксипептидазы *Streptomyces Griseus*: дисс. канд. биол. наук : 03.00.04 / – К., 1977.
5. Соколовская Л.И., Сломинский А.Ю., Волков Г.Л. Индукция каталитической активности плазминогена моноклональным антителом IV-Ic в присутствии двухвалентных катионов металлов и α_2 плазминогена // Биохимия. – 2006. – Т. 71, № 6. – С. 778–785.
6. Хмельницкий О. К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний / Под ред. О. К. Хмельницкого – Санкт-Петербург: Сотис, 1994.
7. Alonso-del-Rivero M, Trejo SA, Rodríguez de la Vega M, González Y, Bronsoms S, Canals F, et al. A novel metallopeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*—a step into the invertebrate world of proteases. *FEBS J.* 2009 Sep;276(17):4875–90.
8. Austin BP1, Tözsér J, Bagossi P, Tropea JE, Waugh DS. The substrate specificity of *Metarhizium anisopliae* and *Bos taurus* carboxypeptidases A: insights into their use as tools for the removal of affinity tags. *Protein Expr Purif.* 2011 May;77(1):53–61.
9. Bradshaw RA, Walsh KA, Neurath H. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A. *Biochemistry.* 1971 Mar 16;10(6):961–72.
10. Eriyamremu GE1, Asagba SO, Onyeneke EC, Adaikpoh MA. Changes in carboxypeptidase A, dipeptidase and Na^+/K^+ ATPase activities in the intestine of rats orally exposed to different doses of cadmium. *Biometals.* 2005 Feb;18(1):1–6.
11. Goldstein SM, Kaempfer CE, Kealey JT, Wintroub BU. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization. *J Clin Invest.* 1989 May;83(5):1630–6.
12. Marinkovic DV, Marinkovic JN. Studies of human carboxypeptidase A purification and properties from human pancreas. *Biochem Med.* 1975 Sep;14(1):125–34.
13. Michel A, Nortier J, Humblet A, Paradis C, De Prez E, Deschodt-Lanckman M. Cleavage of atrial natriuretic peptide by a kidney membrane-bound carboxypeptidase A. *Peptides.* 1998;19(5):907–12.

14. Moulard M, Michon T, Kerfelec B, Chapus C. Further studies on the human pancreatic binary complexes involving procarboxypeptidase A. FEBS Lett. 1990 Feb 12;261(1):179-83.

15. McGrath ME, Haymore BL, Summers NL, Craik CS, Fletterick RJ. Structure of an engineered, metal-actuated switch in trypsin. Biochemistry. 1993 Mar 2;32(8):1914-9.

16. Nowak P, Zgirski A. Effects of metal ions on activity of plasmin. Biol Trace Elem Res. 2003 Summer;93(1-3):87-94.

17. Reznik SE, Fricker LD. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding. Cell Mol Life Sci. 2001 Nov;58(12-13):1790-804.

18. Shimada H, Funakoshi T, Inoue T, Kojima S. The effects of sulfhydryl blockers and metal ions on nickel accumulation by rat primary hepatocyte cultures. Toxicol Lett. 2000 Dec 20;118(1-2):87-92.

19. Stack S, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. The effect of divalent cations on the conformation and function of human plasminogen. Arch Biochem Biophys. 1991 Jan;284(1):58-62.

Надійшла до редколегії 21.03.14

И. Вовчук, д-р биол. наук

Одесский медицинский университет имени И.И. Мечникова, Одесса

ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ ДВОУВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ

НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А НЕМАЛИГНИЗИРОВАННОГО И ОПУХОЛЕВОГО ЯИЧНИКА

Исследовано влияние катионов двухвалентных металлов на активность карбоксипептидазы А, выделенной из немалигнизированной и опухолевых тканей яичника женщин. Установлено, что все исследованные катионы двухвалентных металлов проявляли негативное действие на активность карбоксипептидазы А как непораженного, так и опухолевого яичника, однако величина воздействия была неодинаковой. Энзим, выделенный из злокачественной опухоли яичника наиболее чувствителен к воздействию катионов двухвалентных металлов.

Ключевые слова: карбоксипептидаза А, опухоль, яичник.

I. Vovchuk, DSc.

Odessa I.I.Mechnikov national university, Odessa

INFLUENCE OF CATIONS OF BIVALENT METALS

ON ACTIVITY OF CARBOXYPEPTIDASE A NON MALIGNANT AND TUMOR OVARIUM

Influence of cations of bivalent metals on activity of carboxypeptidase A purified from non malignant and tumour tissues of ovarium of women was investigated. Investigational cations of bivalent metals inhibited activity of carboxypeptidase A as the non malignant, so tumour ovarium, however much a size of influence was different. Enzyme which purified from the tumour of ovarium most sensible to influence of cations of bivalent metals.

Keywords: carboxypeptidase A, tumor, ovarium.

УДК: 616.33-008.821.14+577.151.042

С. Пилипенко, докторант, О. Короткий, канд. біол. наук,

Т. Берегова, проф., Л. Остапченко, проф.

КНУ імені Тараса Шевченка, Київ

ВПЛИВ МУЛЬТИПРОБІОТИКА "АПІБАКТ®" НА ВМІСТ ТБК-АКТИВНИХ ПРОДУКТІВ І ФУНКЦІОНУВАННЯ ГЛУТАТІОНОВОЇ ЛАНКИ АНТИОКСИДАНТНОГО ЗАХИСТУ В СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ З ТРИВАЛОЮ ШЛУНКОВОЮ ГІПОАЦИДНІСТЮ

Тривале зниження шлункової секреції гідрохлоридної кислоти викликало збільшення вмісту ТБК-активних продуктів, активності глутатіонпероксидази і глутатіонтрансферази, зменшення рівня відновленого глутатіону і активності глутатіонредуктази в сироватці крові щурів. Введення мультипробіотику "Апібакт®" щурам з тривалою шлунковою гіпоацидністю знижувало активність процесів перекисного окислення ліпідів і справляло модулюючий вплив на функціонування глутатіонзалежної системи антиоксидантного захисту в сироватці крові.

Ключові слова: шлункова гіпоацидність, мультипробіотик "Апібакт®", перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система.

Вступ. До основних факторів ризику розвитку раку в шлунку належать гіпергастринемія [12, 17] та дисбактеріоз [18, 21], які розвиваються внаслідок тривалого зниження секреції гідрохлоридної кислоти в шлунку, яке реєструється у хворих на атрофічний гастрит. В останні роки з'явилися дані про негативні наслідки тривалого застосування антисекреторних препаратів, які проявляються у виді дисбактеріозу та гастриту [22]. В зв'язку з відсутністю методів профілактики негативних наслідків гіпергастринемії та встановленої здатності пробіотиків частково усувати та зменшувати негативні наслідки тривалої гіпоацидності шлункового соку [10], дослідження ряду авторів спрямовані на вивчення впливу пробіотиків на механізми канцерогенезу в шлунку. Пробіотичні мікроорганізми не лише нормалізують мікрофлору травного тракту, але й здатні впливати на імунні реакції, продукувати вітаміни, гормони, антимікробні субстанції та коротколанцюгові жирні кислоти, виявляють антиканцерогенні й антимутагенні властивості, тощо [20, 29]. Серед широкого арсеналу пробіотичних продуктів нашу увагу привернув "Апібакт®" (АП), який належить до мультипробіотиків групи "Симбітер®". На відміну від інших пробіотиків,

мультипробіотики групи "Симбітер®" містять біомасу живих клітин багатокомпонентного симбіозу пробіотичних мікроорганізмів (біфідобактерії, лактобацил, лактококів, пропіонових бактерій, оцтових бактерій та їх біологічно активних метаболітів (вітаміни, ферменти, полісахариди та ін.). Ефективність бактерій мультипробіотику АП збільшується при введенні екстракту прополісу з масовою часткою 2,5%.

На сьогодні накопичена достатня кількість даних про прополіс як природний антисептик з антибактеріальним, антивірусним і антигрибковим ефектом та імуностимулюючими та антиоксидантними властивостями [14, 26, 27].

Відомі дані про роль антиоксидантів на ранніх етапах онтогенезу, значення імунітету в захисті організму від розвитку запальних процесів, в тому числі і раку, та вище зазначені властивості пробіотиків і прополісу обумовили мету даної роботи.

Мета дослідження. Визначити вміст ТБК-активних продуктів, відновленого глутатіону та активність глутатіонзалежних ферментів у сироватці крові щурів з три-