

УДК 577.152.34:612.62:616

## ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ ДВУХВАЛЕНТНЫХ МЕТАЛЛОВ НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А НЕМАЛИГНИЗИРОВАННОГО И ОПУХОЛЕВОГО ЭНДОМЕТРИЯ

*Вовчук И.Л.*

*Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова, Одесса, Украина  
E-mail: irvov@mail.ru*

Исследовано влияние катионов двухвалентных металлов на активность карбоксипептидазы А, выделенной из немалигнизированной и опухолевых тканей эндометрия женщин. Установлено, что исследованные катионы двухвалентных металлов проявляли ингибирующее действие на активность карбоксипептидазы А как непораженного, так и опухолевого эндометрия, однако величина ингибирующего воздействия была неодинаковой. Фермент, выделенный из доброкачественной опухоли эндометрия наиболее чувствителен к воздействию катионов двухвалентных металлов.

**Ключевые слова:** карбоксипептидаза А, опухоль, эндометрий.

### ВВЕДЕНИЕ

Лизосомальная карбоксипептидаза А (КФ 3.4.2.1), которая гидролизует аминокислоты с С-конца (за исключением аргинина, лизина и пролина) выделена в высокоочищенном состоянии из некоторых тканей человека: поджелудочной железы [1, 2], легких [3], кожи [3] и почек [4].

Согласно исследованиям некоторых авторов катионы тяжелых металлов, такие как  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  оказывают ингибирующее действие на активацию и каталитическую активность протеаз, в то время как влияние  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  - малоэффективно [5–8].

По литературным данным большинство карбоксипептидаз являются либо классическими металлоферментами, либо металлозависимыми пептидазами, для проявления активности которых необходимы определенные катионы одно- или, чаще всего – двухвалентных металлов [9–11].

Для большинства известных карбоксипептидаз ионы  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  являются активаторами, а ионы  $\text{Ca}^{2+}$ , в большинстве случаев – стабилизатором активности фермента [9–12]. Однако, данные о структуре и физико-химических свойствах выделенных ферментов в большинстве случаев неполные.

В связи с этим цель наших исследований состояла в изучении влияния солей двухвалентных металлов на активность карбоксипептидазы А, выделенной из ткани немалигнизированного эндометрия, доброкачественной и злокачественной опухолей эндометрия женщин.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материал для исследования был предоставлен патоморфологической лабораторией Одесского областного онкологического диспансера. Патоморфологическую и гистологическую верификацию диагнозов по требованиям ВОЗ [13] проводили гистологи сертифицированной и лицензированной патоморфологической лаборатории Одесского областного онкологического диспансера. Взятие анатомических материалов для исследований, соблюдение этических и правовых норм согласно: Хельсинской декларации (1964 г.), Конвенции о защите прав и достоинств человека в связи с использованием достижений биологии и медицины (Конвенция о правах человека и биомедицине 1996 г.), закона Украины «О трансплантации органов и других анатомических материалов человеку» (1999 г.) обеспечивалось медицинским учреждением, предоставляющим материал для исследования, согласно договору о совместных исследованиях.

Для исследования влияния катионов на активность карбоксипептидазы А, выделенной из немалигнизированного и опухолевого эндометрия, 0,1 мл раствора фермента и 0,1 мл раствора катиона в концентрации  $5 \times 10^{-4}$  М инкубировали в течение 60 мин при температуре 37 °С. Об эффективности действия катионов судили по величине гидролиза 2,0 мМ карбобензоксиглутамилфенилаланина за 30 мин инкубации при 37 °С при рН 5,2 [14, 15]. Использовали водные растворы солей двухвалентных металлов: хлоридов  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и ацетатов -  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ . Ингибирование либо активирование фермента выражали в процентах по отношению к его активности в пробе без катиона двухвалентного металла.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия Стьюдента [16].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Было установлено, что при оптимальном значении рН 5,2 активность карбоксипептидазы А немалигнизированного эндометрия и доброкачественной опухоли эндометрия снижалась в присутствии катионов, являющихся наиболее распространенными активаторами или стабилизаторами металлоферментов (рис. 1). Все исследованные катионы двухвалентных металлов проявляли ингибирующее действие на активность карбоксипептидазы А немалигнизированного эндометрия, фермента доброкачественной и злокачественной опухоли эндометрия.

В отличие от фермента немалигнизированного эндометрия и фермента доброкачественной опухоли эндометрия, активность фермента, выделенного из злокачественной опухоли эндометрия повышалась в 1,8 раза в присутствии ионов свинца и в 2,4 раза – в присутствии ионов цинка.

Наиболее чувствительной к воздействию как ионов тяжелых металлов так и к воздействию металлов-активаторов и стабилизаторов является карбоксипептидазы А доброкачественной опухоли эндометрия, активность которой в присутствии этих модификаторов снижалась в среднем на 51,0 % (рис. 1). Активность карбоксипептидазы А немалигнизированного эндометрия на 16,7 % снижалась в присутствии  $\text{Cd}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ , а остальные катионы, включая и катионы тяжелых

металлов проявляли более выраженное ингибирующее действие и снижали активность фермента на 44,4 – 94,4 % (рис.1).

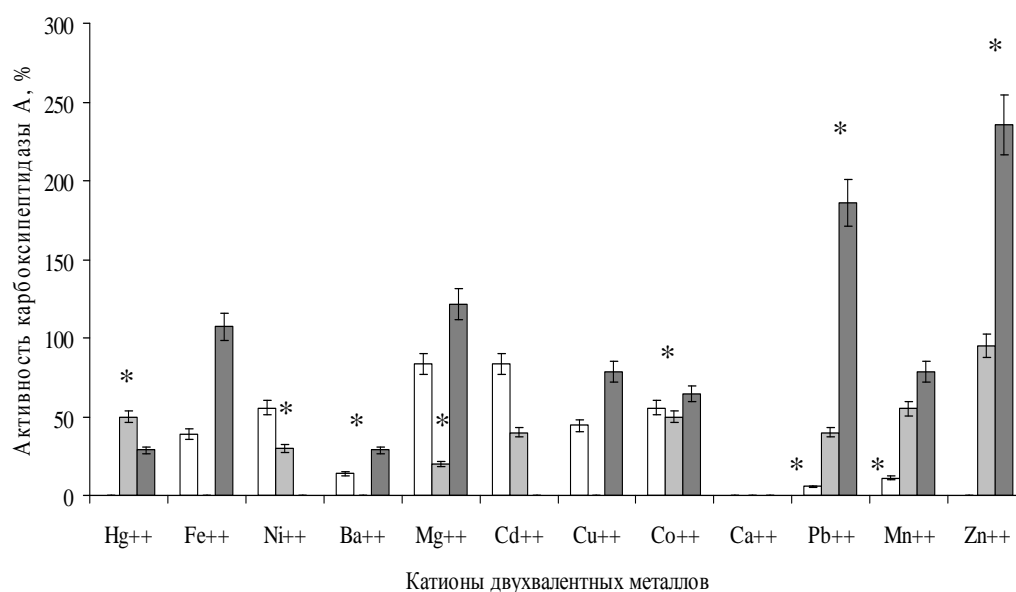


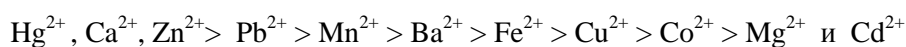
Рис. 1. Влияние катионов двухвалентных металлов на активность карбоксипептидазы А немалигнизированного и опухолевого эндометрия (n = 6)

*Примечание:* активность фермента представлена в % по отношению показателям контроля (0,1 мл раствора фермента без катионов, прогретый 60 минут при 37°C), принятым за 100%; P < 0,05 по отношению к контролю. □ – немалигнизированный эндометрий; ▒ – доброкачественная опухоль; ■ – злокачественная опухоль.

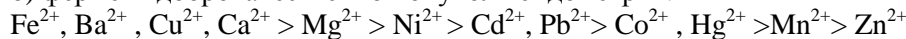
Активность карбоксипептидазы А злокачественной опухоли эндометрия значительно снижалась в присутствии Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup> и Ba<sup>2+</sup>, (в среднем на 76,7 %), а ингибирующий эффект остальных катионов не превышал 21,4 – 35,7 % (рис. 1).

В ряду катионов чувствительность карбоксипептидазы А эндометрия к действию катионов двухвалентных металлов снижается:

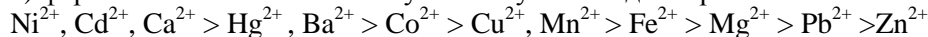
а) фермент немалигнизированного эндометрия:



б) фермент доброкачественной опухоли эндометрия:



в) фермент злокачественной опухоли эндометрия:



Полученные нами результаты частично совпадают с результатами исследований других авторов [17, 18, 19], которые установили усиленную сорбцию ионов никеля гепатоцитами крыс [18] и показали, что активность карбоксипептидазы А кишечника крыс снижается в присутствии ионов кадмия [19].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами результаты позволяют сделать заключение, что катионы исследованных двухвалентных металлов негативно влияют на активность карбоксипептидазы А немалигнизированного и опухолевого эндометрия. Фермент, выделенный из доброкачественной опухоли эндометрия наиболее чувствителен к воздействию катионов двухвалентных металлов и металлов-модификаторов. Активность карбоксипептидазы А злокачественной опухоли эндометрия увеличивается в 2,0 – 2,5 раза в присутствие ионов  $Pb^{2+}$  и  $Zn^{2+}$ .

### Список литературы

1. Marinkovic D.V. Studies of human carboxypeptidase A purification and properties from human pancreas / D. V. Marinkovic, J. N. Marinkovic // *Biochem. Med.* – 1975. – Vol. 14, No 1. – P. 125 – 134.
2. Moulard M. Further studies on the human pancreatic binary complexes involving procarboxypeptidase A / M. Moulard, T. Michon, B. Kerfelec [et al.] // *FEBS Lett.* – 1990. – V. 261, No 1. – P. 179-183.
3. Goldstein S. M. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization / S. M. Goldstein, C. E. Kaempfer, J. T. Kealey [et al.] // *J. Clin. Invest.* - 1989. - V. 83, No 5. - P. 1630-1636.
4. Michel A. Cleavage of atrial natriuretic peptide by a kidney membrane-bound carboxypeptidase A / A.Michel, J. Nortier, A. Humblet [et al.] // *Peptides.* – 1998. – Vol. 19. –No 5. – P. 907–912.
5. Stack S. The effect of divalent cations on the conformation and function of human plasminogen / S.Stack, M. Gonzalez-Gronow, S.V. Pizzo // *Archives of Biochemistry and Biophysics.* – 1991. – Vol. 284, No 1. – P. 58–62.
6. McGrath M. E. Structure of an engineered, metal-actuated switch in trypsin / M.E. McGrath, B.L.Haymore, N.L. Summers [et al.] // *Biochemistry.* – 1993. – Vol. 32, No 8. – P. 1914–1919.
7. Nowak P. Effects of metal ions on activity of plasmin / P. Nowak, A. Zgirski // *Biological Trace Element Research.* – 2003. – Vol. 93, No 1–3. – P. 87–94.
8. Соколовская Л. И. Индукция каталитической активности плазминогена моноклональным антителом IV-1с в присутствии двухвалентных катионов металлов и  $\alpha 2$  плазминогена / Л.И.Соколовская, А. Ю. Сломинский, Г. Л. Волков // *Биохимия.* – 2006. – Т. 71, № 6. – С. 778–785.
9. Пилявская А. С. Выделение и свойства карбоксипептидазы *Streptomyces Griseus*: дисс. канд. биол. наук : 03.00.04 / Пилявская Анна Соломоновна. – К., 1977. – 133 с.
10. Austin B. P. The substrate specificity of *Metarhizium anisopliae* and *Bos taurus* carboxypeptidases A: insights into their use as tools for the removal of affinity tags / B. P. Austin, J. Tözsér, P. Bagossi [et al.] // *Protein Expression and Purification.* – 2011. – Vol. 77, No 1. – P. 53–61.
11. Reznik S. E. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding / S. E. Reznik, L. D. Friker // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2001. – Vol. 58, No 12–13. – P.1790–1804.
12. Колодзейская М. В. Пептидазы / М. В. Колодзейская, А. С. Пилявская. – Киев: Наук. Думка, 1982. – 176 с.
13. Хмельницкий О. К. Патоморфологическая диагностика гинекологических заболеваний / О.К. Хмельницкий – Санкт-Петербург: Сотис, 1994. – С. 155–300.
14. Bradshaw R.A. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A / R.A. Bradshaw, K.A. Walsh, H. Neurath // *Biochemistry.* – 1971. – Vol. 10, No 6. – P. 951–961.

15. Олешко Г. И. Разработка унифицированной методики количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Г.И. Олешко, Т. И. Ярыгина, Е. В. Зорина [и др.] // Фармация. – 2011. – № 3. – Р. 14–17.
16. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич - К.: Морион, 2000. — 320 с.
17. Alonso-del-Rivero M. A novel metallo-carboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*—a step into the invertebrate world of proteases / M. Alonso-del-Rivero, S.A. Trejo, M. Rodríguez de la Vega [et al.] // FEBS J. – 2009. – Vol. 276, № 17. – P. 4875 – 4890.
18. Shimada H. The effects of sulfhydryl blockers and metal ions on nickel accumulation by rat primary hepatocyte cultures / H. Shimada, T. Funakoshi, T. Inoue [et al.] // Toxicology Letters. – 2000. – Vol. 118, № 1 – 2. – P. 87 – 92.
19. Eriyamremu G. E. Changes in carboxypeptidase A, dipeptidase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activities in the intestine of rats orally exposed to different doses of cadmium / G. E. Eriyamremu, S. O. Asagba, E.C. Onyeneke [et al.] // Biometals. - 2005. – Vol. 18, № 1. – P. 1 – 6.

**Вовчук І.Л.** Вплив катионів двовалентних металів на активність карбоксипептидази а немалігнізованого та пухлинного ендометрія / І.Л. Вовчук // Вчені записки Таврійського національного університету ім. В.І. Вернадського. Серія „Біологія, хімія”. – 2014. – Т. 27 (66), № 1. – С. 39-45.

Досліджено вплив катионів двовалентних металів на активність карбоксипептидази А, яка була отримана із немалігнізованої та пухлинних тканин ендометрія жінок. Встановлено, що досліджені катиони двовалентних металів проявляли інгібуючу дію на активність карбоксипептидази А як неуразженого, так і пухлинного ендометрія, однак впотужність інгібуючого впливу була неоднаковою. Фермент, який був виділений із доброякісної пухлини ендометрія найбільш чутливий до впливу катионів двовалентних металів.

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

## INFLUENCE OF CATIONS OF BIVALENT METALS ON ACTIVITY OF CARBOXYPEPTIDASE A NON MALIGNANT AND TUMOR ENDOMETRIUM

*Vovchuk I.L.*

*Odessa National University of I.I. Mechnikov, Odessa, Ukraine*

*E-mail: irvov@mail.ru*

For the majority of known carboxypeptidases ions Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> are activators, and ions Ca<sup>2+</sup>, in most cases – the stabilizer of activity of enzyme. However, data on structure and physical and chemical properties of the purified enzymes in most cases the inexact.

The purpose of researches - studying of influence of salts of divalent metals on activity of a carboxypeptidase A, purified from nonmalignant tissues, benign and malignant tumors of endometrium of women. Effectiveness of effect of cations determined by hydrolysis 2,0 mm carbobenzoxyglutamylphenylalanine at 30 min an incubation at 37 °C at pH 5,2. The inhibition or activation of enzyme expressed as a percentage in relation to its activity in test without cation of divalent metal. Statistical processing of results carried out by means of a student criterion.

Influence of cations of divalent metals on activity of carboxypeptidase A purified from non malignant and tumour tissues of endometrium of women was investigated. Investigational cations of divalent metals inhibited activity of carboxypeptidase A as the

non malignant, so tumour endometrium, however much a size of influence was different. Unlike of enzyme from nonmalignant endometrium and enzyme of a benign tumor of endometrium, activity of the enzyme purified from a malignant tumor of endometrium increased by 1,8 times in the presence of ions of  $Pb^{2+}$  and by 2,4 times – in the presence of  $Zn^{2+}$  ions.

The most sensitive to influence as ions of heavy metals and to influence of metals activators and stabilizers is carboxypeptidase A of benign tumor of endometrium which activity in the presence of these modifiers decreased on the average by 51,0%. Activity of a carboxypeptidase A of nonmalignant endometrium decreased by 16,7% in the presence of  $Cd^{2+}$  and  $Mg^{2+}$  and other cations, including cations of heavy metals showed more expressed inhibiting action and reduced activity of enzyme by 44,4 – 94,4%. Activity of a carboxypeptidase A of malignant tumor of endometrium considerably decreased in the presence of  $Ni^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  and  $Ba^{2+}$  (on the average for 76,7%) and the inhibiting effect of other cations did not exceed 21,4 – 35,7%.

Enzyme which purified from the tumour of endometrium most sensible to influence of cations of bivalent metals. Activity of a carboxypeptidase A of malignant tumor of endometrium increases by 2,0 – 2,5 times in presence of ions of  $Pb^{2+}$  and  $Zn^{2+}$ .

**Keywords:** carboxypeptidase A, tumor, endometrium

#### References

1. Marinkovic D.V. Marinkovic J.N. Studies of human carboxypeptidase A purification and properties from human pancreas, *Biochem. Med.*, **14**, 125 (1975).
2. Moulard M., Michon T., Kerfelec B., Chapus C. Further studies on the human pancreatic binary complexes involving procarboxypeptidase Aю, *FEBS Lett.*, **261**, 179 (1990).
3. Goldstein S.M. Kaempfer C.E., Kealey J.T., Wintroub B.U. Human mast cell carboxypeptidase. Purification and characterization, *J. Clin. Invest.*, **83**, 1630 (1989).
4. 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.*, **19**, 907 (1998).
5. Stack S., Gonzalez-Gronow M., Pizzo S.V. The effect of divalent cations on the conformation and function of human plasminogen, *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, **284**, 58 (1991).
6. McGrath M.E., Haymore B.L., Summers N.L., Craik C.S., Fletterick R.J. Structure of an engineered, metal-actuated switch in trypsin, *Biochemistry.*, **32**, 1914 (1993).
7. Nowak P., Zgirski A. Effects of metal ions on activity of plasmin, *Biological Trace Element Research.*, **93**, 87 (2003).
8. Sokolovskaya L.I., Slominskiy A.Yu., Volkov G.L. Induction of the catalytic activity of plasminogen by monoclonal antibody IV-Ic in presence of bivalent metal cations and  $\alpha_2$  antiplasmin, *Biochemistry.*, **71**, 778 (2006).
9. Pilyavskaya A. S. Purification and characterization carboxypeptidase A from Streptomyces Griseus: Diss. for the cand. of boil., 133 (1977)
10. Austin B.P., Tözsér J., Bagossi P., Tropea J.E., Waugh D.S. The substrate specificity of Metarhizium anisopliae and Bos taurus carboxypeptidases A: insights into their use as tools for the removal of affinity, *Protein Expression and Purification.*, **77**, 53 (2011).
11. Reznik S.E., Friker L.D. Carboxypeptidases from A to Z: implications in embryonic development and Wnt binding, *Cellular and Molecular Life Sciences.*, **58**, 1790 (2001).
12. Kolodzeiskaya M.V., Pilyavskaya A.S. Peptidase, Kiev: Science., 1982, 176 p.
13. Khmelnytsky O.K. Patomorfological diagnostics of gynaecological disease, St. Petersburg: Sotic, 1994, 300 p.
14. Bradshaw R.A., Walsh K.A., Neurath H. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A, *Biochemistry.*, **10**, 951 (1971).

15. Zorina E.V., Reshetnikova M.D., Oleshko G.I. Yarygina T.I. Development of a unified procedure to measure the sum of free amino acids in raw medicinal plant materials and extraction preparation, *Pharmatsiya.*, **3**, 14 (2011).
16. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. Statistics methods in mediko-biologics researches with the use of Excel, K.: Morion, 2000, 320 p.
17. Alonso-del-Rivero M., Trejo S.A., Rodríguez de la Vega M., González Y., Bronsoms S., Canals F., Delfín J., Diaz J., Aviles F.X., Chávez MA. A novel metalcarboxypeptidase-like enzyme from the marine annelid *Sabellastarte magnifica*--a step into the invertebrate world of proteases, *FEBS J.*, **276**, 4875 (2009).
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, *Toxicology Letters.*, **118**, 87 (2000).
19. Eriyamremu G.E., Asagba S.O., Onyeneke E.C., Adaikpoh M.A. Changes in carboxypeptidase A, dipeptidase and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activities in the intestine of rats orally exposed to different doses of cadmium, *Biometals.*, **18**, 1 (2005).

*Поступила в редакцию 12.01.2014 г.*