

УДК: 577.15.152:577.15.072/08/082

ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ А ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ ЭНДОМЕТРИЯ МАТКИ ЖЕНЩИН

І.Л.Вовчук, В.А.Кучеров, С.А.Петров

Одесский национальный университет имени И.И.Мечникова (Одесса, Украина)
irvov@mail.ru

Методом электрофореза в полиакриламидном геле изучены белковый спектр и многообразие молекулярных форм карбоксипептидазы А немалигнизированной и опухолевой тканей эндометрия матки женщин. Разработан метод выделения изоферментов карбоксипептидазы А и идентификации их в гелевом блоке. Изучены электрофоретические характеристики идентифицированных изоферментов. Показано, что при малигнизации наблюдается упрощение изоферментного спектра карбоксипептидазы А за счет отсутствия в ткани гиперплазированного и малигнизированного эндометрия малоподвижной формы фермента с Rf 0,026 и появления в трансформированных тканях опухолеассоциированных изоферментов с Rf 0,065–0,067, что является свидетельством изозимного переключения в ходе онкопроцесса.

Ключевые слова: *карбоксипептидаза А, изоферменты, малигнизация.*

Введение

В начале 80-х годов было сформулировано новое направление в биохимии, биохимической и молекулярной генетике – системный подход к изучению продуктов генной экспрессии (Anderson, Anderson, 1978; Cellis et al., 1990; Klose, 1989). Подробное изучение белковых спектров нормальных и патологических образцов позволяет обнаруживать биохимические маркеры определенных патологических состояний (Giometti et al., 1995; Marshall, Williams, 1991). Современный этап развития системных исследований белков человека характеризуется не только постепенным расширением фронта работ, но и переходом их в новое качество. Так, с помощью метода препаративного электрофореза из опухолевой и нормальной тканей желудка человека были получены индивидуальные изоферменты гексокиназы и изучены их биохимические свойства (Шварцман, 1975). Однако в современной литературе отсутствует информация об аналогичных исследованиях в немалигнизированных и трансформированных тканях репродуктивных органов женщин.

В связи с этим, цель работы состояла в изучении электрофоретических характеристик белков из немалигнизированной и опухолевых тканей эндометрия и в идентификации множественных молекулярных форм карбоксипептидазы А непосредственно в гелевом блоке.

Материалы и методы

Биологическим источником исследуемых белков служили образцы немалигнизированного, гиперпластического эндометрия и ткань злокачественной (умереннодифференцированная аденокарцинома эндометрия) опухоли, которые были получены операционным путем у женщин позднего репродуктивного возраста, не проходивших дооперационного медикаментозного лечения. Патоморфологические диагнозы были верифицированы по международной классификации ВОЗ (Всемирная Организация Здравоохранения, 1981) с учетом гистологических и морфологических критериев.

Образцы тканей гомогенизировали в дистиллированной воде в соотношении 1:10 (масса:объем) и центрифугировали при 9000 г/мин при +4°C в течение 45 минут. Для удаления низкомолекулярных примесей применяли метод диализа против 20-кратного объема дистиллированной воды, содержащей 2 мМ Zn⁺⁺. Растворы белков, полученные после диализа, подвергали поэтапному фракционированию сульфатом аммония. Для удаления избытка (NH₄)₂SO₄, препятствующего определению белка по методу Lowry (Lowry et al., 1951), фракции, полученные при 20, 40, 60 и 80%-ном насыщении сульфатом аммония, подвергали повторному диализу в тех же условиях.

Активность карбоксипептидазы А определяли по гидролизу 2 мМ синтетического субстрата карбобензоксифенилаланина при 570 нм (Bradshaw et al., 1969). Относительную активность выражали в ммоль фенолаланина на мг исследуемой (сырой) ткани эндометрия за 1 мин инкубации при 37°C, удельную активность – в мкмоль фенолаланина на мг белка за 1 мин инкубации при 37°C.

Электрофоретический анализ проводили на пластинах 140 × 140 × 1 мм в кислой (аланин-уксусный буфер, pH 4,5) и щелочной (трис-глициновый буфер, pH 8,3) средах в однородном 10%-ном вертикальном полиакриламидном геле ("Reanal", Венгрия) при температуре 25°C в течение 4,5 часов

(Остерман, 1981). Визуалізацію білків проводили окраскою гелів в розстворі 0,25%-ного розчину Кумасси голубого R-250 ("Serva", Швеція), що містить 45,0%-ний етанол і 9,0%-ну уксусну кислоту. Електрофоретичні грами отримували скануванням вологих гелевих блоків з наступною комп'ютерною обробкою електрофоретичних грами за допомогою програми ANAIS.

Методом препаративного електрофорезу (Шварцман, 1975) на окрашених Кумасси R-250 білкових смугах ідентифікували ділянки неокрашеного гелю, що містять іммобілізовані білки, в яких далі визначали активність карбоксипептидази А. Як контроль був взят ділянку гелевого блоку після електрофорезу в ідентичних умовах, без наявності досліджуваного матеріалу в смугах.

Результати і обговорення

Аналіз електрофоретичних грами щелочного електрофорезу цитозольної фракції водорозчинних білків немалігнізованої і опухольової тканини ендометрія показав, що процес малигнізації супроводжується збільшенням кількості реєструваних білків з 8 – в зразку тканини немалігнізованого і гіперпластичного ендометрія до 14 – в зразку аденокарциноми (рис. 1, 2, 3). Білковий спектр немалігнізованого ендометрія представлений переважно електрофоретично малоподвижними білками, гіперпластичного – середньоподвижними, а малигнізованого – білками з великою електрофоретичною подвижністю (табл. 1). Слід зазначити, що для всіх досліджуваних зразків ендометрія характерно наявність «мажорних», не специфічних білків з R_f 0,160 і R_f 0,300–0,320. Діаліз призводив до втрати швидкоподвижного білка немалігнізованого ендометрія, появи додаткових швидкоподвижних білків гіперпластичного ендометрія і збільшенню електрофоретичної подвижності білків малигнізованого ендометрія. Отримані результати свідчать про підвищену аутокаталітичну деградацію білків в трансформованій тканині ендометрія, що частково узгоджується з результатами досліджень щодо ферментів інших класів (Тривен, 1983; Шварцман, 1975).

Нами встановлено, що в процесі поетапного фракціонування білків сульфатом амонію змінюється як спектр білків, так і розподіл активності карбоксипептидази А. Так, при 20%-ному насиченні сульфатом амонію з усіх тканинних зразків був фракціонований білок з електрофоретичною подвижністю R_f 0,290–0,300 (табл. 1). В той же час з зразка гіперпластичного ендометрія крім «мажорного» білка були фракціоновані два середньоподвижних білка з R_f 0,140 і 0,210 і один малоподвижний білок з R_f 0,010 (табл. 1). Найбільше число білків в усіх досліджуваних зразках було зареєстровано при 40%-ному насиченні сульфатом амонію (табл. 1). В усіх досліджуваних зразках тканин були виявлені «мажорні» білки: середньоподвижні з R_f 0,160 і швидкоподвижні з R_f 0,290–0,310. Характерною особливістю немалігнізованої тканини було наявність малоподвижних білків (R_f 0,013, 0,031, 0,049), а для тканини гіперпластичного ендометрія – появи швидкоподвижних білків з R_f 0,410–0,440, які можуть бути продуктами часткового руйнування білків. Наступне насичення білкового розчину сульфатом амонію до 60% призводить до осадження всіх середнь- і швидкоподвижних білків. При 80%-ному насиченні з усіх досліджуваних тканинних зразків був фракціонований один білок з електрофоретичною подвижністю R_f 0,290–0,310 (табл. 1).

Для виділення ізоензимів карбоксипептидази А з опухольової і немалігнізованої тканини ендометрія був застосований метод препаративного електрофорезу в ПААГ, який дозволяв фракціонувати до 40 мкг білка в одному експерименті. Нами встановлено, що процес опухольоутворення в ендометрії супроводжується спрощенням ізоферментного складу, як зазначалося раніше наприклад для гексокінази (Шварцман, 1975). Аналізуючи ізоензимні спектри карбоксипептидази, можна передбачити, що існує, принаймні, п'ять різних ізоферментів карбоксипептидази А, комбінації яких специфічні для немалігнізованих і опухольових тканин ендометрія. Отримані результати частково збігаються з результатами інших дослідників (Шварцман, 1975), що свідчать про неспецифічну реакцію на опухольоутворення.

Так, вихідна фракція водорозчинних білків немалігнізованого ендометрія характеризувалася наявністю чотирьох множинних форм карбоксипептидази А, дві з яких, за даними електрофоретичної подвижності, належать до «мажорних» середнь- і швидкоподвижних білків з R_f 0,160 і 0,300–0,320, а дві інші форми представлені малоподвижними формами (табл. 2). В той же час водорозчинні білки зразків гіперпластичного ендометрія і злоякісної опухолі містили по три форми ферменту, ідентичних за електрофоретичною подвижністю (табл. 3, 4).

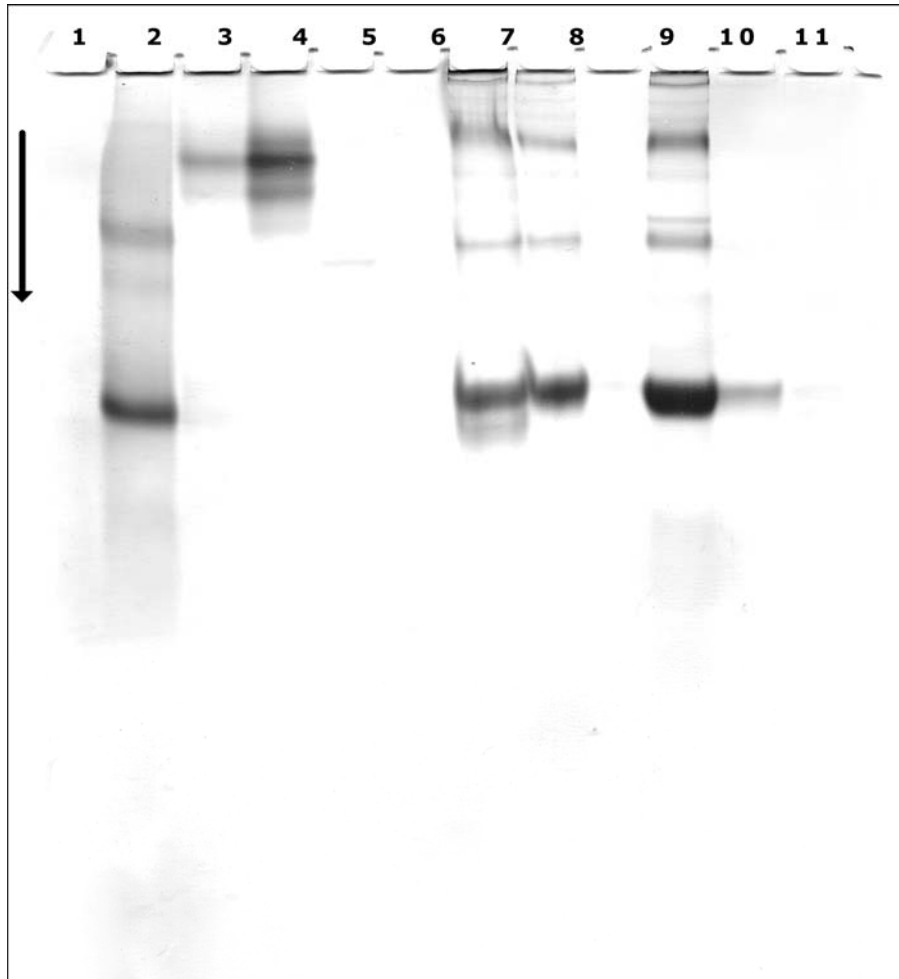


Рис. 1. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония, из немалигнизированной ткани эндометрия:

- 1 – сывороточный альбумин человека, Mr 66 500 Да (нанесено 50 мкг белка);
- 2 – трипсин поджелудочной железы крупного рогатого скота, Mr 23 800 Да (нанесено 100 мкг белка);
- 3 – химотрипсиноген поджелудочной железы крупного рогатого скота, Mr 23 240 Да (нанесено 100 мкг белка);
- 4 – протеиназа К, Mr 28 930 Да (нанесено 200 мкг белка);
- 5 – контрольный гель (без белка);
- 6 – водорастворимые белки (до диализа, нанесено 28,8 мкг белка);
- 7 – водорастворимые белки (после диализа, нанесено 23,1 мкг белка);
- 8 – фракция белков, осаждаемых при 20%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 0,9 мкг белка);
- 9 – фракция белков, осаждаемых при 40%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 20,4 мкг белка);
- 10 – фракция белков, осаждаемых при 60%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 8,7 мкг белка);
- 11 – фракция белков, осаждаемых при 80%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 0,6 мкг белка).

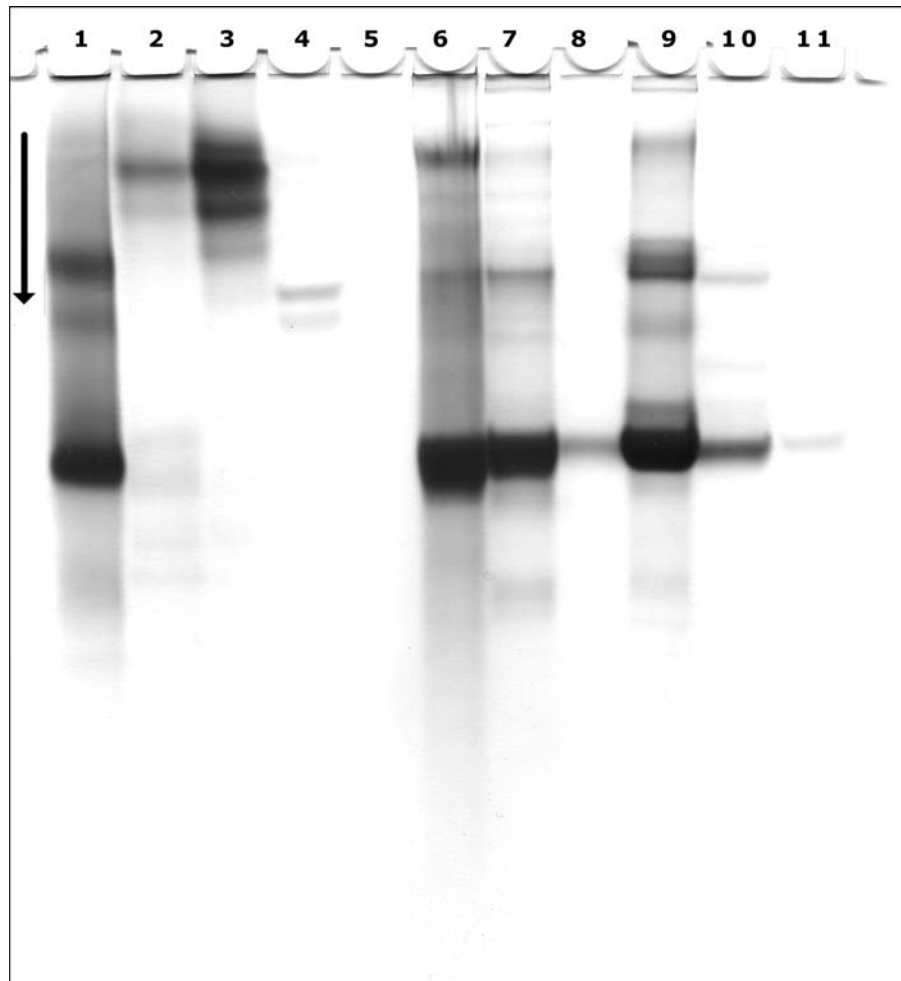


Рис. 2. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония, из ткани гиперплазированного эндометрия:

1 – 5 – см. подпись под рис. 1.

6 – водорастворимые белки (до диализа, нанесено 32,1 мкг белка);

7 – водорастворимые белки (после диализа, нанесено 26,1 мкг белка);

8 – фракция белков, осаждаемых при 20%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 0,9 мкг белка);

9 – фракция белков, осаждаемых при 40%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 15,9 мкг белка);

10 – фракция белков, осаждаемых при 60%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 7,8 мкг белка);

11 – фракция белков, осаждаемых при 80%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 0,6 мкг белка).

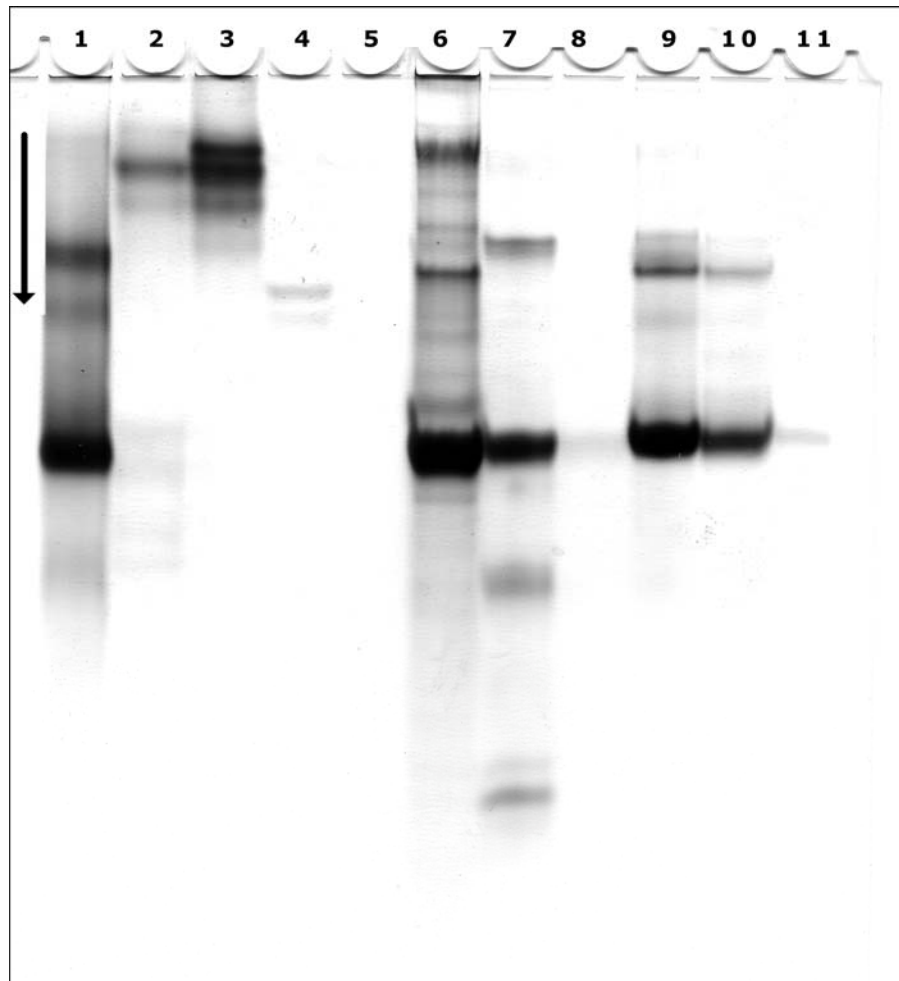


Рис. 3. Электрофореграмма растворимых белков и белков, фракционированных сульфатом аммония, из ткани злокачественной опухоли эндометрия:

1 – 5 – см. подпись под рис. 1.

6 – водорастворимые белки (до диализа, нанесено 30,6 мкг белка);

7 – водорастворимые белки (после диализа, нанесено 30,9 мкг белка);

8 – фракция белков, осаждаемых при 20%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 1,5 мкг белка);

9 – фракция белков, осаждаемых при 40%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 20,4 мкг белка);

10 – фракция белков, осаждаемых при 60%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 8,1 мкг белка);

11 – фракция белков, осаждаемых при 80%-ном насыщении $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (нанесено 0,6 мкг белка).

После диализа фракция растворимых белков образца немалигнизированной ткани была представлена тремя изоферментами (табл. 2), а в образцах гиперплазированного и малигнизированного эндометрия – двумя формами, с идентичной электрофоретической подвижностью (табл. 3, 4).

Данные литературы свидетельствуют о том, что карбоксипептидаза как индивидуальный белок может быть фракционирована из белкового раствора при 60–80%-ном насыщении его сульфатом аммония (Колодзейская, Пилявская, 1982). Однако, мы установили, что поэтапное фракционирование приводит к более четкому разделению изоферментного спектра и позволяет получить высокоочищенные индивидуальные изоформы карбоксипептидазы А с высокой удельной активностью фермента.

Таблица 1.

Электрофоретическая характеристика белкового спектра ткани эндометрия

Электрофоретическая подвижность белков (Rf)	Спектр водорастворимых белков						Фракционирование белков (NH ₄) ₂ SO ₄											
	до диализа			после диализа			20% насыщение			40% насыщение			60% насыщение			80% насыщение		
	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В	А	Б	В
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
0,009	+	+																
0,010					+			+										
0,011			+	+							+							
0,012						+												
0,013										+								
0,015												+						
0,026	+																	
0,028				+														
0,031										+								
0,038						+												
0,039					+													
0,040	+																	
0,042			+															
0,044				+														
0,049										+								
0,058	+																	
0,059											+							
0,062												+						
0,063			+															
0,064					+													
0,065										+								
0,067		+		+														
0,072						+												
0,092											+							
0,094			+															
0,095	+				+													
0,097		+																
0,098				+						+								
0,110														+				
0,120			+		+													

Продолжение таблицы 1.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
0,130		+	+			+						+			+			
0,140						+		+		+	+			+				
0,150											+				+			
0,160	+	+	+	+	+	+				+	+	+		+				
0,170													+					
0,190			+		+							+			+			
0,200						+					+			+				
0,210		+	+		+			+		+								
0,220															+			
0,230			+															
0,240						+								+				
0,250		+																
0,260			+															
0,270											+			+				
0,290							+		+			+			+			+
0,300			+	+		+		+					+	+				
0,310	+				+					+	+					+	+	
0,320		+																
0,330			+								+							
0,340	+																	
0,400						+												
0,410			+								+							
0,420					+													
0,430										+								
0,440											+							
0,540						+												
0,570						+												

Примечания: 1. * – фракции, обладающие ферментативной активностью к субстрату карбоксипептидазы А – карбобензоксифенилаланину.
2. А – немалигнизированная ткань, Б – ткань доброкачественной опухоли, В – ткань злокачественной опухоли.

Таблица 2.

Выделение изоферментов карбоксипептидазы А из немалигнизированной ткани эндометрия методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, $n=3$

Фракция	Исходная фракция белка и изозимы	Содержание белка во фракции, мг	Относительная активность, ммоль фенол / мг ткани	Удельная активность, мкмоль фенол / мг белка	Коэффициент очистки
Растворимые белки до диализа	Исходная фракция белка	0,0288±0,0030	0,0019±0,0002	0,066±0,007	1,00
	Изохим Rf 0,026	0,0016±0,0002	0,0009±0,0001	0,563±0,061	8,53
	Изохим Rf 0,058	0,0052±0,0006	0,0007±0,0001	0,135±0,015	2,05
	Изохим Rf 0,160	0,0042±0,0006	0,0015±0,0002	0,357±0,039	5,41
	Изохим Rf 0,310	0,0104±0,0012	0,0013±0,0001	0,125±0,014	1,89
Растворимые белки после диализа	Исходная фракция белка	0,0231±0,0025	0,0018±0,0002	0,078±0,009	1,00
	Изохим Rf 0,067	0,0032±0,0004	0,0009±0,0001	0,281±0,031	3,60
	Изохим Rf 0,160	0,0031±0,0003	0,0006±0,0001	0,194±0,021	2,49
	Изохим Rf 0,300	0,0104±0,0012	0,0008±0,0001	0,077±0,008	0,99
20% насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0009±0,0001	0,0001±0,0001	0,111±0,009	1,00
	Изохим Rf 0,290	0,0009±0,0001	0,0014±0,0002	1,555±0,163	14,01
40% насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0204±0,0022	0,0008±0,0001	0,039±0,005	1,00
	Изохим Rf 0,013	0,0012±0,0001	0,0012±0,0002	1,000±0,107	25,64
	Изохим Rf 0,065	0,0019±0,0002	0,0009±0,0001	0,474±0,049	12,15
	Изохим Rf 0,160	0,0020±0,0003	0,0013±0,0002	0,650±0,063	16,67
	Изохим Rf 0,310	0,0080±0,0007	0,0010±0,0001	0,125±0,014	3,21
60% насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0087±0,0009	0,0010±0,0001	0,115±0,013	1,00
	Изохим Rf 0,170	0,0031±0,0004	0,0012±0,0001	0,387±0,041	3,37
	Изохим Rf 0,300	0,0052±0,0006	0,0015±0,0002	0,289±0,030	2,51
80% насыщение $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Исходная фракция белка	0,0006±0,0001	0,0007±0,0001	1,167±0,123	1,00
	Изохим Rf 0,320	0,0006±0,0001	0,0015±0,0002	2,500±0,257	2,14

Таблиця 3.

Выделение изоферментов карбоксипептидазы А из ткани гиперплазированного эндометрия методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, n=3

Фракция	Исходная фракция белка и изозимы	Содержание белка во фракции, мг	Относительная активность, ммоль фен / мг ткани	Удельная активность, ммоль фен / мг белка	Коэффициент очистки
Растворимые белки до диализа	Исходная фракция белка	0,0321±0,0034	0,0042±0,0004	0,131±0,014	1,00
	Изоzim Rf 0,067	0,0041±0,0005	0,0004±0,0001	0,098±0,010	0,75
	Изоzim Rf 0,160	0,0032±0,0003	0,0014±0,0002	0,438±0,046	3,34
	Изоzim Rf 0,320	0,0142±0,0016	0,0019±0,0002	0,134±0,015	1,02
Растворимые белки после диализа	Исходная фракция белка	0,0261±0,0029	0,0040±0,0003	0,153±0,016	1,00
	Изоzim Rf 0,160	0,0033±0,0004	0,0017±0,0002	0,515±0,053	3,37
	Изоzim Rf 0,310	0,0138±0,0015	0,0024±0,0002	0,174±0,019	1,14
20% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0009±0,0001	0,0011±0,0001	1,222±0,129	1,00
	Изоzim Rf 0,300	0,0006±0,0001	0,0013±0,0001	2,167±0,228	1,77
40% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0159±0,0017	0,0011±0,0001	0,069±0,007	1,00
	Изоzim Rf 0,059	0,0015±0,0002	0,0004±0,0001	0,267±0,029	3,87
	Изоzim Rf 0,160	0,0011±0,0001	0,0003±0,0001	0,273±0,028	3,96
	Изоzim Rf 0,310	0,0058±0,0007	0,0021±0,0003	0,362±0,039	5,25
60% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0078±0,0009	0,0008±0,0001	0,103±0,012	1,00
	Изоzim Rf 0,160	0,0012±0,0001	0,0002±0,0001	0,167±0,018	1,62
	Изоzim Rf 0,300	0,0033±0,0004	0,0005±0,0001	0,152±0,017	1,48
80% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0006±0,0001	0,0018±0,0002	3,000±0,297	1,00
	Изоzim Rf 0,310	0,0006±0,0001	0,0026±0,0003	4,333±0,462	1,44

Так, фракции, полученные при 20%-ном насыщении сульфатом аммония, во всех исследованных образцах были представлены одной формой фермента с близкими значениями электрофоретической подвижности (Rf 0,290–0,300) что, скорее всего, свидетельствует об идентичности этих форм. При 40%-ном насыщении сульфатом аммония в образце малигнизированного эндометрия были идентифицированы только «мажорные» формы фермента с Rf 0,160 и 0,290 (табл. 4).

Таблица 4.

Выделение изоэнзимов карбоксипептидазы А из ткани злокачественной опухоли эндометрия методом препаративного электрофореза в полиакриламидном геле, n=3

Фракция	Исходная фракция белка и изоэзимы	Содержание белка во фракции, мг	Относительная активность, ммоль фен / мг ткани	Удельная активность, мкмоль фен / мг белка	Коэффициент очистки
Растворимые белки до диализа	Исходная фракция белка	0,0306±0,0032	0,0026±0,0003	0,085±0,009	1,00
	Изоэзим Rf 0,065	0,0042±0,0005	0,0044±0,0005	1,048±0,118	12,33
	Изоэзим Rf 0,160	0,0022±0,0003	0,0071±0,0009	3,227±0,321	37,97
	Изоэзим Rf 0,330	0,0064±0,0007	0,0027±0,0003	0,422±0,044	4,97
Растворимые белки после диализа	Исходная фракция белка	0,0309±0,0042	0,0031±0,0003	0,100±0,012	1,00
	Изоэзим Rf 0,160	0,0021±0,0002	0,0001±0,00001	0,048±0,005	0,48
	Изоэзим Rf 0,300	0,0108±0,0012	0,0019±0,0002	0,176±0,019	1,76
20% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0015±0,0002	0,0011±0,0002	0,733±0,076	1,00
	Изоэзим Rf 0,290	0,0015±0,0002	0,0017±0,0002	1,133±0,122	1,55
40% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0204±0,0023	0,0014±0,0002	0,069±0,007	1,00
	Изоэзим Rf 0,160	0,0037±0,0004	0,0024±0,0004	0,649±0,067	9,41
	Изоэзим Rf 0,290	0,0121±0,0013	0,0020±0,0003	0,165±0,018	2,39
60% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0081±0,0009	0,0011±0,0001	0,136±0,015	1,00
	Изоэзим Rf 0,150	0,0015±0,0002	0,0001±0,00001	0,066±0,008	0,49
	Изоэзим Rf 0,290	0,0055±0,0006	0,0023±0,0003	0,418±0,043	3,07
80% насыщение (NH ₄) ₂ SO ₄	Исходная фракция белка	0,0006±0,0001	0,0018±0,0002	3,000±0,297	1,00
	Изоэзим Rf 0,290	0,0006±0,0001	0,0018±0,0002	3,000±0,297	1,00

Кроме «мажорных» форм, в образце гиперплазированного эндометрия была обнаружена одна малоподвижная форма фермента с Rf 0,059 (табл. 3), а в образце малигнизированного эндометрия – две малоподвижные формы с Rf 0,065 и 0,013 (табл. 2).

Изоферментный спектр белков, полученный при 60%-ном насыщении сульфатом аммония, характеризуется во всех исследованных образцах наличием двух «мажорных» фракций: высокоподвижных форм карбоксипептидазы А с Rf 0,290–0,300 и среднеподвижных форм с Rf 0,150–0,170 (табл. 2, 3, 4).

При 80%-ном насыщении сульфатом аммония (табл. 2, 3, 4) во всех исследованных образцах была обнаружена одна форма карбоксипептидазы А, электрофоретическая подвижность которой увеличивалась с усилением процесса малигнизации (R_f 0,320>0,310>0,290).

Анализ удельной активности и коэффициента очистки позволяет отметить важную особенность изоферментов карбоксипептидазы А, выделенных методом препаративного электрофореза. Обнаружено, что удельная активность индивидуальных препаратов изоферментов, выделенных из гиперплазированного эндометрия и из опухолевой ткани, значительно выше, чем из немалигнизированного эндометрия (табл. 2, 3, 4). Установлено, что удельная активность очищенной до гомогенного состояния карбоксипептидазы А, фракционированной при 80%-ном насыщении сульфатом аммония, увеличивается по мере усиления процесса малигнизации. По всей видимости, метод электрофоретического разделения способствует иммобилизации карбоксипептидазы А в ПААГ, которая приводит к конформационным изменениям, способствующим повышению активности и стабильности фермента, что было показано и другими исследователями для других ферментов (Колодзейская, Пилявская, 1982; Тривен, 1983; Шварцман, 1975).

В отдельном эксперименте (вариант кислого электрофореза) нами было показано отсутствие щелочных форм карбоксипептидазы А во фракции водорастворимых и осаждаемых сульфатом аммония белков.

Таким образом, процесс малигнизации ткани эндометрия матки женщин сопровождается, с одной стороны, увеличением количества белков водорастворимой фракции и повышением их электрофоретической подвижности в тканях злокачественной опухоли по сравнению с немалигнизированной и гиперплазированной тканями. С другой стороны, при малигнизации наблюдается упрощение изоферментного спектра карбоксипептидазы А за счет отсутствия в ткани гиперплазированного и малигнизированного эндометрия малоподвижной формы фермента с R_f 0,026 и появления в трансформированных тканях опухолеассоциированных изоферментов с R_f 0,065–0,067.

Список литературы

- Всемирная Организация Здравоохранения // Материалы ежегодных отчетов. – Санкт-Петербург: Медицина, 1981. – 286с.
- Колодзейская М.В., Пилявская А.С. Пептидазы. – Киев: Наук. думка, 1982. – 176с.
- Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование (практическое пособие). – М.: Наука, 1981. – 288с.
- Тривен М. Иммобилизованные ферменты. – М.: Мир, 1983. – 213с.
- Шварцман А.Л. О структуре и функциях гексокиназы в раковых клетках человека. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Ленинград, 1975. – 28с.
- Anderson N.G., Anderson N.L. Analytical techniques for cell fractions. XXII. Two-dimensional analysis of serum and tissue proteins: multiple gradient-slab gel electrophoresis // *Anal. Biochem.* – 1978. – Vol.85, №2. – P. 341–354.
- Bradshaw R.S., Ericsson L.H., Walsh K.A., Neurath H. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1969. – Vol.63, №4. – P. 1389–1394.
- Cellis J., Gesser B., Rassmusen H. et al. Comprehensive two-dimensional gel protein databases offer a global approach to the analysis of human cells: the transformed amnion cells (AMA) master database and its link to genome DNA sequence data // *Electrophoresis.* – 1990. – Vol.11, №12. – P. 989–1071.
- Giometti C., Tollaksen S., Chubb C. et al. Analysis of proteins from human breast epithelial cells using two-dimensional gel electrophoresis // *Electrophoresis.* – 1995. – Vol.16, №7. – P. 1215–1224.
- Klose J. Systematic analysis of the total proteins of a mammalian organism: principles, problems and implications for sequencing the human genome // *Electrophoresis.* – 1989. – Vol.10, №2. – P. 140–152.
- Lowry O.H., Rosenbrough N.I., Fan A.Z. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol.193. – P. 265–275.
- Marshall T., Williams K. The simplified technique of high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: biomedical applications in health and disease // *Electrophoresis.* – 1991. – Vol.12, № 7–8. – P. 461–471.

**ВИДІЛЕННЯ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ ФОРМ КАРБОКСИПЕПТИДАЗИ А
ПУХЛИННОЇ ТКАНИНИ ЕНДОМЕТРІЮ МАТКИ ЖІНОК
І.Л.Вовчук, В.О.Кучеров, С.А.Петров**

Методом електрофорезу у поліакріламідному гелі вивчені білковий спектр та множинність молекулярних форм карбоксипептидази А немалігнізованої та пухлинної тканин ендометрію. Розроблено метод виділення ізоферментів карбоксипептидази А та ідентифікації їх у гелевому блоці. Досліджені електрофоретичні характеристики ідентифікованих ізоферментів. Встановлено спрощення ізоферментного спектру карбоксипептидази А за процесу малігнізації у зв'язку з відсутністю в тканинах гіперплазованого та малігнізованого ендометрію малорухомої форми ферменту з Rf 0,026 та з'явленням в трансформованих тканинах пухлиноасоційованих ізоферментів з Rf 0,065–0,067, що підтверджує наявність ізоимного переключення за онкопроцесу.

Ключові слова: *карбоксипептидаза А, ізоферменти, малігнізація.*

**OBTAINING AND IDENTIFICATION OF MOLECULAR FORMS OF CARBOXYPEPTIDASE A
FROM TUMOUR TISSUE OF WOMEN WOMB ENDOMETRIUM
I.L.Vovchuk, V.A.Kucherov, S.A.Petrov**

The protein spectrum and molecular forms of carboxypeptidase A from normal and tumour endometrium tissues were studied by the electrophoretic method. The method of carboxypeptidase A obtaining and its identification in gel blocks was created. The electrophoretic characteristics of identified isozymes were studied. It was shown that under malignisation decreasing of carboxypeptidase A spectrum realised because of absence of slow form of the enzyme with Rf 0,026 of hyperplased and malignant endometrium and appearance in transformed tissues tumour-associated isozyme with Rf 0,065–0,067, which is evidence of isozyme transmitting in the development of oncoprocess.

Key words: *carboxypeptidase A, isozymes, malignisation.*

Представлено М.Ф.Леусом
Рекомендовано до друку Є.Е.Перським