

На правах рукописи

**Столяров Антон Анатольевич**

**ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДГИДРОЛАЗ В  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЧЕЛОВЕКА**

03.01.04 – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Москва - 2017

Работа выполнена на кафедре биохимии имени академика Березова Т.Т.

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, доцент Калинина Елена Валентиновна

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор Бабиченко Игорь Иванович

**Официальные оппоненты:**

Штиль Александр Альбертович

доктор медицинских наук, заведующий лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток Федерального государственного бюджетного учреждения "Российский онкологический научный центр имени Н.Н. Блохина" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Еремина Лидия Сергеевна

кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории биомедицинских исследований Федерального государственного учреждения "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук"

**Ведущая организация:**

ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России

Защита состоится 24 мая 2017 г в 15:00 на заседании диссертационного совета Д 212.203.39 при ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «Российский университет дружбы народов» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6 и на сайте [dissovet.rudn.ru](http://dissovet.rudn.ru)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2017

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.203.39

кандидат биологических наук, доцент

Гигани Ольга Борисовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Изучение механизмов канцерогенеза позволит значительно усовершенствовать диагностику злокачественных заболеваний и снизить смертность от рака путем повышения эффективности лечения. К настоящему времени имеется достаточно большое количество экспериментальных работ, раскрывающих роль регуляторных пептидов и белков в развитии злокачественных новообразований в организме человека (Соснина А.В., 2013, Vetvicka V, 2006, Zhou K, 2016). Описано участие ростовых факторов в процессе роста и дифференцировки опухолевых клеток (Березов Т.Т., 2009, Гомазков О.А., 2007, Zheng N., 2016), участие пептидных и белковых гормонов в перестройке метаболизма (Fu P. 2004), участие цитокинов и иммуномодулирующих пептидов в регуляции функции иммунной системы при развитии опухоли (Feng Y.X., 2010). Тем не менее, остаются вопросы о механизмах роста концентраций активных форм пептидов при развитии злокачественных новообразований. В ряде работ показано увеличение экспрессии генов, кодирующих предшественники пептидных молекул (Tang H.Y., 2012), однако концентрация биоактивных форм пептидов зависит не столько от работы генома, сколько от активности ферментов их обмена и модификации (Yamamoto H., 2011). Интерес к изучению активности протеолитических ферментов в злокачественных и доброкачественных новообразованиях вызван их комплексным участием в процессах канцерогенеза путём процессинга, модификации или инактивации регуляторных пептидов и ростовых факторов, вовлеченных в этиологию и патогенез злокачественных новообразований (Kollermann J., 2001). Предполагается исключительно высокая роль пептидгидролаз в инвазии опухолевых клеток (Zhou 2013). Тем не менее, значение пептидгидролаз в механизме канцерогенеза не до конца выяснено. Большая часть исследований выполнена на лабораторных животных (Вернигора А.Н., 2002). В связи с вышесказанным, актуальным является исследование роли пептидгидролаз в развитии злокачественных новообразований человека.

**Цель исследования** – исследование роли пептидгидролаз в развитии злокачественных новообразований на основании изучения закономерностей изменения активности ферментов обмена регуляторных пептидов – кислых протеаз, катепсина D, карбоксипептидазы E (КПЕ), ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП), пептидил-дипептидазы A (ПДА) и лейцинаминопептидазы (ЛАП) в опухолях молочной железы, желудка, кишечника, почек, печени и легких человека.

### **Задачи исследования:**

1. Изучить активности пептидгидролаз в здоровых тканях и доброкачественных новообразованиях молочной железы, желудка, кишечника, почек, печени, легких человека;
2. Изучить активности пептидгидролаз в злокачественных новообразованиях молочной железы, желудка, кишечника, почек, печени, легких человека;
3. Провести корреляционный анализ полученных результатов для комплексной оценки участия пептидгидролаз в развитии злокачественных новообразований.

### **Научная новизна работы**

Впервые изучено распределение активности ФМСФ-КП в тканях человека. Показано повышение активности протеаз в доброкачественных опухолях, которое приводит к утрате тканеспецифического характера распределения активности ферментов, характерного для здоровых тканей. Впервые продемонстрирован рост активности комплекса пептидгидролаз в злокачественных новообразованиях различных органов. Установлено значительное, более чем на порядок, повышение активности ферментов процессинга пептидов – КПЕ и ФМСФ-КП в кишечнике, желудке, молочной железе и почках человека. На основании данных об изменении тканеспецифического характера распределения, высоком росте активностей и усилении корреляционных связей катепсина D, КПЕ, ФМСФ-КП сделан вывод о важности вклада протеолитических процессов, катализируемых этими ферментами, в развитие злокачественных новообразований.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Результаты работы значительно расширяют фундаментальные представления о роли пептидгидролаз в канцерогенезе. Практический интерес представляют собой данные о существенном росте активности кислых протеаз, катепсина D, КПЕ, ФМСФ-КП, ПДА, ЛАП в злокачественных новообразованиях, что даёт возможность разработки методов диагностики и лечения с использованием специфических ингибиторов ферментов. На основании полученных в рамках представленного исследования данных показана возможность применения биохимических тестов по определению активности пептидгидролаз в диагностике.

Полученные сведения об активности протеолитических ферментов в злокачественных новообразованиях молочной железы, желудка, кишечника и почек человека включены в программу спецкурсов «Химия и биохимия протеолитических ферментов», «Биохимия и молекулярная биология», «Энзимология», «Современные методы в биохимии» и специального практикума по биохимии для бакалавров и магистров по профилю подготовки «Биохимия» в Пензенском государственном университете.

### **Методология и методы диссертационного исследования**

При выполнении диссертационной работы были проанализированы опухолевые новообразования и здоровые ткани 160 человек, извлеченные в ходе хирургических операций в ГБУЗ Пензенский областной онкологический диспансер. Активность ферментов оценивали спектрофотометрическими и флуориметрическими методами с использованием специфических субстратов и ингибиторов. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 10.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Активности ферментов обмена регуляторных пептидов - кислых протеаз, катепсина D, карбоксипептидазы E, ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы, пептидил-дипептидазы A, лейцинаминопептидазы в доброкачественных опухолях молочной железы, желудка, кишечника, почек, печени и легких человека существенно повышаются по сравнению со здоровыми тканями, что сопровождается утратой тканеспецифического паттерна в распределении активности протеолитических ферментов.

2. Развитие в протоковой карциноме молочной железы, почечноклеточном раке, аденокарциноме желудка и толстой кишки сопровождается значительным ростом активности основных карбоксипептидаз – карбоксипептидазы E и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы, в то время как не только в здоровых, органах, но и в доброкачественных новообразованиях активность данных ферментов существенно ниже.
3. Высокий рост активностей и усиление корреляционных связей катепсина D, карбоксипептидазы E, ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы свидетельствуют о важной роли этих ферментов в механизме развития злокачественных новообразований.

### **Степень достоверности**

Достоверность результатов исследования подтверждается объемом фактического материала (160 обследованных пациентов), применением современных методик определения активности ферментов и использованием методов статистической обработки данных, полностью соответствующих поставленным задачам.

### **Апробация работы**

Материалы диссертации были представлены на 6 Международных и Всероссийских конференциях и съездах:

- Фундаментальные и прикладные исследования в современной науке: Международная научно-практической конференция, посвященная 70-летию Победы в Великой Отечественной войне, Пенза, 2015
- Российская наука в современном мире: Международная научно-практическая конференция, Москва, 2015
- Наука и современность – 2014: Международная научно-практическая конференция, Майкоп, 2014
- Биология – наука XXI века: 18-ая Пушкинская международная школа-конференция молодых ученых, Пушкино, 2014
- Культурное и историческое наследие в образовании и науке: IX Международная научно-методическая конференция, Пенза, 2013
- V Всероссийский с международным участием медико-биологический Конгресс молодых учёных «Симбиоз-Россия 2012», Тверь, 2012

### **Публикации результатов исследования**

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 3 в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК министерства образования и науки РФ для публикации результатов диссертационных исследований.

### **Структура и объём работы**

Диссертация представлена на 131 страницах текста, состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования и их обсуждение, заключение, список литературы, который включает в себя 14 рисунков, 17 таблиц и библиографический список, содержащий 307 источников, из них 71 отечественных и 236 зарубежных.

### Личный вклад автора

Автором лично выполнялись регистрация образцов на месте хирургического извлечения, лабораторное определение активности всех исследованных ферментов, осуществлялись статистическая обработка и анализ результатов исследования.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Активность ферментов определяли в доброкачественных и злокачественных новообразованиях, а также в прилегающих здоровых тканях молочной железы, желудка, кишечника и почек человека, удаленных в ходе хирургических операций в ГБУЗ Пензенский областной онкологический диспансер. Изучение активности ферментов было проведено у 160 человек в возрасте от 35 до 70 лет. Новообразования классифицировали в соответствии с клиническими признаками и результатами гистологического анализа. Были сформированы следующие группы образцов:

- 1) ткани кишечника без патологических изменений (n=11);
- 2) ткани желудка без патологических изменений (n=11);
- 3) ткани молочной железы без патологических изменений (n=11);
- 4) ткани почек без патологических изменений (n=11);
- 5) ткани печени без патологических изменений (n=11);
- 6) ткани легких без патологических изменений (n=11);
- 7) полипы толстой кишки (n=12);
- 8) полипы желудка (n=11);
- 9) фиброкистозная мастопатия молочной железы (n=12);
- 10) аденомы почек (n=12);
- 11) фиброма печени (n=11);
- 12) фиброма легких (n=11);
- 13) аденокарцинома толстой кишки (n=14);
- 14) аденокарцинома желудка (n=11);
- 15) протоковая карцинома молочной железы (n=15);
- 16) почечноклеточный рак почек (n=11);
- 17) аденокарцинома печени (n=13);
- 18) аденокарцинома легких (n=11).

Пробы замораживали и хранили при - 40° С для последующего анализа.

Для определения активности нелизосомальных пептидгидролаз навески ткани гомогенизировали в 50 мМ натрий ацетатном буфере, содержащем 50 мМ NaCl, pH 5,6, в соотношении 1 : 50 (вес : объем), для определения активности кислых протеаз и катепсина D – в 100 мМ натрий ацетатном буфере, pH 4,0.

Активность карбоксипептидазы E определяли флуориметрически ( $\lambda_{ex}$ =360 нм и  $\lambda_{em}$ =530 нм) по гидролизу субстрата дансил-фен-ала-арг при pH 5,6, в качестве ингибитора использовали ГЭМЯК (Fricker, 1982). Активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы определяли флуориметрически ( $\lambda_{ex}$ =360 нм и  $\lambda_{em}$ =530 нм)

(Генгин, 2002) по гидролизу дансил-фен-лей-арг при pH 5,6, в качестве ингибитора использовали ФМСФ. Активность пептидил-дипептидазы A определяли фотометрически по отщеплению Gly-Arg от карбоксибензоил-Gly-Gly-Arg при pH 8,2, с использованием каптоприла в качестве ингибитора (Hurst, 1981). Активность лейциламинопептидазы определяли флуориметрически ( $\lambda_{ex}$ =420 нм и  $\lambda_{em}$ =530 нм) по гидролизу лей-β-

нафтиламина при pH 7,4, в качестве ингибитора использовали пурамицин. Активность кислых протеаз и катепсина D определяли фотометрически по расщеплению бычьего гемоглобина при pH 4,0, в качестве ингибитора катепсина D использовали пепстатин А.

Концентрацию белка в гомогенатах определяли по Лоури (Lowry, 1951).

Активность ферментов определяли как разницу прироста флуоресценции или оптических единиц в пробах, не содержащих и содержащих ингибитор, и выражали в нмоль продукта (по соответствующей калибровочной зависимости), образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

Проверка принадлежности распределения признаков к нормальному распределению производилась по критерию хи-квадрат. Достоверность отличий между средними величинами определяли с использованием t-критерия Стьюдента и дисперсионного анализа (Лакин, 1990).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенной работы установлено, что активность всех исследованных ферментов в доброкачественных новообразованиях анализируемых тканей была выше по сравнению с нормальными тканями (рис. 1 - 6). При этом для всех ферментов отмечается утрата тканеспецифического паттерна активности, свойственного здоровым тканям. Повидимому, повышение активности всех пептидгидролаз – ферментов процессинга, модификации и деградации регуляторных белков и пептидов до одного уровня характерно для всех тканей с измененным типом роста и характеризующихся повышенным уровнем обмена пептидных молекул.

Следует отметить, что в нашей работе впервые описано тканевое распределение активности ФМСФ-КП. Установлено, что активность данного фермента во всех тканях в 2-3 раза выше активности КПЕ, которая присутствует в соматических тканях в следовых количествах. Подобное распределение сходно с таковым у других млекопитающих (Генгин М.Т. Вернигора А.Н. 1996, Вернигора А.Н. 2003), что подтверждает предположение о более широких функциях ФМСФ-КП, принимающей участие, в отличие от КПЕ, не только в процессинге регуляторных пептидов и белков, но и в обмене и деградации других белковых молекул.

Результаты исследования показали увеличение активности кислых протеаз в злокачественных новообразованиях молочной железы (инвазивная протоковая карцинома) на 35 %, желудка (аденокарцинома) на 115 %, почек (почечноклеточный рак) на 140 %, печени (аденокарцинома) и легких (аденокарцинома) на 30 % по сравнению с доброкачественными новообразованиями в этих же органах (рис. 1).

Так, значение активности кислых протеаз в злокачественных новообразованиях желудка и почек превышала активность кислых протеаз в доброкачественных новообразованиях в 3 раза, тогда как в злокачественных новообразованиях молочной железы, легких и печени - в 1,5 раза.

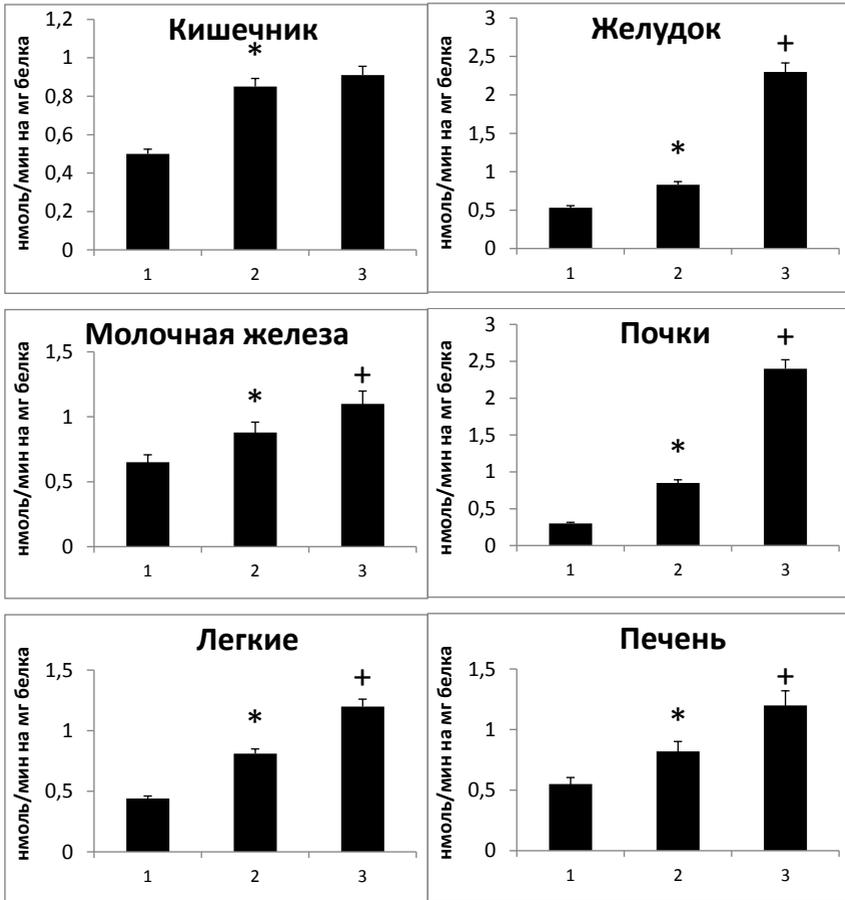
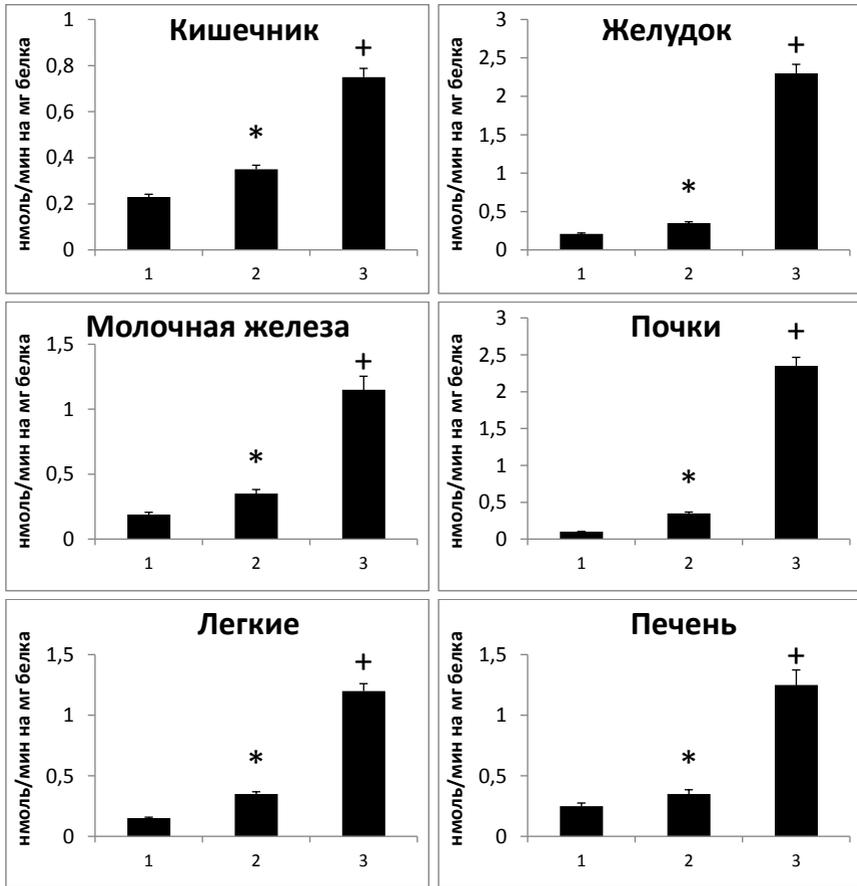


Рисунок 1. Активность кислых протеаз в здоровых тканях ( $n = 11$ ), доброкачественных и злокачественных новообразованиях кишечника ( $n = 12$  и  $14$  соответственно), желудка ( $n = 16$  и  $16$  соответственно), молочной железы ( $n = 12$  и  $15$  соответственно), почек ( $n = 12$  и  $11$  соответственно), легких ( $n = 11$  и  $11$  соответственно) и печени ( $n = 11$  и  $13$  соответственно) человека.

1 – здоровые ткани, 2 – доброкачественные новообразования, 3 – злокачественные новообразования,  $M \pm m$ ; \* –  $p < 0,001$  по сравнению со здоровыми тканями, + –  $p < 0,001$  по сравнению с доброкачественными опухолями.

Установлен рост активности катепсина D в злокачественных новообразованиях всех исследованных органов по сравнению с доброкачественными опухолями (рис. 2). При этом значение активности катепсина D в злокачественных новообразованиях желудка и почек по сравнению с активностью катепсина D в доброкачественных новообразованиях была выше в 6 раз, в злокачественных новообразованиях кишечника – в 2 раза, а в злокачественных новообразованиях легких, печени и молочной железы – в 3 раза. Активность катепсина D также

была значительно выше во всех исследуемых злокачественных новообразованиях по сравнению с контрольной группой здоровых тканей.



**Рисунок 2.** Активность катепсина D в здоровых тканях (n = 11), доброкачественных и злокачественных новообразованиях кишечника (n = 12 и 14 соответственно), желудка (n = 16 и 16 соответственно), молочной железы (n = 12 и 15 соответственно), почек (n = 12 и 11 соответственно), легких (n = 11 и 11 соответственно) и печени (n = 11 и 13 соответственно) человека.

1 – здоровые ткани, 2 – доброкачественные новообразования, 3 – злокачественные новообразования, М ± m; \* – p < 0,001 по сравнению со здоровыми тканями, + – p < 0,001 по сравнению с доброкачественными опухолями.

Во всех доброкачественных опухолях активность катепсина D составляла не более 50% от активности кислых протеаз, тогда как в раковых опухолях всех исследованных тканей активность катепсина D составляла от 82 до 100 % от общей активности кислых

протеаз, что указывает на преобладающую роль данного фермента среди ферментов со сходными физико-химическими свойствами в процессах злокачественного новообразования (таблица 1 - 3).

**Таблица 1. Соотношение активности катепсина D и общей активности кислых протеаз в здоровых тканях.**

Здоровые ткани	Активность кислых протеаз	Активность катепсина D	Ак-ть катепсина D /общ.ак-ть кислых протеаз, %
Кишечник	0,50	0,23	46
Желудок	0,53	0,21	39
Молочная железа	0,65	0,19	29
Почки	0,34	0,10	29
Легкие	0,44	0,15	34
Печень	0,55	0,25	45

**Таблица 2. Соотношение активности катепсина D и общей активности кислых протеаз в доброкачественных новообразованиях.**

Доброкачественные новообразования	Активность кислых протеаз	Активность катепсина D	Ак-ть катепсина D /общ.ак-ть кислых протеаз, %
Кишечник	0,85	0,35	41
Желудок	0,83	0,35	42
Молочная железа	0,88	0,35	39
Почки	0,85	0,35	41
Легкие	0,81	0,35	43
Печень	0,82	0,35	42

**Таблица 3. Соотношение активности катепсина D и общей активности кислых протеаз в злокачественных новообразованиях.**

Злокачественные новообразования	Активность кислых протеаз	Активность катепсина D	Ак-ть катепсина D /общ.ак-ть кислых протеаз, %
Кишечник	0,91	0,75	82
Желудок	2,30	2,30	100
Молочная железа	1,10	1,10	100
Почки	2,40	2,35	97
Легкие	1,20	1,20	100
Печень	1,20	1,20	100

Результаты исследования (рис. 3) показали значительное увеличение активности КПЕ в злокачественных новообразованиях молочной железы, кишечника, желудка и почек по сравнению с доброкачественными новообразованиями в этих же органах.

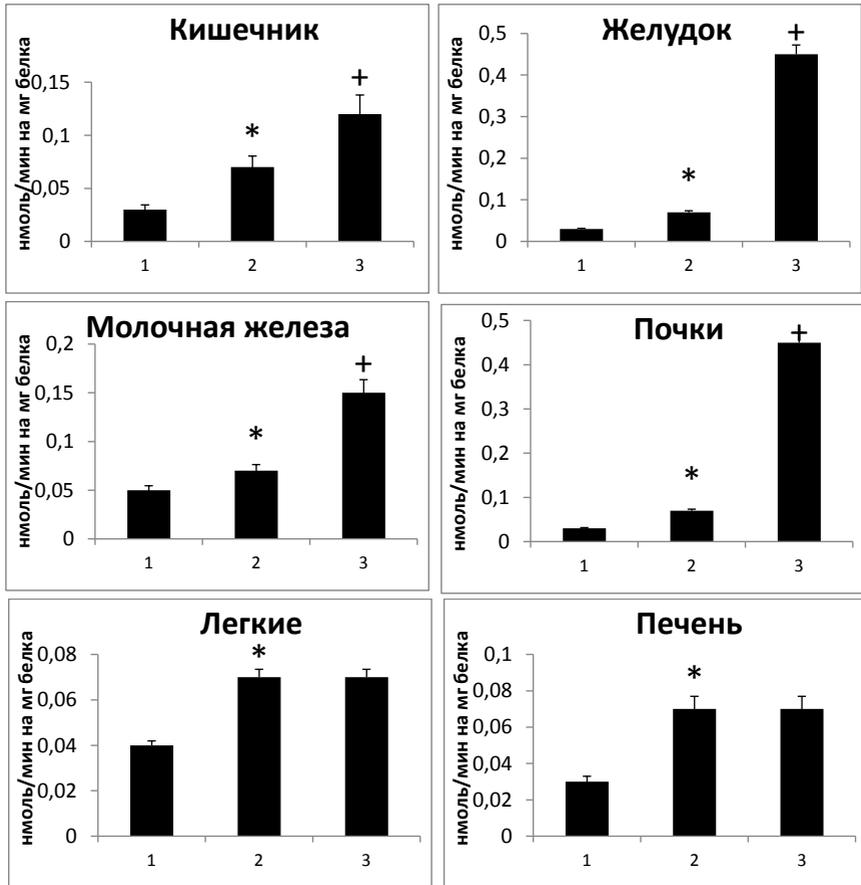


Рисунок 3. Активность КПЕ в здоровых тканях ( $n = 11$ ), доброкачественных и злокачественных новообразованиях кишечника ( $n = 12$  и  $14$  соответственно), желудка ( $n = 16$  и  $16$  соответственно), молочной железы ( $n = 12$  и  $15$  соответственно), почек ( $n = 12$  и  $11$  соответственно), легких ( $n = 11$  и  $11$  соответственно) и печени ( $n = 11$  и  $13$  соответственно) человека.

1 – здоровые ткани, 2 – доброкачественные новообразования, 3 – злокачественные новообразования,  $M \pm m$ ; \* –  $p < 0,001$  по сравнению со здоровыми тканями, + –  $p < 0,001$  по сравнению с доброкачественными опухолями.

Значение активности КПЕ в клетках низкодифференцированной аденокарциномы желудка более чем в 50 раз превышало активность КПЕ в доброкачественных новообразованиях желудка, почек – в 40 раз, желудка и кишечника – более чем в 10 раз. В злокачественных новообразованиях печени и легких активность КПЕ не отличалась от значений, наблюдаемых в доброкачественных новообразованиях.

ФМСФ-КП в опухолевой ткани человека показывает схожее с КПЕ распределение активности (рис. 4).

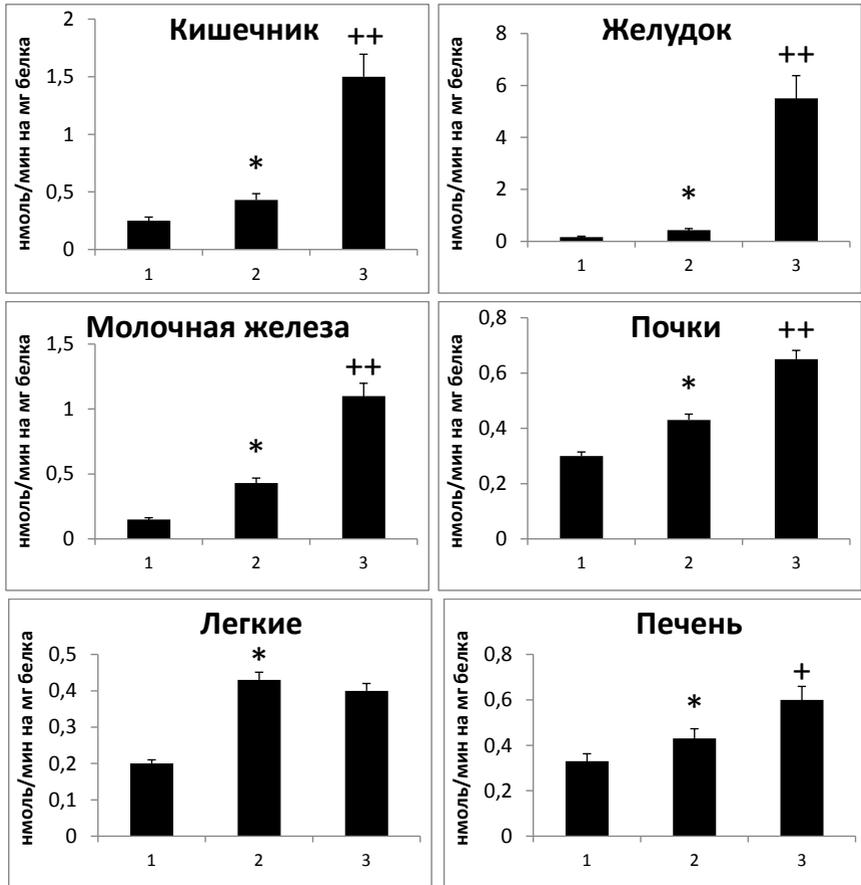


Рисунок 4. Активность ФМСФ-КП в здоровых тканях (n = 11), доброкачественных и злокачественных новообразованиях кишечника (n = 12 и 14 соответственно), желудка (n = 16 и 16 соответственно), молочной железы (n = 12 и 15 соответственно), почек (n = 12 и 11 соответственно), легких (n = 11 и 11 соответственно) и печени (n = 11 и 13 соответственно) человека.

1 – здоровые ткани, 2 – доброкачественные новообразования, 3 – злокачественные новообразования,  $M \pm m$ ; \* –  $p < 0,001$  по сравнению со здоровыми тканями, ++ –  $p < 0,01$ , + –  $p < 0,001$  по сравнению с доброкачественными опухолями.

По результатам эксперимента показано, что активность ФМСФ-КП достоверно выше в злокачественных новообразованиях молочных желез, желудка, кишечника, почек и печени, чем в доброкачественных новообразованиях в этих же органах.

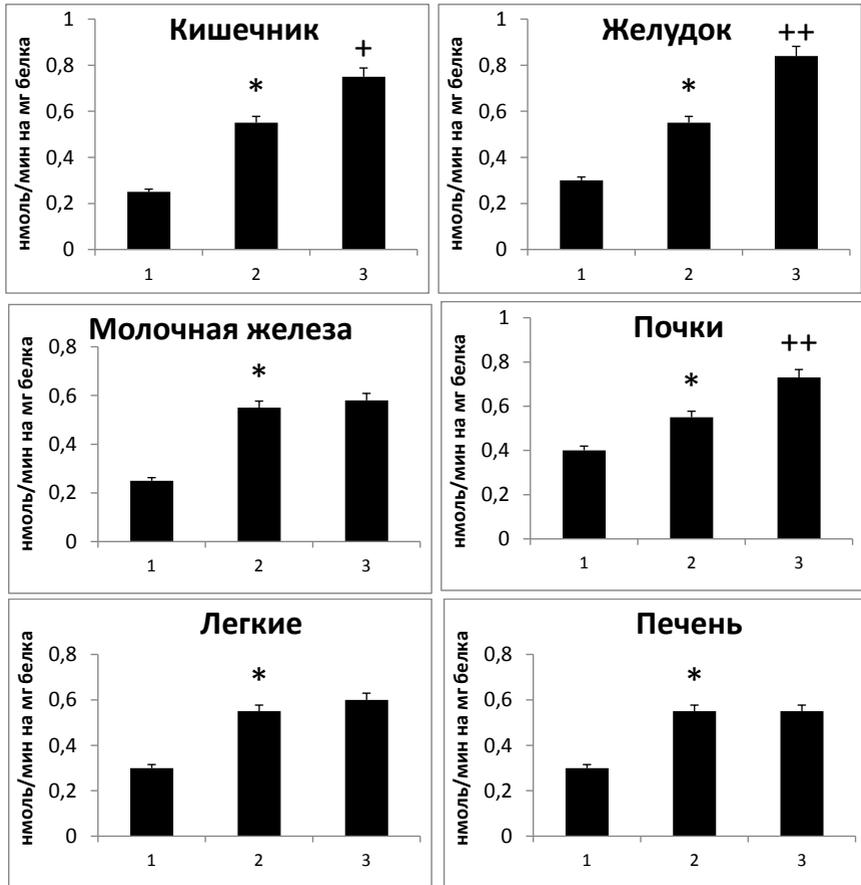


Рисунок 5. Активность пептидил-диптидазы А в здоровых тканях ( $n = 11$ ), доброкачественных и злокачественных новообразованиях кишечника ( $n = 12$  и  $14$  соответственно), желудка ( $n = 16$  и  $16$  соответственно), молочной железы ( $n = 12$  и  $15$  соответственно), почек ( $n = 12$  и  $11$  соответственно), легких ( $n = 11$  и  $11$  соответственно) и печени ( $n = 11$  и  $13$  соответственно) человека.

1 – здоровые ткани, 2 – доброкачественные новообразования, 3 – злокачественные новообразования,  $M \pm m$ ; \* –  $p < 0,001$  по сравнению со здоровыми тканями, + –  $p < 0,01$ , ++ –  $p < 0,001$  по сравнению с доброкачественными опухолями.

Активность КПЕ и ФМСФ-К в клетках доброкачественных опухолей достаточно низкая, в то время как в раковых клетках она достигает уровня активности секреторных клеток.

Полученные по карбоксипептидазам ФМСФ-КП данные вносят большой вклад в фундаментальные сведения о роли основных карбоксипептидаз, поскольку активность этих ферментов ранее не изучалась в раковых клетках почек, желудка, кишечника и легких человека. Распределение активности ФМСФ-КП в тканях человека впервые

исследовано в нашей работе, ранее она изучалась только в тканях животных (Сметанин В.А 2008, Вернигора А.Н 2004).

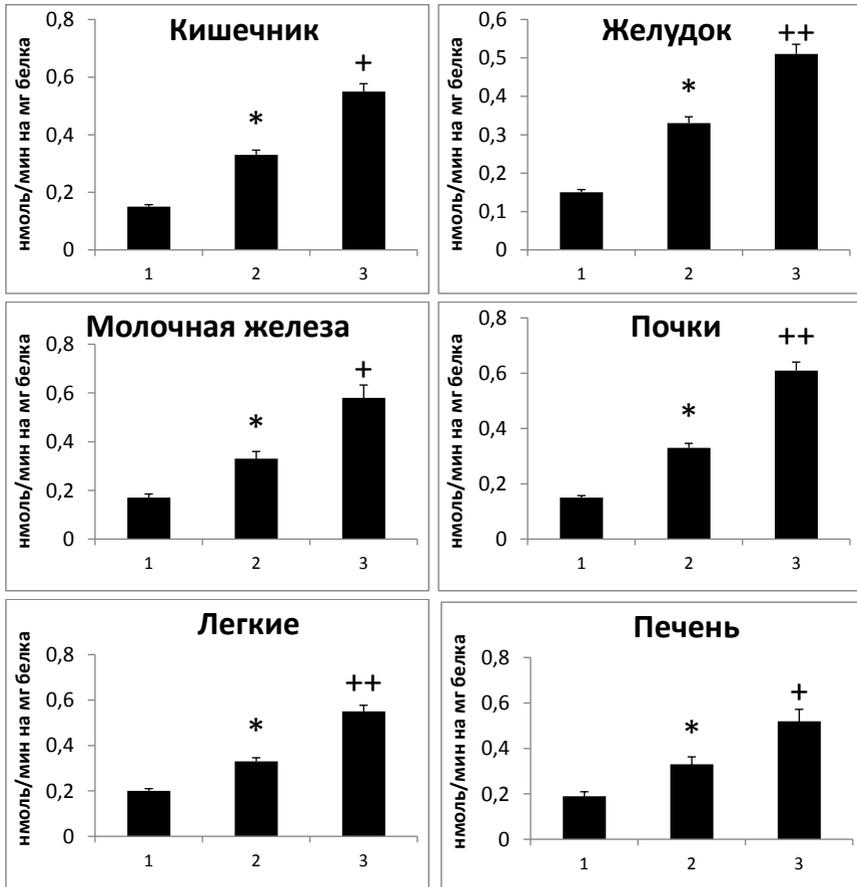


Рисунок 6. Активность лейцинаминопептидазы в здоровых тканях ( $n = 11$ ), доброкачественных и злокачественных новообразованиях кишечника ( $n = 12$  и  $14$  соответственно), желудка ( $n = 16$  и  $16$  соответственно), молочной железы ( $n = 12$  и  $15$  соответственно), почек ( $n = 12$  и  $11$  соответственно), легких ( $n = 11$  и  $11$  соответственно) и печени ( $n = 11$  и  $13$  соответственно) человека.

1 – здоровые ткани, 2 – доброкачественные новообразования, 3 – злокачественные новообразования,  $M \pm m$ ; \* –  $p < 0,001$  по сравнению со здоровыми тканями, + –  $p < 0,01$ , ++ –  $p < 0,001$  по сравнению с доброкачественными опухолями.

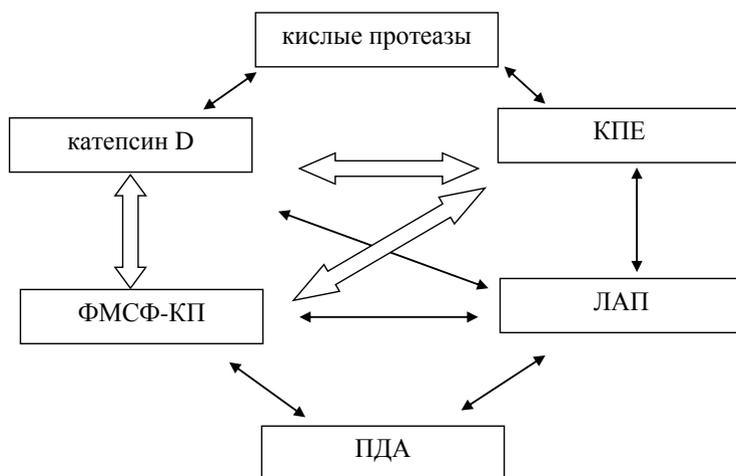
В отличие от КПЕ, которая присутствует в соматических органах в следовых количествах, активность ФМСФ-КП более высокая и достигает значений КПЕ некоторых секреторных отделов головного мозга и надпочечников (Вернигора А.Н., 2004). Это может согласовываться с высказанными ранее предположениями о более широких

функциях ФМСФ-КП, распределение активности которой у крыс соответствует интенсивности обмена белка в органах и тканях.

Таким образом, ФМСФ-КП – фермент с широким спектром активности, однако, в отличие от других ферментов обмена регуляторных пептидов, его биологическая роль изучена недостаточно полно.

Активность пептидил-диптидазы А в злокачественных новообразованиях была выше в кишечнике, желудке и почках по сравнению с доброкачественными опухолями этих органов (рис. 5). При сравнении доброкачественных и злокачественных новообразований молочной железы, легких и печени не выявлено изменений в активности исследованного фермента.

В злокачественных новообразованиях всех исследуемых органов активность лейцинаминопептидазы была выше, чем в доброкачественных опухолях: в молочной железе – более чем в два раза, в кишечнике, желудке и почках – более чем на 80 %, легких и печени – на 60 % (рис. 6).



**Рисунок 7. Результаты корреляционного анализа активности кислых протеаз, катепсина D, карбоксипептидазы E (КСЕ), ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП), пептидил-дипептидазы А (ПДА) и лейцинаминопептидазы (ЛАП) в злокачественных новообразованиях молочной железы, желудка, кишечника, почек, печени и легких человека.**



- положительная корреляция по всем исследованным органам,



- положительная корреляция по четырем и более органам.

Повышение активности пептидил-дипептидазы А и лейцинаминопептидазы, наблюдаемое в злокачественных новообразованиях, выражено не так существенно, как для катепсина D, кислых протеаз, КСЕ и ФМСФ-КП, что может указывать на значительно меньший диапазон участия данных ферментов в механизме опухолевого роста. Поскольку ПДА и ЛАП обладают широкой субстратной специфичностью, их роль может ограничиваться участием в функционально активированном общем метаболизме

пептидных молекул и цитоплазматическом этапном протеолизе. Кроме того, пептидил-дипептидаза А и лейцинаминопептидаза являются одними из ключевых ферментов, контролирующими уровни активных форм пептидов с ангиогенным действием, таким образом, непосредственно участвуя в процессе роста злокачественной опухоли. При этом отсутствие повышения активности ПДА в легких и печени человека соотносится с данными о том, что ангиогенез в опухолях данных органов, как правило, не играет ключевой роли в процессах развития новообразования по сравнению с другими органами (Campenot R.B. 2004).

Повышение активности кислых протеаз и катепсина D в злокачественных новообразованиях сопровождается ростом корреляционных связей с активностью карбоксипептидазы E, ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы, пептидил-дипептидазы А и лейцинаминопептидазы (рис. 7), что позволяет сделать вывод об активном вовлечении данных ферментов в процессы канцерогенеза, о высокой роли протеолиза в этиологии и патогенезе злокачественных заболеваний, а также предполагает наличие зависимости между процессами образования, модификации и деградации регуляторных пептидов и ростовых факторов при канцерогенезе.

Значения линейного коэффициента корреляции Пирсона представлены в таблицах 4 и 5. Наличие высоких значений коэффициента корреляции свидетельствует об изменении паттерна активности исследуемых ферментов при злокачественном перерождении, что может характеризовать специфику протеолитических процессов при опухолевом росте.

*Таблица 4. Значения линейного коэффициента корреляции Пирсона активности кислых протеаз, катепсина D, карбоксипептидазы E (КПЕ), ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП), пептидил-дипептидазы А (ПДА) и лейцинаминопептидазы (ЛАП) в здоровых тканях молочной железы, желудка, кишечника, почек, печени и легких человека*

группы сравнения	кишечник	желудок	молочная железа	почки	легкие	печень
КПЕ/ФМСФ-КП	0,73*	0,69	0,59	0,73*	0,69	0,55
КПЕ/катепсин D	0,79*	0,79*	0,68	0,74*	0,71	0,65
КПЕ/кислые протеазы	0,50	0,73*	0,65	0,71	0,69	0,35
КПЕ/ПДА	0,74*	0,71	0,70	0,54	0,72	0,64
КПЕ/ЛАП	0,70	0,70*	0,70	0,74*	0,59	0,55
ФМСФ-КП/катепсин D	0,72	0,72	0,70	0,71	0,72	0,61
ФМСФ-КП/кислые протеазы	0,49	0,72	0,66	0,55	0,67	0,60
ФМСФ-КП/ПДА	0,66	0,71	0,70	0,73*	0,30	0,39
ФМСФ-КП/ЛАП	0,58	0,60	0,61	0,64	0,69	0,62
катепсин D/кислые протеазы	0,40	0,60	0,59	0,62	0,51	0,69
катепсин D/ПДА	0,71	0,69	0,64	0,59	0,50	0,67
катепсин D/ЛАП	0,50	0,64	0,59	0,59	0,64	0,60
кислые протеазы/ПДА	0,65	0,71	0,74	0,61	0,45	0,38
кислые протеазы/ЛАП	0,40	0,73*	0,67	0,66	0,61	0,71
ПДА/ЛАП	0,60	0,70	0,63	0,64	0,39	0,35

\*p < 0,05

*Таблица 5. Значения линейного коэффициента корреляции Пирсона активности кислых протеаз, катепсина D, карбоксипептидазы E (КПЕ), ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП), пептидил-дипептидазы А (ПДА) и лейциламинопептидазы (ЛАП) в злокачественных новообразованиях молочной железы, желудка, кишечника, почек, печени и легких человека.*

группы сравнения	кишечник	желудок	молочная железа	почки	легкие	печень
КПЕ/ФМСФ-КП	0,91*	0,88*	0,79*	0,85*	0,82*	0,75*
КПЕ/катепсин D	0,92*	0,91*	0,89*	0,86*	0,84*	0,82*
КПЕ/кислые протеазы	0,63	0,83*	0,82*	0,84*	0,80*	0,58
КПЕ/ПДА	0,92*	0,86*	0,83*	0,79*	0,81*	0,80*
КПЕ/ЛАП	0,88*	0,85*	0,83*	0,86*	0,78*	0,77*
ФМСФ-КП/катепсин D	0,83*	0,89*	0,90*	0,88*	0,86*	0,81*
ФМСФ-КП/кислые протеазы	0,60	0,81*	0,84*	0,77*	0,81*	0,80*
ФМСФ-КП/ПДА	0,80*	0,89*	0,90*	0,91*	0,46	0,58
ФМСФ-КП/ЛАП	0,73	0,79*	0,80*	0,86*	0,85*	0,82*
катепсин D/кислые протеазы	0,59	0,79*	0,78*	0,82*	0,70	0,85*
катепсин D/ПДА	0,82*	0,84*	0,83*	0,81*	0,69	0,67
катепсин D/ЛАП	0,70	0,79*	0,78*	0,81*	0,82*	0,80*
кислые протеазы/ПДА	0,76*	0,83*	0,90*	0,82*	0,59	0,57
кислые протеазы/ЛАП	0,59	0,90*	0,88*	0,84*	0,82*	0,90*
ПДА/ЛАП	0,80*	0,83*	0,85*	0,84*	0,60	0,52

\* $p < 0,05$

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ:**

Результаты проведенного исследования позволяют подвести следующие итоги:

1. Показано значительное повышение активности кислых протеаз, катепсина D, карбоксипептидазы E, ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы, пептидил-дипептидазы A, лейцинаминопептидазы в доброкачественных опухолях всех исследованных органов по сравнению со здоровыми тканями, приводящее к утрате тканеспецифического паттерна в распределении активности протеолитических ферментов.

2. Установлен характер распределения активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в здоровых тканях молочной железы, желудка, кишечника, почек, печени и легких человека.

3. Установлен рост активности катепсина D в злокачественных новообразованиях всех исследованных органов, при этом относительная удельная активность катепсина D в них составляла от 82 до 100 % общей активности кислых протеаз, в то время как в здоровых тканях и доброкачественных новообразованиях она составляет не более 50%.

4. Значительное повышение активности основных карбоксипептидаз – карбоксипептидазы E и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы обнаружено в протоковой карциноме молочной железы, почечноклеточном раке, аденокарциноме желудка и толстой кишки, в то время как в здоровых органах и доброкачественных новообразованиях активность данных ферментов существенно ниже.

5. Распределение активности катепсина D, карбоксипептидазы E, ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в злокачественных новообразованиях молочной железы, желудка, кишечника, почек, печени и легких человека имеет тканеспецифический характер, отличный от здоровых тканей.

6. Высокий рост активностей и усиление корреляционных связей катепсина D, карбоксипептидазы E, ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы свидетельствуют о важной роли этих ферментов в механизме развития злокачественных новообразований.

***Рекомендации по использованию выводов***

1. При проведении аналитических и диагностических методик с использованием измерения активности пептидгидролаз в тканях человека необходимо учитывать существенное повышение активности данных ферментов не только в злокачественных, но и в доброкачественных новообразованиях.

2. Комплексное определение активностей катепсина D, КПЕ и ФМСФ-КП может применяться как диагностическая методика исследования злокачественных новообразований.

3. Поскольку катепсин D может присутствовать в повышенных количествах в качестве внеклеточного связывающего белка, а не как протеаза, возможна разработка малоинвазивных методик диагностики злокачественных новообразований с использованием меченых ингибиторов фермента, например, комплекса  $^{99m}\text{Tc}$ -пепстатин.

**Список работ, опубликованных в рецензируемых научных изданиях**

1. **Столяров А.А.**, Соловьев В.Б. Исследование активности протеолитических ферментов в злокачественных новообразованиях молочной железы, желудка, кишечника и почек человека // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 6-0. С. 571.

2. Соловьев В.Б., **Столяров А.А.** Роль пептидергической системы в патофизиологии злокачественных новообразований // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 5. С. 719.

3. Соловьев В.Б., Генгин М.Т., **Столяров А.А.**, Соловьева О.В., Бегутов М.М., Любченко О.Д. Активность основных карбоксипептидаз нервной системы крыс при физической работе и при введении семакса и селанка // Нейрохимия. 2016. Т. 33. № 1. С. 70-75.

**Работы, опубликованные в других изданиях**

4. Соловьев В.Б., Борисов А.Н., Сугрובה М.С., Волосникова Ж.А., **Столяров А.А.** Сравнительное изучение параметров пульсовой волны у пациентов, находящихся в зоне риска, с помощью нового диагностического комплекса // Материалы V Всероссийского с международным участием медико-биологического Конгресса молодых учёных «Симбиоз-Россия 2012» (Тверь, 03-08 декабря 2012) – Тверь, Изд-во ТГУ, 2012, – С. 155-156

5. Соловьев В.Б., Борисов А.Н., Сугрובה М.С., Волосникова Ж.А., **Столяров А.А.** Сравнительное изучение параметров пульсовой волны у пациентов, находящихся в зоне риска, с помощью нового диагностического комплекса // Культурное и историческое наследие в образовании и науке. Материалы IX Международной научно-методической конференции (Пенза, 12-15 мая 2013) – Пенза, Изд-во Пензенского филиала РГУИТП, 2013, – С. 76-78

6. Волосникова Ж.А., **Столяров А.А.**, Ермолаева А.А., Хатамов А.К., Соловьев В.Б., Генгин М.Т. Активность ферментов обмена регуляторных пептидов в опухолевой ткани человека // Биология – наука XXI века: тезисы 18-й Пушкинской международной школы-конференции молодых ученых (Пушино, 21 – 25 апреля 2014) – Пушино, Изд-во ИБК РАН, 2014, – С. 138-139.

7. **Столяров А.А.**, Соловьев В.Б. Разработка методов диагностики злокачественных опухолей на основе изучения активности пептидгидролаз // «Образование и наука: проблемы и перспективы развития»: Материалы Международного электронного Симпозиума. Редакционный совет: Омаров О.А., Абакаров М.И., Чернова С.А., Газиев А.Г.. 2014. С. 79-82.

8. Ермолаева А.А., Ястремская Я.П., Любченко О.Д., Хатамов А.К., **Столяров А.А.** Анализ ключевых ферментов модификации, процессинга и деградации регуляторных пептидов - катепсина D, карбоксипептидазы E и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в клетках злокачественных и доброкачественных опухолей // Наука и современность – 2014: Материалы Международной научно-практической конференции. 2014. С. 7-12.

9. Соловьев В.Б., Соловьева О.В., **Столяров А.А.**, Скуднов В.М. Влияние физической работы на уровень регуляторных пептидов и активность ферментов их обмена в сыворотке крови спортсменов различных квалификационных групп // Actualscience. 2015. Т. 1. № 2 (2). С. 6-16.

10. Соловьев В.Б., **Столяров А.А.** Роль ростовых факторов в патофизиологии злокачественных опухолей // Actualscience. 2015. Т. 1. № 3 (3). С. 6-10.

11. Соловьев В.Б., **Столяров А.А.**, Хатамов А.К. Разработка методов диагностики злокачественных опухолей на основе изучения активности пептидгидролаз // Российская наука в современном мире Сборник статей международной научно-практической конференции. Ответственный редактор: Соловьев В.Б.. 2015. С. 72-75.

12. Соловьев В.Б., **Столяров А.А.** Изучение активности основных карбоксипептидаз в клетках раковых опухолей человека // Фундаментальные и прикладные исследования в современной науке Сборник статей международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию Победы в Великой Отечественной войне. Под редакцией Соловьева В.Б.. 2015. С. 32-34.

13. **Столяров А.А.**, Калинина Е.В., Соловьев В.Б., Генгин М.Т. Изучения активности лейцинаминопептидазы в злокачественных новообразованиях молочной железы, желудка, кишечника, почек, печени и легких человека // Actualscience. 2016. Т. 2. № 5. С. 6-10.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГЭМЯК – гуанидиноэтилмеркаптоянтарная кислота

ЛАП – лейцинаминопептидаза

КПЕ – карбоксипептидаза E

ПДА – пептидил-дипептидаза A

ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид

ФМСФ-КП – фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидаза

## **ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДГИДРОЛАЗ В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЯХ ЧЕЛОВЕКА**

Доказана важная роль протеолитических процессов, катализируемых катепсином D, карбоксипептидазой E, ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазой, в развитии злокачественных новообразований. Впервые продемонстрировано увеличение активности целого комплекса пептидгидролаз в злокачественных новообразованиях различных органов. Впервые изучено распределение активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в тканях человека. Практический интерес представляют данные о значительном увеличении активности пептидгидролаз в злокачественных новообразованиях, что даёт возможность для разработки методов диагностики и лечения с использованием специфических ингибиторов данных ферментов.

Возможность применения – онкология, биохимия.

Anton A. Stolyarov

## **THE STUDY OF ACTIVITY OF PEPTID HYDROLASES IN HUMAN MALIGNANT TUMORS**

It was shown the important role of proteolytic processes catalyzed by cathepsin D, carboxypeptidase E and PMSF-inhibited carboxypeptidase in the development of malignancies. The increase in the activity of the whole peptide hydrolase complex in malignant tumors of various organs was demonstrated for the first time. The distribution of activity of PMSF-inhibited carboxypeptidase in human tissues was investigated. There is the practical interest in the data on the increase in activity of peptidehydrolases in malignancies that allows the development of diagnostic and treatment methods using specific inhibitors of these enzymes.

The possible application – oncology, biochemistry.

Подписано в печать 23.03.2017 г. Формат 60x84 1/16  
Бумага ксероксная. Печать трафаретная.  
Усл. печ. л. 1,4. Тираж 120. Заказ 23/03.

Отпечатано с готового оригинал-макета  
в типографии ИП Соколова А.Ю.  
440600, г. Пенза, ул. Кирова, 49, оф. 3,  
тел.: (8412) 56-37-16