

**Лабунець Г.П.**

*здобувач;*

**Вовчук І.Л.**

*доктор біологічних наук, професор;*

**Бескодарна В.Ю.**

*аспірант,*

*Одеський національний університет імені І.І. Мечникова*

## **ФРАКЦІОНУВАННЯ СУЛЬФАТОМ АМОНІЮ КАТЕПСИНУ *H* ПОМІРНО ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОЇ ФОРМИ ІНФІЛЬТРУЮЧОГО ДОЛЬКОВОГО РАКУ МОЛОЧНОЇ ЗАЛОЗИ**

Для багатьох типів пухлин людини, таких як: рак молочної залози, легень, мозку, шлунково-кишкового тракту, меланоми, менінгіоми показано збільшення активності протеолітичних ферментів у пухлинній тканині [1; 6; 10]. Одним з найменш досліджуваних протеолітичних ферментів є катепсин *H* (КФ 3.4.22.16), який відноситься до цистеїнових протеїназ. Деякі автори вважають, що цей фермент приймає участь в деструкції компонентів позаклітинного матриксу та базальної мембрани і тим самим сприяє проліферації та метастазуванню пухлинних клітин [8, 9]. На відміну від інших протеїназ катепсин *H* володіє як протеїназною, так і екзопептидазною активністю [8].

Мета дослідження полягала у фракціонуванні сульфатом амонію катепсину *H* помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку молочної залози для подальшого дослідження фізико-хімічних та біохімічних властивостей ферменту.

Матеріалом для дослідження служили зразки помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку молочної залози. Дана патологія молочної залози за гістологічною класифікацією уявляє собою вузлове утворення без чітких меж, щільної консистенції, сірувато-жовтого або білого кольору та має різний ступінь тканинної та клітинної атипії. Патоморфологічну та гістологічну верифікацію діагнозів за міжнародною класифікацією ВООЗ (Женева, 2003) з визначенням морфологічного стану та ступеню диференціювання трансформованих клітин пухлинної тканини здійснювали спеціалісти сертифікованої та ліцензійованої патоморфологічної лабораторії обласного онкологічного диспансеру м. Одеси [2]. Збереження етичних та правових норм згідно: Хельсінської декларації (1964 р), Конвенції про захист прав та достоїнств людини в зв'язку з використанням досягнень біології та медицини (Конвенція про права людини та біомедицини 1996 р.), закону України «Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людини» (1999 р.) забезпечувалось медичним закладом, згідно договору про сумісні дослідження. Пацієнтки були інформовані та дали письмову згоду на використання анатомічного матеріалу для біохімічних досліджень. Після оперативного втручання зразки гомогенізували з 0,9%-м розчином NaCl

(у співвідношенні та 1:10) та центрифугували при 9000g за хв (при +4°C) протягом 30 хв. У супернатанті визначали вміст білка за біуретовим методом та активність катепсину *H* за модифікованим методом Бредшоу [7]. Метод визначення активності ферменту оснований на спектрофотометричному визначенні продуктів гідролізу білкового субстрату (окситоцину) при довжині хвилі 570 нм. Активність ферменту виражали в мкмоль лейцину, який утворювався в процесі гідролізу окситоцину, на мг білка за хв при 37°C. Статистичну обробку результатів досліджень проводили у відповідності з *t*-критерієм Стюдента [5]. За статистично достовірну різницю приймали рівень достовірності більше 95% ( $p < 0,05$ ).

Розчини білків, що були отримані з гомогенатів досліджуваних тканин, після діалізу (проти 10-кратного об'єму дистильованої води) піддавали поетапному фракціонуванню сульфатом амонію, при зростаючій концентрації солі від 20% до 40%, 60% і 80% насичення. Для очищення від надлишку  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , фракції, що були отримані за 20%, 40%, 60% і 80% насичення сульфатом амонію, піддавали повторному діалізу проти 10-кратного об'єму дистильованої води.

Вивчення біохімічних властивостей катепсину *H* пухлинної тканини можливо тільки в разі отримання її в очищеному стані. Тому дослідження було спрямоване на отримання катепсину *H* з тканини помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку, в якій, за даними наших попередніх досліджень [3; 4] було встановлено найбільшу активність даного ферменту.

Таблиця 1

**Активність катепсину *H* помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку молочної залози за фракціонування сульфатом амонію**

Етапи висолування	V, мл	Вміст білка, мг білка / г тканини	Активність катепсину <i>H</i>		Загальна активність (A•V)	Коефіцієнт очищення відносно розчину до діалізу	% вихід відносно розчину до діалізу
			мкмоль лейцину / мг тканини / хв	мкмоль лейцину / мг білка / хв			
Розчин до діалізу	17,25	46,00 ± 3,67	38,4 ± 3,26	0,83 ± 0,06	662,4 ± 58,43	1,0	100
20,0% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,0	4,52 ± 0,42	8,25 ± 0,71	1,83 ± 0,14	24,75 ± 2,07	2,20	3,74
40,0% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,8	7,19 ± 0,85	6,13 ± 0,53	0,85 ± 0,06	23,29 ± 1,92	1,02	3,52
60,0% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,8	16,23 ± 1,14	5,88 ± 0,62	0,36 ± 0,02	22,34 ± 1,96	0,43	3,37
80,0% насичення $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	16,3	5,14 ± 4,76	16,5 ± 1,43	3,21 ± 0,02	268,95 ± 28,13	3,86	40,60

**Примітка:** A•V – сумарна активність катепсину *H* в об'ємі досліджуваної фракції, мкмоль лейцину / мг тканини / хв; V – об'єм, мл

При фракціонуванні катепсину *H* з тканини злоякісного новоутворення молочної залози було встановлено, що при 20,0% насиченні сульфатом амонію осаджувалося 9,83% загального білка та 3,74% загальної активності ферменту злоякісного новоутворення молочної залози (табл. 1).

Питома активність та коефіцієнт очищення катепсину *H* цієї фракції збільшилися в 2,2 рази, однак, загальна активність катепсину *H* досліджуваної фракції зменшилася в 26,76 рази, відносно показників розчину до діалізу. При 40,0% насиченні сульфатом амонію осаджувалося 15,63% загального білка та 3,52% загальної активності ферменту, однак, коефіцієнт очищення та питома активність, практично не відрізнялися від показників вихідного діалізованого розчину. При 60,0% насиченні сульфатом амонію осаджувалося 35,28% загального білка та 3,37% загальної активності ферменту. Коефіцієнт очищення катепсину *H* та його питома активність були і 2,3 рази нижче щодо показників розчину до діалізу. Найбільший вихід ферменту злоякісного новоутворення молочної залози – 40,60% – був встановлений при 80,0% насиченні сульфатом амонію, що частково збігається з результатами інших дослідників, в яких було встановлено, що катепсин *H* менінгіоми фракціонується за 30-80% насичення сульфатом амонію [8]. При 80,0% насиченні сульфатом амонію, осаджувалося 11,17% загального білка та 40,60% загальної активності ферменту. Ступінь очищення та питома активність ферменту злоякісного новоутворення на даному етапі фракціонування становили 3,86 рази, відносно показників вихідного діалізованого розчину.

Встановлене значне зростання питомої активності катепсину *H* злоякісного новоутворення молочної залози, (відносно вихідного діалізованого розчину) може бути пояснено присутністю ендogenous інгібітора катепсину *H*, який звільнюється під час фракціонування, або наявністю множинних форм катепсину *H* тканини новоутворення молочної залози.

Висновки.

1. Максимальний вихід катепсину *H* помірно диференційованої форми інфільтруючого долькового раку молочної залози – 40,60% встановлений при 80,0% насиченні сульфатом амонію.

2. Максимальний ступінь очищення (3,86 рази щодо показників розчину до фракціонування) катепсину *H* злоякісного новоутворення встановлений при 80,0% насиченні сульфатом амонію.

### Список використаних джерел:

1. Васильева О. С. Изучение механизма аутокаталитической активации прокатепсина *H* in vitro / О. С. Васильева, В. Ю. Серебров, Б. Турк, В. Турк // Исследовано в России. – 2002. – С. 1092-1102.

2. Всемирная Организация Здравоохранения / Материалы ежегодных отчетов. Санкт-Петербург. 1981. – 286 с.

3. Лабунец Г. П. Активность катепсина *H* в опухоли молочной железы у женщин разного возраста / Г. П. Лабунец, И. Л. Вовчук, Н. А. Орел, В. А. Ногин // Вісник Одеського національного університету. – 2012. – Т. 17, Вип. 4(29). – С. 25-29.

4. Лабунец Г. П. Активность катепсина *H* в опухолевой и пограничной тканях у женщин с дольково-инфильтративной формой рака молочной железы / Г. П. Лабунец, И. Л. Вовчук, Н. А. Орел, В. С. Вовчук // Вісник Одеського національного університету. – 2013. – Т. 18, Вип. 3 (32). – С. 16-22.

5. Лапач С. Н., Чубенко А. В., Бабич П. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион, 2000. – 320 с.

6. Потеряева О. Н. Иммуноферментный анализ цистатина С и его роль в динамике развития и лечения опухоли / О. Н. Потеряева, О. В. Фаламеева, В. И. Каледин и др. // Бюллетень СО РАМН. – 2001. – № 1. – С. 34-37.

7. Bradshaw R. S. The amino acid sequence of bovine carboxypeptidase A / Bradshaw R. S., Ericsson L. H., Walsh K. A. [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1969. – Vol. 63, № 4. – P. 1389-1394.

8. Chornaya V., Lyannaya O. Some physicochemical properties of cathepsin H from human meningioma // Exp Oncol. – 2004. – Vol. 26, № 4. – P. 278-281.

9. Kageshita T. Biochemical and immunohistochemical analysis of cathepsins B, H, L and D in human melanocytic tumors / Kageshita T., Yoshii A., Kimura T., Maruo K., Ono T., Himeno M., Nishimura Y. // Arch Dermatol Res. – 1995. – Vol. 87. – P. 266-272.

10. Kos J., Schweiger A. Cathepsins and cystatins in extracellular fluids – useful biological markers in cancer // Radiol Oncol. – 2002. – Vol. 36. – P. 176-179.

**Швец О.М.**

*аспірант,*

*Національний авіаційний університет*

## **АФЛАТОКСИНИ: ПРОБЛЕМА ТА ШЛЯХИ ЇЇ ВИРІШЕННЯ**

Про важливість проблеми токсичних метаболітів мікроскопічних грибів свідчать наукові дані по всьому світу. Згідно даних Комісії ООН з проблем харчування і сільського господарства (FAO), 40% зерна в східній частині Європи забруднено мікотоксинами. У першу чергу варто звернути увагу на продукти метаболізму грибів роду *Aspergillus*, зокрема, афлатоксини. Афлатоксини – це смертельно небезпечні мікотоксини, які відносяться до класу полікетидів. Типовим і найбільш поширеним продуцентом є мікроскопічний гриб *Aspergillus flavus*, який росте на зені і насінні фруктів (найчастіше це кукурудза, пшениця і арахіс) [1]. З усіх токсинів природного походження афлатоксини є найбільш небезпечними. Доведено, що максимально допустимого безпечного рівня афлатоксинів не існує, навіть найменша їх кількість у продуктах має негативний вплив і може поступово накопичуватися в живому організмі. Афлатоксини відзначаються високою стабільністю і зберігають свою біологічну активність в контамінованих субстратах протягом тривалого часу. Ці речовини надходять з кормом в організм тварин, викликають важкі захворювання – мікотоксикози, що приносить великі збитки тваринництву [1; 2]. Готова продукція, забруднена токсином, є також небезпечною для людини. Крім цього вони проявляють мутагенну, тератогенну, гепатоканцерогенну і імунодепресивну дію [3]. Тому питання інактивації афлатоксинів та дезінфекції харчової сировини і продовольства є однією з найбільш актуальних. Детоксикація кормів це досить складний процес, оскільки афлатоксини є стійкими хімічними сполуками [2].