

Cel pracy: Oznaczenie i porównanie aktywności arginazy i stężenia L-argininy w surowicy chorych na raka jelita grubego i z przerzutami tego nowotworu do wątroby oraz określenie przydatności diagnostycznej badanych parametrów.

Materiał i metody: Badania prowadzono na krwi pobranej od pacjentów przed operacją. Aktywność arginazy i stężenie L-argininy oznaczano spektrofotometrycznie.

Wyniki: Aktywność arginazy w grupie chorych na raka jelita grubego była ponad 3-krotnie wyższa niż u zdrowych dawców krwi, a w grupie z przerzutami 6-krotnie wyższa. Podwyższonej aktywności arginazy towarzyszył 2-krotny wzrost stężenia L-argininy w obu badanych grupach chorych. Oba parametry wykazywały bardzo wysoką czułość wynoszącą w grupie chorych na raka pierwotnego 83% i 90% odpowiednio dla arginazy i L-argininy, a w grupie z przerzutami 81% dla arginazy i 96% dla L-argininy.

Wnioski: Zarówno oznaczanie aktywności arginazy, jak i stężenia L-argininy w surowicy chorych na raka jelita grubego i z jego przerzutami do wątroby może być pomocne w diagnostyce tych schorzeń. Równoczesne oznaczanie obu parametrów zwiększa wartość diagnostyczną arginazy, gdyż może być pomocne w różnicowaniu tych nowotworów z procesami nienowotworowymi. Oznaczanie tylko stężenia L-argininy nie wpływa na różnicowanie zmiany pierwotnej od przerzutowej.

Słowa kluczowe: arginaza, L-arginina, rak jelita grubego, przerzuty raka jelita grubego do wątroby.

Arginaza i arginina w diagnostyce chorych na raka jelita grubego i chorych z przerzutami raka jelita grubego do wątroby

Arginase and arginine in diagnostics of patients with colorectal cancer and patients with colorectal cancer liver metastases

Magdalena Mielczarek-Puta, Wojciech Graboń, Alicja Chrzanowska, Anna Barańczyk-Kuźma

Katedra i Zakład Biochemii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Wstęp

Nowotwory złośliwe stanowią jedną z najgroźniejszych chorób we współczesnym świecie, a rak jelita grubego jest drugą, po raku płuc u mężczyzn i raku gruczołu sutkowego u kobiet, przyczyną zgonów. Statystyki wskazują, że u połowy osób chorych na raka jelita grubego dochodzi do rozwoju przerzutów odległych, głównie do wątroby, natomiast u 30% przerzuty występują już w chwili wykrycia ogniska pierwotnego. Podstawowym sposobem leczenia jest resekcja chirurgiczna, której skuteczność zależy w dużej mierze od liczby, wielkości, zaawansowania, a także umiejscowienia zmian nowotworowych. Dlatego też dla rokowania, a tym samym przeżycia pacjenta, ważne jest wczesne rozpoznanie procesu nowotworowego. W diagnostyce raka jelita grubego i jego przerzutów do wątroby najczęściej stosowanymi markerami są antygen nowotworowy (CEA) oraz antygen węglowodanowy (CA19-9) [1]. Badania prowadzone od wielu lat w Zakładzie Biochemii Akademii Medycznej w Warszawie [obecnie Warszawski Uniwersytet Medyczny] wskazują na możliwość wykorzystania arginazy w celu diagnostyki zarówno pierwotnego raka jelita grubego, jak i jego przerzutów do wątroby [2, 3].

Arginaza (EC.3.5.3.1) katalizuje hydrolizę L-argininy do mocznika i ornityny. W wątrobie człowieka pełni ważną funkcję w detoksykacji amoniaku jako ostatni enzym cyklu mocznikowego. Poza wątrobą występuje także w wielu innych tkankach, w których jej rola nie została w pełni wyjaśniona [4]. U ssaków arginaza występuje w formie dwóch izoenzymów, będących produktami genów AI i AII. Izoenzymy arginazy różnią się lokalizacją komórkową (AI w cytozolu, AII w mitochondrium) oraz odmiennymi właściwościami fizykochemicznymi, kinetycznymi i immunologicznymi [5]. Rozkładana przez arginazę L-arginina powstaje w osi jelitowo-nerkowej [6, 7]. W warunkach fizjologicznych jej synteza jest wystarczająca do prawidłowego funkcjonowania dorosłego organizmu. Nie jest jednak wystarczająca dla organizmów rosnących, którym musi być dostarczana z pokarmem. Suplementacja L-argininy jest wskazana także w urazach, oparzeniach, zaburzeniach czynności nerek, w których dochodzi do zmniejszenia stężenia argininy w surowicy [8]. Arginina bierze udział w wielu ważnych procesach fizjologicznych i metabolicznych jako związek wyjściowy do syntezy białek komórkowych, tlenu azotu, glutaminianu, glutaminy, kreatyny. Poza mocznikiem jest źródłem uwalnianej przez arginazę ornityny, z przemian której powstają poliaminy. Ponieważ poliaminy są odpowiedzialne za proliferację i różnicowanie się komórek zarówno L-arginina, jak i arginaza mogą pełnić istotną funkcję w procesie kancerogenezy [9, 10].

Aim of the study: Determination and comparison of arginase activity and L-arginine level in blood serum of patients with colorectal cancer and colorectal cancer liver metastases, and an assessment of diagnostic usefulness of studied parameters.

Material and methods: Blood samples were taken from all patients just before their surgery arginase activity and L-arginine level were determined spectrophotometrically.

Results: Serum arginase activity in patients with colorectal cancer was over 3-fold higher compared to healthy blood donors and as much as 6-fold higher in those with colorectal cancer liver metastases. An increased arginase activity was associated with a 2-fold increase in arginine level in both patients' groups. Both parameters showed high sensitivity - for the group with primary colorectal cancer it was 83% and 90% for arginase and L-arginine, respectively, and for the group with colorectal cancer liver metastasis 81% for arginase and 96% for L-arginine.

Conclusions: determination of arginase activity as well as L-arginine concentration in blood serum may be useful in diagnosis of patients with colorectal cancer and colorectal cancer liver metastases. Concomitant evaluation of both parameters increases the diagnostic value of arginase determination itself, however it does not allow the differential diagnosis between primary and metastatic colorectal cancer.

Key words: arginase, L-arginine, colorectal cancer, colorectal cancer liver metastases.

W niniejszej pracy oznaczono i porównano aktywność arginazy i stężenie L-argininy w surowicy chorych na raka jelita grubego i z przerzutami tego nowotworu do wątroby oraz określono przydatność diagnostyczną badanych parametrów.

Materiał i metody

Krew do badań pochodziła od chorych na raka jelita grubego i osób z przerzutami raka jelita grubego do wątroby, operowanych w Klinikach Chirurgii Akademii Medycznej w Warszawie. Badaniami objęto grupę 30 chorych na raka jelita grubego (11 kobiet i 18 mężczyzn), w wieku 51–77 lat (średni wiek 67,3±9,6 roku) i grupę 27 osób z przerzutami raka jelita grubego do wątroby (13 kobiet i 14 mężczyzn), w wieku 37–71 lat (średni wiek 55,1±9,8 roku). Diagnostyka przedoperacyjna obejmowała testy biochemiczne, kolonoskopię oraz badanie ultrasonograficzne. Zmiany nowotworowe potwierdzone zostały pooperacyjnym badaniem histopatologicznym. Grupę kontrolną stanowiło 25 zdrowych dawców krwi (14 kobiet i 11 mężczyzn), w wieku 30–75 lat (średni wiek 50,9±11 lat). Krew do badań pobierano dzień przed operacją, a otrzymaną surowicę zamrażano w temp. –80°C i stosowano do badań. Badania wykonywano za zgodą pacjentów i Komisji Bioetycznej przy Akademii Medycznej w Warszawie.

Aktywność arginazy oznaczano spektrofotometrycznie z ilości powstałej w reakcji ornityny i wyrażano w jednostkach na litr surowicy (U/l) [11]. Jedną jednostką aktywności odpowiadała 1 mikromolowi ornityny powstającej w ciągu 1 min w temperaturze 37°C.

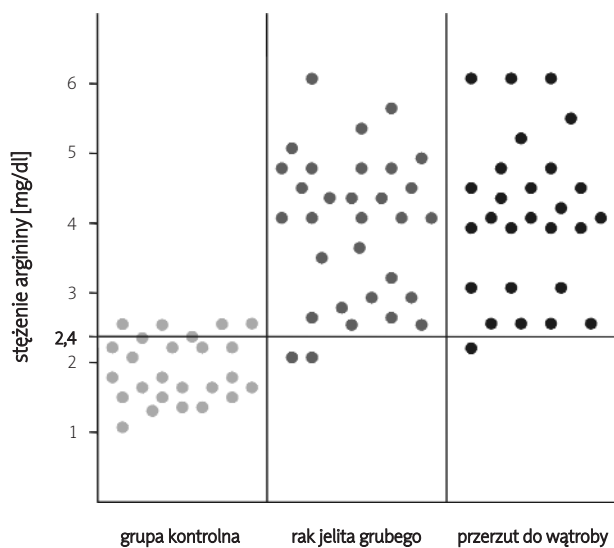
Stężenie L-argininy oznaczano metodą spektrofotometryczno-enzymatyczną, mierząc stężenie ornityny powstałej w reakcji katalizowanej przez standaryzowany preparat arginazy i wyrażano w mg/dl [12].

Zakres wartości referencyjnych grupy kontrolnej, zawierający się pomiędzy 5. a 95. percentylem wynosił 3,1–15,8 U/l dla aktywności arginazy i 1,3–2,5 mg/dl dla stężenia argininy. Poziom odcięcia (*cut-off*) określono za pomocą analizy ROC (ang. *receiver operating characteristic*). Dla arginazy wynosił on 12 U/l, a dla argininy 2,4 mg/dl. Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono przy użyciu programu Statistica 6.0, StatSoft Inc. (St. Tulsa USA). Uzyskane dane przedstawiono jako wartości mediany. W analizie statystycznej stosowano testy nieparametryczne ANOVA, U-Manna-Whitneya. W ocenie istotności statystycznej różnic pomiędzy grupami chorych i grupą kontrolną przyjęto $p < 0,001$.

Wyniki

Aktywność arginazy w surowicy chorych na raka jelita grubego mieściła się w przedziale 6,9–57,6 U/l (mediana 18,4), natomiast w surowicy osób z przerzutami raka jelita grubego do wątroby 4,3–147 U/l (mediana 34,1). Aktywność arginazy w obu badanych grupach była znamienne wyższa niż w grupie kontrolnej, gdzie wynosiła 3,1–19,5 U/l (mediana 5,6) (ryc. 1., 2.). Stężenie L-argininy w surowicy chorych na raka jelita grubego i osób z przerzutami tego nowotworu do wątroby mieściło się w zakresie 2,2–6,0 mg/dl. Wartość mediany w obu badanych grupach była podobna i wynosiła 3,7 mg/dl w surowicy chorych na raka jelita grubego i 4,1 mg/dl w surowicy osób z przerzutami. Podobnie jak aktywność arginazy, stężenie L-argininy w obu badanych grupach chorych było znamienne większe w porównaniu z grupą zdrowych dawców krwi, gdzie wynosiło 1,1–2,5 mg/dl (mediana 1,9) (ryc. 1., 3.).

Na podstawie uzyskanych wyników określono czułość każdego z badanych parametrów. W przypadku arginazy odsetek wyników prawdziwie dodatnich w grupie chorych na raka jelita grubego oraz w grupie z przerzutami do wątroby był zbliżony i wynosił odpowiednio 83 i 81% (tab. 1.). Czułość oznaczania L-argininy była wyższa i wynosiła 90% w raku jelita grubego i 96% w przerzutach tego nowotworu do wątroby (tab. 1.).



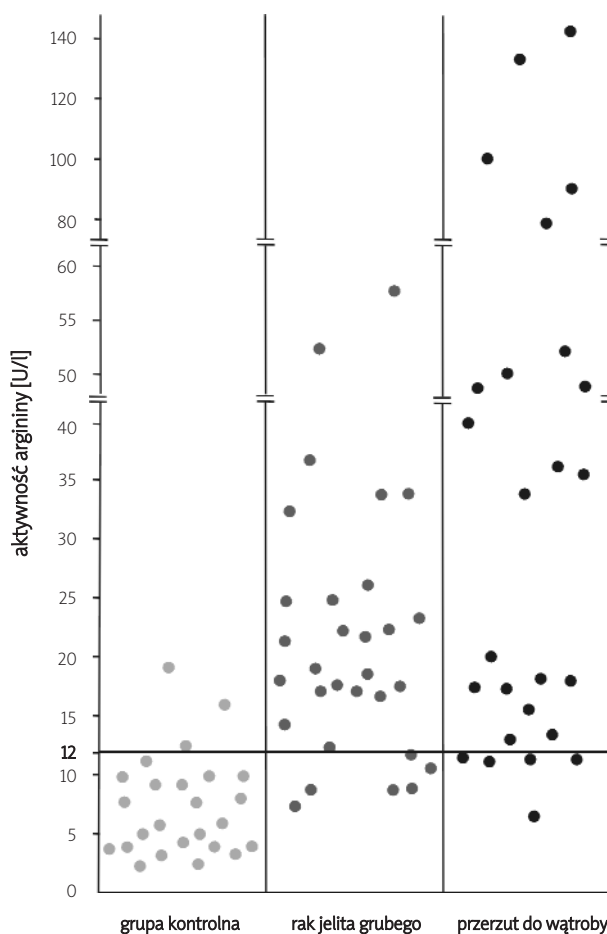
Ryc. 1. Aktywność arginazy i stężenie argininy w surowicy zdrowych dawców krwi, chorych na raka jelita grubego i z przerzutami raka jelita grubego do wątroby. Wyniki podano jako wartości mediany

Fig. 1. Arginase activity and arginine level in serum of healthy blood donors, patients with colorectal cancer and colorectal cancer liver metastases. Results are expressed as medians

Dyskusja

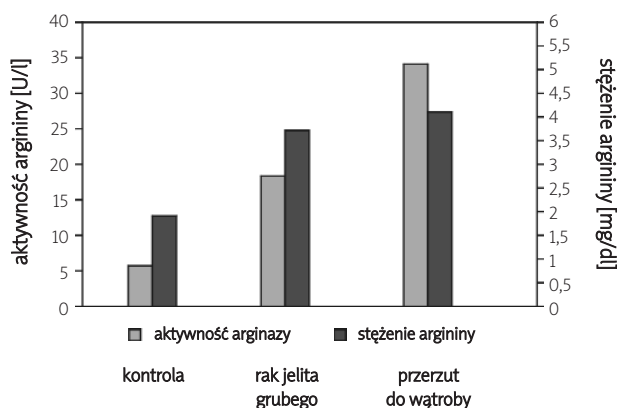
Jak wykazaliśmy uprzednio, aktywność arginazy wzrasta znacząco w surowicy chorych na raka pierwotnego jelita grubego oraz osób z przerzutami tego nowotworu do wątroby [2, 3]. W niniejszej pracy potwierdzono wcześniejsze wyniki i stwierdzono, że u chorych na raka pierwotnego aktywność arginazy wzrasta 3-krotnie, a u chorych z przerzutami 6-krotnie. Ponieważ aktywność arginazy w guzach jest znacznie wyższa niż w prawidłowej błonie śluzowej jelita grubego, obecna w surowicy chorych arginaza prawdopodobnie pochodzi z tkanki nowotworowej [13]. Czulość oznaczania arginazy w surowicy badanych w obecnej pracy chorych na raka pierwotnego wynosiła 83%, a z przerzutami 81%. W tej drugiej grupie była ona zgodna z wcześniejszymi badaniami wykonanymi z udziałem 85 osób z przerzutami raka jelita grubego do wątroby (85%) [2]. Jednak do wzrostu aktywności arginazy w surowicy dochodzi także w schorzeniach nienowotworowych, takich jak: oparzenia, cukrzyca, astma czy stany zapalne [14–17]. Ponieważ może to ograniczać wartość diagnostyczną wyłącznego oznaczania tego enzymu jako markera raka jelita grubego i jego przerzutów do wątroby, w prezentowanych badaniach poza aktywnością arginazy równocześnie oznaczano stężenie rozkładanej przez nią L-argininy.

Hydrolizowana przez arginazę L-arginina jest aminokwasem niezbędnym do wzrostu komórek nowotworowych [18]. Rak jelita grubego, w przeciwieństwie np. do raka pierwotnego wątroby, nie jest auksotroficzny wobec L-argininy, którą może syntetyzować z cytruliny [19]. Mimo tego zarówno w guzach pierwotnych, jak i przerzutowych raka jelita grubego wykazano wzrost



Ryc. 2. Rozkład aktywności arginazy w surowicy chorych na raka jelita grubego i osób z przerzutami raka jelita grubego do wątroby. Zakres wartości referencyjnych wynosił 3,1–15,8 U/l, poziom odcięcia (cut off) – 12 U/l

Fig. 2. Distribution of arginase activity in blood serum of patients with colorectal cancer and colorectal cancer liver metastases. Reference range: 3.1 to 15.8 U/L, cut off level – 12 U/L



Ryc. 3. Rozkład stężenia L-argininy w surowicy chorych na raka jelita grubego i osób z przerzutami raka jelita grubego do wątroby. Zakres wartości referencyjnych wynosił 1,3–2,5 mg/dl, poziom odcięcia (cut off) – 2,4 mg/dl

Fig. 3. Distribution of L-arginine level in blood serum of patients with colorectal cancer and colorectal cancer liver metastases. Reference range: 1.3 to 2.5 mg/dl, cut off level – 2.4 mg/dl

Tabela 1. Czutość oznaczania arginazy i L-argininy w surowicy chorych na raka jelita grubego i osób z przerzutami raka jelita grubego do wątroby

Table 1. Sensitivity of arginase and L-arginine determination in blood serum of patients with colorectal cancer and colorectal cancer liver metastases

Wynik testu	Rak jelita grubego				Przerzut do wątroby			
	arginaza		L-arginina		arginaza		L-arginina	
	n	%	n	%	n	%	n	%
prawdziwie dodatni	25	83	27	90	22	81	26	96
falszywie ujemny	5	17	3	10	5	19	1	4
liczba chorych	30	100	30	100	27	100	27	100

syntezy transporterów argininy, co wskazuje na zwiększone zapotrzebowanie komórek nowotworowych na ten aminokwas [20, 21]. Stwierdzono także, że w raku pierwotnym jelita transport argininy jest stymulowany przez EGF i TGF- α , czynniki mające bardzo istotny wpływ na wzrost komórek nowotworowych [22]. Jak wykazaliśmy, u chorych na raka jelita grubego oraz z jego przerzutami, wzrostowi aktywności arginazy towarzyszy 2-krotne zwiększenie stężenia L-argininy w surowicy. Czutość oznaczania L-argininy była bardzo wysoka (90% u chorych na raka pierwotnego i 96% u osób z przerzutami). Z literatury wiadomo, że w stanach nienowotworowych, przebiegających ze wzrostem aktywności arginazy, stężenie L-argininy w surowicy jest zmniejszone [14, 23–25]. Wyjaśnienie zwiększenia stężenia L-argininy w surowicy chorych badanych w obecnej pracy wymaga dalszych badań.

Uzyskane w pracy wyniki wskazują, że równoczesne oznaczanie aktywności arginazy i stężenia L-argininy może podnieść skuteczność oznaczania samej arginazy jako markera raka jelita grubego i/lub jego przerzutów do wątroby. Może też być pomocne w różnicowaniu tych nowotworów z procesami nienowotworowymi. Znaczne różnice pomiędzy aktywnością arginazy (ale nie stężeniem L-argininy) w surowicy chorych na raka pierwotnego jelita grubego i osób z jego przerzutami do wątroby mogą być wykorzystywane w różnicowaniu tych dwóch procesów nowotworowych.

Podziękowania

Praca była finansowana z projektu badawczego promotorskiego nr 2 PO5B 124 27 oraz tematu 1WK/N/2007. Autorzy dziękują prof. M. Krawczykowi, kierownikowi Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej, Transplantacyjnej i Wątroby, prof. I. Krasnodębskiemu, kierownikowi Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej, Gastroenterologicznej i Żywienia i prof. Z. Wierzbickiemu z Katedry i Kliniki Chirurgii Ogólnej i Transplantacyjnej za udostępnienie krwi badanych chorych.

Piśmiennictwo

- Nowotwory przewodu pokarmowego. Krawczyk M (red). Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.
- Mielczarek M, Chrzanowska A, Ścibior D, Skwarek A, Ashamiss F, Lewandowska K, Barańczyk-Kuźma A. Arginase as a useful factor for the diagnosis of colorectal cancer liver metastases. *Int J Biol Markers* 2006; 21: 40-4.
- Poremska Z, Skwarek A, Mielczarek M, Barańczyk-Kuźma A. Serum arginase activity in postsurgical monitoring of patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 2002; 94: 2930-34.
- Jenkinson CP, Groody WW, Cederbaum SD. Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol* 1996; 114: 107-32.
- Cederbaum SD, Yu H, Grody WW, Kern RM, Yoo P, Iyer RK. Arginases I and II: do their functions overlap? *Mol Genet Metab* 2004; 81 Suppl 1: S38-44.
- Windmueller HG, Spaeth AE. Source and fate of circulating citrulline. *Am J Physiol* 1981; 241: E473-80.
- van de Poll MC, Siroen MP, van Leeuwen PA, Soeters PB, Melis GC, Boelens PG, Deutz NE, Dejong CH. Interorgan amino acid exchange in humans: consequences for arginine and citrulline metabolism. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 167-72.
- Wu G, Meininger C, Knabe DA, Bazer FW, Rhoads JM. Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3: 59-66.
- Gokmen SS, Aygit AC, Ayhan MS, Yorulmaz F, Gulen S. Significance of arginase and ornithine in malignant tumors of the human skin. *J Lab Clin Med* 2001; 137: 340-4.
- Singh R, Pervin S, Wu G, Chaudhuri G. Activation of caspase-3 activity and apoptosis in MDA-MB-468 cells by N (omega)-hydroxy-L-arginine, an inhibitor of arginase, is not solely dependent on reduction in intracellular polyamines. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1863-9.
- Chinard FP. Photometric estimation of proline and ornithine. *J Biol Chem* 1952; 199: 91-5.
- Gopalakrishna R, Nagarajan B. A simplified procedure for the estimation of arginine in plasma and urine using arginase. *Clin Chim Acta* 1980; 106: 333-7.
- Poremska Z, Ząbek J, Graboń W, Rahden-Staroń I, Barańczyk-Kuźma A. Arginase isoforms in human colorectal cancer. *Clin Chim Acta* 2001; 305: 157-65.
- Kashyap SR, Lara A, Zhang R, Park YM, DeFronzo RA. Insulin reduces plasma arginase activity in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2008; 31: 134-9.
- Morris CR, Poljakovic M, Lavrisha L, Machado L, Kuypers FA, Morris SM Jr. Decreased arginine bioavailability and increased serum arginase activity in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 148-53.
- Ścibior D, Ashamiss F, Wierzbicki Z, Barańczyk-Kuźma A. Arginase activity in blood serum of patients with acute and chronic pancreatitis. *Pol Merk Lek* 2006; 126: 522-4.
- Yu YM, Ryan CM, Castillo L, Lu XM, Beaumier L, Tompkins RG, Young VR. Arginine and ornithine kinetics in severely burned patients: increased rate of arginine disposal. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001; 280: E509-E517.
- Caso G, McNurlan MA, McMillan ND, Eremin O, Garlick PJ. Tumour cell growth in culture: dependence on arginine. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107: 371-9.
- Dillon BJ, Prieto VG, Curley SA, Ensor CM, Holsberg FW, Bomalaski JS, Clark MA. Incidence and distribution of argininosuccinate synthetase deficiency in human cancers: a method for identifying cancers sensitive to arginine deprivation. *Cancer* 2004; 100: 826-33.
- Cendan JC, Souba WW, Copeland EM 3rd, Lind DS. Characterization and growth factor stimulation of L-arginine transport in a human colon cancer cell line. *Ann Surg Oncol* 1995; 2: 257-65.
- Cendan JC, Souba WW, Copeland EM 3rd, Lind DS. Increased L-arginine transport in a nitric oxide-producing metastatic colon cancer cell line. *Ann Surg Oncol* 1996; 3: 501-8.
- Huang S, Trujillo JM, Chakraborty S. Proliferation of human colon cancer cells: role of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Int J Cancer* 1992; 52: 978-86.
- Grasemann H, Schwartz R, Grasemann C, Vester U, Racké K, Ratjen F. Decreased systemic bioavailability of L-arginine in patients with cystic fibrosis. *Respir Res* 2006; 7: 87.

24. Sandstrom P, Trulsson L, Gasslander T, Sundqvist T, von Döbeln U, Svanvik J. Serum amino acid profile in patients with acute pancreatitis. *Amino Acids* 2007; DOI: 10.1007/S00726-007-0557-5.
25. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *JAMA* 2005; 294: 81-90.

Adres do korespondencji

prof. dr hab. **Anna Barańczyk-Kuźma**
Katedra i Zakład Biochemii
Warszawski Uniwersytet Medyczny
ul. Banacha 1
02-097 Warszawa
tel. +48 22 572 06 93; faks +48 22 572 06 79
e-mail: akuzma@amwaw.edu.pl