

Biochemiczne markery nowotworowe są obecnie powszechnie wykorzystywane do wykrywania i rozpoznawania nowotworów oraz monitorowania skuteczności leczenia. Dotychczas mało poznanymi markerami enzymatycznymi są prokoagulant nowotworowy (*cancer procoagulant* CP) i katepsyna D.

Celem pracy było oznaczenie aktywności prokoagulantu nowotworowego (CP) i katepsyny D w surowicy krwi kobiet z rakiem sutka i kobiet zdrowych oraz w tkankach raka sutka i tkankach zdrowych, a także ocena przydatności tego badania w diagnostyce onkologicznej.

Badanie aktywności CP i katepsyny D przeprowadzono w surowicy krwi i w tkankach 8 pacjentek z rakiem sutka i 10 kobiet zdrowych (grupa kontrolna). Aktywność CP w surowicy krwi oznaczano wg Gordona i Bensona wyrażając ją czasem krzepnięcia w sekundach (s). Aktywność CP w 10% homogenatach tkanek badano wg Colucci i wsp. i wyrażano ją w nmol pNa/ml. Aktywność katepsyny D w surowicy krwi oznaczano metodą Folina-Ciocalteu i wyrażono ilością uwolnionej tyrozyny w nM Tyr/ml/24 godz., a w tkankach w nM Tyr/ml/2 godz. Aktywność CP w surowicy krwi chorych na raka sutka wynosi $144,0 \pm 17,0$ s, a zdrowych kobiet $279,3 \pm 31,7$ s. Aktywność katepsyny D w surowicy krwi chorych z rakiem sutka wynosi $175,6 \pm 35,9$ nM Tyr/ml/24 godz., a kobiet zdrowych $76,8 \pm 17,9$ nM Tyr/ml/24 godz. Aktywność CP w homogenatach tkanek raka sutka ma wartość $50,2 \pm 13,5$ nmol pNa/ml, a w homogenatach tkanki prawidłowej $20,0 \pm 2,1$ nmol pNa/ml. Aktywność katepsyny D w homogenatach tkanki raka sutka wynosi $299,1 \pm 28,3$ nM Tyr/ml/2 godz., a w homogenatach tkanki zdrowej sutka $61,4 \pm 9,0$ nM Tyr/ml/2 godz. We wszystkich badanych przypadkach różnice między aktywnością CP i aktywnością katepsyny D w materiale badanym i kontrolnym są istotne statystycznie ($p < 0,001$).

Uzyskane wyniki sugerują, że badanie aktywności CP i katepsyny D może być wykorzystane w diagnostyce onkologicznej sutka.

Słowa kluczowe: prokoagulant nowotworowy (CP), katepsyna D, rak sutka.

Aktywność prokoagulantu nowotworowego i katepsyny D w przypadkach raka sutka

Activity of cancer procoagulant and cathepsin D in breast cancer

Sławomir Dariusz Szajda, Michał Jankowski,
Beata Zalewska, Bożena Kożusko,
Wojciech Gabrylewski, Zdzisław Skrzydlewski

Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Zakład Diagnostyki Obrazowej Samodzielnego Publicznego Dziecięcego Szpitala Klinicznego Akademii Medycznej w Białymstoku, Białostocki Ośrodek Onkologiczny, Wojewódzki Szpital Zespolony im. J. Śniadeckiego w Białymstoku

WSTĘP

Tkanki nowotworowe wytwarzają immunogenne substancje wydzielane do krwi lub innych płynów ustrojowych, nazwane biochemicznymi markerami nowotworowymi [1]. Oznaczanie tych markerów wykorzystywane jest do wykrywania, rozpoznawania nowotworu oraz monitorowania leczenia chorych [2]. Rolę markerów nowotworowych mogą pełnić enzymy: prokoagulant nowotworowy (*cancer procoagulant* CP) i katepsyna D.

Prokoagulant nowotworowy (CP) jest proteinazą cysteinową, która występuje w surowicy krwi i w tkankach rakowych osób chorych na nowotwory, a nie występuje u ludzi zdrowych [3]. Wysoką aktywność CP stwierdzono w surowicy krwi chorych z rakiem szyjki macicy i trzonu macicy [4], rakiem jajnika [4, 5] oraz rakiem piersi [6, 7].

Katepsyna D jest proteinazą aspartylową, która wchodzi w skład kaskady proteolitycznej, biorącej udział w inwazji nowotworowej i tworzeniu przerzutów [8]. Wysoką aktywność tego enzymu zaobserwo-

wano u chorych z rakiem endometrium i rakiem szyjki macicy [9] oraz u chorych z rakiem jajnika [10].

Celem pracy było określenie aktywności prokoagulantu nowotworowego (CP) i katepsyny D w surowicy krwi i w tkankach nowotworowych pobranych od kobiet z rakiem sutka oraz w odpowiednim materiale kontrolnym, jak również próba oceny przydatności tego badania w diagnostyce onkologicznej sutka.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badany – krew i tkanki, pobrano od kobiet z rozpoznaniem histopatologicznym rakiem sutka, przed wdrożeniem chemioterapii oraz radioterapii. Krew pobierano z żyły łokciowej w sposób typowy, przed zabiegiem operacyjnym. Tkanki raka sutka i fragmenty zdrowych tkanek sąsiadujących z nowotworem pobrano w czasie zabiegu operacyjnego. Badaniem objęto 8 pacjentek w wieku od 38 do 82 lat oraz 10 kobiet zdrowych (wolontariuszek) w wieku od 21 do 33 lat, które stanowiły grupę kontrolną.

Biochemical cancer markers are used for cancer diagnosis as well as monitoring of treatment effectiveness. More and more attention is paid to cancer procoagulant enzymes (cancer procoagulant CP) and cathepsin D.

The aim of the study was to determine the activity of cancer procoagulant (CP) and cathepsin D in the blood serum and tissue in healthy women and those with breast cancer as well as to evaluate the usefulness of this examination in oncological diagnostics.

The activity of CP and cathepsin D was studied in blood serum and tissue of 8 breast cancer patients and 10 healthy women (control group). Blood serum CP activity was marked according to Gordon and Benson expressing it by coagulation time in seconds (s). The CP activity in 10% tissue homogenate was examined according to Colucci et al method expressing it by in nmol pNa/ml. The activity of cathepsin D was determined using the Folin-Ciocalteu method and expressed by the quantity of released tyrosine in nM Tyr/ml/24h and Tyr/ml/2h in the case of blood serum and tissue, respectively. The CP activity in the breast cancer blood serum was found to be 144.0 ± 17.0 s, but in the blood serum of controls it was 279.3 ± 31.7 s. The activity of cathepsin D was 175.6 ± 35.9 nM Tyr/ml/24h and 76.8 ± 17.9 nM Tyr/ml/24h in the blood serum of breast cancer and healthy controls, respectively. The CP activity in breast cancer tissue homogenates reaches the value of 50.2 ± 13.5 nmol pNa/ml and in normal tissue homogenates it is 20.0 ± 2.1 nmol pNa/ml. The activity of cathepsin D is 299.1 ± 28.3 nM Tyr/ml/2 h and 61.4 ± 9.0 nM Tyr/ml/2 h in tissue homogenates of breast cancer group and control group, respectively. Differences between the activity of CP and that of cathepsin D in the examined and control material are statistically significant ($p < 0.001$) in all studied cases.

The results suggest that examining the activity of CP and cathepsin D may be used in oncological diagnostics of breast cancer.

Key words: cancer procoagulant (CP), cathepsin D, breast cancer.

Aktywność CP w surowicy krwi oznaczano metodą Gordona i Bensona [11] i wyrażono ją czasem krzepnięcia w sekundach (s). Aktywność CP w 10-proc. homogenatach tkankowych oznaczano specyficzną dla tego enzymu metodą spektrofotometryczną wg Colucci i wsp. [12] i wyrażano ją ilością uwolnionej p-nitroaniliny w nmol pNa/ml. Aktywność kathepsyny D oznaczano metodą Folina-Ciocalteu w modyfikacji miedziowej [13], wyrażając ją ilością uwolnionej tyrozyny w nM Tyr/ml/24 godz. w surowicy krwi i w nM Tyr/ml/2 godz. w przypadku badania aktywności kathepsyny D w tkankach. Wyniki opracowano statystycznie przy użyciu testu Manna-Whitneya. Za poziom istotności statystycznej różnic przyjęto $p < 0,05$.

WYNIKI

Z przeprowadzonych badań wynika, że aktywność prokoagulantu nowotworowego (CP) mierzona czasem krzepnięcia w surowicy krwi chorych na raka sutka wynosi $144 \pm 17,0$ s, natomiast aktywność tego enzymu w surowicy krwi zdrowych kobiet wynosi $279,3 \pm 31,7$ s. Procentowy wzrost aktywności CP w raku sutka wynosi 94 proc. (tabela).

Aktywność kathepsyny D mierzona przyrostem tyrozyny kwasorozpuszczalnej w surowicy krwi chorych z rakiem sutka wynosi $175,6 \pm 35,9$ nM Tyr/ml/24 godz., a kobiet zdrowych $76,8 \pm 17,9$ nM Tyr/ml/24 godz., co świadczy o wzroście aktywności o 129 proc. w porównaniu z grupą kontrolną. Aktywność CP w homogenatach tkanek raka sutka ma wartość $50,2 \pm 13,5$ nmol pNa/ml, a w homogenatach tkanki prawidłowej $20 \pm 2,1$ nmol pNa/ml. Wzrost aktywności CP wynosi w tym przypadku 151 proc. wartości uzyskanych w grupie kontrolnej. Aktywność kathepsyny D w homogenatach tkanki raka sutka wynosi $299,1 \pm 28,3$ nM Tyr/ml/2 godz., a w homogenatach tkanki zdrowej sutka $61,4 \pm 9,0$ nM Tyr/ml/2 godz. Wzrost aktywności kathepsyny D wynosi 387 proc. w porównaniu do aktywności stwierdzonej w grupie kontrolnej. We wszystkich badanych przypadkach różnice między aktywnością CP i aktywnością kathepsyny D w materiale badanym i kontrolnym są istotne statystycznie ($p < 0,001$).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badane enzymy: prokoagulant nowotworowy (CP) i kathepsyna D

Tab. Wyniki badania aktywności CP i kathepsyny D w surowicy krwi chorych na raka sutka i kobiet zdrowych oraz w tkankach raka sutka i tkankach prawidłowych

Table. Examination results of CP and cathepsin D activity in the blood serum and tissue of women with breast cancer and controls

Markery	Badany materiał	\bar{X}	SD \pm	p
prokoagulant nowotworowy (CP)	surowica krwi chorych na raka sutka	144,0	17,0	0,001
	surowica krwi kobiet zdrowych [s]	279,3	31,7	
	homogenaty tkanki raka sutka homogenaty tkanki prawidłowej sutka [nmol pNa/ml]	50,2 20,0	13,5 2,1	0,001
kathepsyna D	surowica krwi chorych na raka sutka	175,6	35,9	0,002
	surowica krwi kobiet zdrowych [nM Tyr/ml/24 godz.]	76,8	17,9	
	homogenaty tkanki raka sutka homogenaty tkanki prawidłowej sutka [nM Tyr/ml/2 godz.]	299,1 61,4	28,3 9,0	0,001

biorą udział w rozwoju choroby nowotworowej. Oznaczanie ich aktywności może mieć w onkologii dużą wartość diagnostyczno-prognostyczną.

Aktywność prokoagulacyjną wykazuje badana surowica krwi i tkanki raka sutka. Stwierdzono, że aktywność CP w surowicy krwi chorych z rakiem sutka rośnie prawie 2-krotnie, a w tkankach zmienionych nowotworowo ponaddwukrotnie w porównaniu do materiału kontrolnego. Tkanki nowotworowe wytwarzają substancje o charakterze prokoagulantów [14]. Obserwowane znaczne skrócenie czasu krzepnięcia osocza bez czynnika VII sugeruje, że badany prokoagulant nowotworowy bezpośrednio aktywuje czynnik X bez udziału czynnika VII [11]. Prokoagulant niezależny od czynnika VII i bezpośrednio aktywujący czynnik X występuje również w doświadczalnym raku płuca Lewisa, w czerniaku B16, mięsaku J.W., włóknakiomęsaku mF56 [15] i raku Walkera [16]. Mielicki i wsp. [17] badali CP w nowotworze *Guerin epithelioma* i zaobserwowali związek między poziomem prokoagulantu nowotworowego a masą guza. Wykazano wzrost aktywności CP w okresie intensywnego wzrostu guza i spadek w fazie terminalnej.

Donatii i wsp. [18] stwierdzili w białaczkach zależność pomiędzy przebiegiem choroby a aktywnością CP. Prokoagulant nowotworowy nie był obecny w komórkach szpiku w okresie remisji, natomiast jego obecność ujawniła się w przypadku nawrotu choroby, w okresie jeszcze przed wystąpieniem objawów, co może sugerować możliwość wykorzystania badania CP do monitorowania przebiegu choroby i wczesnego ujawnienia wznowy [18, 19]. Kożuszek i wsp. [2] stwierdzili, że aktywność CP u chorych na raka przełyku, raka żołądka i raka jelita grubego po radykalnym zabiegu operacyjnym wyraźnie obniżała się, natomiast w przypadku zabiegu nieradykalnego lub stwierdzenia przerzutów nie ulegała zmianie.

Z uzyskanych danych eksperymentalnych wynika, że aktywność katepsyny D w surowicy krwi pacjentek z rakiem sutka jest przeszło 2-krotnie wyższa w porównaniu do aktywności tego enzymu w surowicy krwi zdrowych kobiet. Natomiast aktywność katepsyny D w homogenatach tkanki raka sutka jest prawie 5-krotnie wyższa od aktywności tego enzymu w homogenatach tkanki zdrowej sutka. Wyniki badania wskazują na wyraźny związek między poziomem aktywności tego enzymu a występowaniem choroby nowotworowej. Istnieje wiele danych literaturowych potwierdzających udział enzymów proteolitycznych w rozroście tkanek nowotworowych [1, 8]. Katepsyna D jest jednym z enzymów kaskady proteolitycznej, zaangażowanej w proces inwazji nowotworowej i tworzenie przerzutów [8]. Duża aktywność proteolityczna katepsyny D powoduje degradację białek substancji międzykomórkowej i błony podstawnej, a także aktywację, przez ograniczoną proteolizę, proenzymów katepsyny B i L [8]. Katepsyna D bierze udział w uwalnianiu czynników wzrostu, np. bFGF (czynnik wzrostu fibroblastów) [20]. Procesy te odgrywają istotną rolę w kancerogenezie dzięki stymulacji neoangiogenezy. Na aktywność proteolityczną katepsyny D może wpływać wiele czynników, takich jak wewnętrzne pH, produkty metabolizmu, hormony, czynniki wzrostu, inhibitory [21]. Nie można wykluczyć, że większa aktywność katepsyny D w homogenatach tkanek raka sutka jest spowodowana przez niekontrolowane działanie jednego z tych czynników, który w procesie nowotworzenia wpływa na aktywność enzymu.

Katepsyna D jest enzymem lizosomalnym, obecnym w prawidłowych komórkach. Wydzielana jest w nadmiarze przez komórki raka sutka na skutek indukcji estrogenami [22]. Przy użyciu różnych technik (immunohistochemia, hybrydyzacja *in situ*, ELISA, blotting) wyka-

zano 2-50-krotny wzrost ekspresji katepsyny D w komórkach nowotworowych sutka w porównaniu z komórkami fizjologicznej tkanki sutka lub fibroblastami [22]. Wzrost ekspresji katepsyny D zaobserwowano także w komórkach nowotworowych endometrium i szyjki macicy [10], wątrobiaka, czerniaka [23] i nowotworach innych tkanek [21].

Wyniki przeprowadzonych badań aktywności CP i katepsyny D w przypadkach raka sutka potwierdzają, że enzymy te można uważać za biochemiczne markery nowotworowe, które mogą być przydatne w diagnostyce onkologicznej.

WNIOSKI

1. Aktywność CP i katepsyny D w surowicy krwi kobiet z rakiem sutka oraz w homogenatach tkanek raka sutka jest znacznie wyższa niż w surowicy krwi kobiet zdrowych i w tkankach niezmiennych nowotworowo.
2. Oznaczania aktywności CP i katepsyny D w surowicy krwi kobiet z rakiem sutka mogą być wykorzystane w diagnostyce onkologicznej.

PIŚMIENNICTWO

1. Szymendera J, Góźdz SS. *Rola krążących markerów nowotworowych w diagnostyce i monitorowaniu leczenia chorych na nowotwory*. Nowotwory 1995; 45: 369-83.
2. Kożuszek B, Skrzydlewska E, Snarska J, et al. *Cancer procoagulant as a marker in monitoring the therapy in cases of oesophageal, stomach and colorectal cancer*. Folia Histochem Cytobiol 2001, 39, (supl. 2): 104-5.
3. Mielicki W. *Biochemistry of cancer procoagulant*. Haemostasis 2001; 31 (supl. 1): 8-10.
4. Szajda SD, Jóźwik M, Wiśniewski R, Skrzydlewski Z. *Aktywność prokoagulantu nowotworowego (CP) w surowicy krwi w przypadkach nowotworów narządów płciowych u kobiet*. Współcz Onkol 2002; 6: 571-4.
5. Snarska J, Szajda S, Skrzydlewski Z, Kożuszek B. *Ocena wartości diagnostycznej prokoagulantu nowotworowego w przypadkach raka*

- trzustki, wątroby i jajnika. Pol Merkuriusz Lek 2003; 15: 123-4.
6. Mielicki WP, Tenderenda M, Rutkowski P, Chojnowski K. *Activation of blood coagulation and the activity of cancer procoagulant in breast cancer patients*. Cancer Lett 1999; 146: 61-6.
 7. Rucińska M, Furman M, Skrzydlewski Z, Zaremba E. *Activity of cancer procoagulant (CP) in serum of patients with cancer of lung, breast, oesophagus and colorectum*. Acta Biochem Pol 1997; 44: 109-12.
 8. Tomaszewski JJ, Tomaszewski T. *Enzymy lityczne w proliferacji nowotworowej*. Diagn Lab 1991; 27: 56-62.
 9. Scambia G, Benedetti Panici P, Ferrandina G, et al. *Significance of cathepsin-D expression in uterine tumours*. Eur J Cancer 1995; 31: 1449-54.
 10. Scambia G, Brnedetti P, Ferrandina G, et al. *Cathepsin D assay in ovarian cancer: correlation with pathological features and receptors for oestrogen, progesterone and epidermal growth factor*. Br J Cancer 1991; 64: 182-4.
 11. Gordon SG, Benson B. *Analysis of serum cancer procoagulant activity and its potential as a tumor marker*. Thromb Res 1989; 56: 431-40.
 12. Colucci M, Curatolo L, Donati MB, Semeraro N. *Cancer cell procoagulant activity: evaluation by an amidolytic assay*. Thromb Res 1980; 18: 589-95.
 13. Barret AJ. *Proteinases in mammalian cells in tissues*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford 1977; 46-135.
 14. Żurawski P, Grygoruk M, Worowski K. *Prokoagulant nabłoniaka Guerin*. Acta Hemat Pol 1985; 16: 52-64.
 15. Roncaglioni MC, Falanga A. *Enzymatic and immunologic characterization of a cysteine proteinase procoagulant in servery murine metastasizing tumors. XIth International Congress on Thrombosis and Haemostasis*. Thromb Hemost 1978; 58: 234.
 16. Gordon SG, Sloane B, Cross B, et al. *Purification and characterization of two procoagulants from Walker 256 carcinosarcoma tumors. XIth International Congress on Thrombosis and Haemostasis*. Thromb Hemost 1987; 58: 235.
 17. Mielicki WP, Wierzbicki R. *CP in serum of rats during development of experimental epithelioma*. Int J Cancer 1990; 45: 125-6.
 18. Donati MB, Falanga A, Consonni R. *CP in acute non lymphoid leukemia relationship of enzyme detection to disease activity*. Thromb Hemost 1990; 64: 1116-9.
 19. Falanga A, Alessio MG, Donati MB, Barbui T. *A new procoagulant in acute leukemia*. Blood 1988; 71: 870-5.
 20. Ensoli B, Markham P, Kao V. *Block of AIDS-Kaposi's sarcoma (KS) cell growth, angiogenesis, and lesion formation in nude mice by antisense oligonucleotide targeting basic FGF*. A novel strategy for the therapy of KS. J Clin Invest 1994; 94: 1736-46.
 21. Leto G, Gebbia N, Rausa L, Tumminello FM. *Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic disease*. Anticancer Res 1992; 12: 235-48.
 22. Cavailles V, Rochefort H. *Cathepsin D gene of human MCF 7 cells contains estrogen-responsive sequences in its 5 proximal flanking region*. Biochem Biophys Res Commun 1991; 174: 816-24.
 23. Maguchi S, Taniguchi N, Makita A. *Elevated activity and increased mannose-6-phosphate in the carbohydrate moiety of cathepsin D from human hepatoma*. Cancer Res 1988; 48: 362-67.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr n. med. **Sławomir Dariusz Szajda**
 Samodzielna Pracownia Biofarmacji
 Akademia Medyczna
 ul. Mickiewicza 2c
 15-089 Białystok
 tel./faks + 48 85 748 56 07
 e-mail: spoak@amb.edu.pl