

Katepsyna D jest jednym z enzymów kaskady proteolitycznej zaangażowanej w proces rozwoju nowotworu. Fizjologiczne zużycie i rozpad komórek różnych tkanek i narządów oraz wydalanie z komórek drogą egzocytozy ciałek reszkowych powodują występowanie śladowych ilości tego enzymu we krwi i płynach ustrojowych. Znaczne nasilenie rozpadu i zwiększenie aktywności katepsyny D we krwi ma miejsce w niektórych stanach patologicznych. Z tego względu oznaczanie aktywności katepsyny D w surowicy krwi może posiadać znaczenie diagnostyczne.

Celem pracy było określenie aktywności katepsyny D w homogenatach mięśniaków macicy oraz tkanek prawidłowych, jak również w surowicy krwi pacjentek z mięśniakami macicy i kobiet zdrowych.

W podjętej pracy określono w 18 przypadkach aktywność katepsyny D w homogenatach mięśniaków macicy i zdrowej tkanki mięśniowej macicy oraz w surowicy krwi kobiet z mięśniakami macicy i kobiet zdrowych. Aktywność badanego enzymu określano w 10-proc. homogenatach mięśniaków macicy i zdrowej tkanki mięśnia macicy oraz w surowicy krwi metodą Folina-Ciocalteu w modyfikacji miedziowej i wyrażano ją ilością uwolnionej tyrozyny w nM Tyr/ml/2 godz. Stwierdzono, że aktywność katepsyny D w homogenatach mięśniaków macicy wynosi  $151,5 \pm 36,2$  nM Tyr/ml/2 godz., a tkanek prawidłowych  $80,8 \pm 17,8$  nM Tyr/ml/2 godz. Podobnie aktywność katepsyny D w surowicy krwi kobiet z mięśniakami macicy ma wartość  $40,5 \pm 13,5$  nM Tyr/ml/2 godz., natomiast kobiet zdrowych  $26,5 \pm 11,8$  nM Tyr/ml/2 godz. Uzyskane wartości w materiale badanym i kontrolnym różniły się w istotny sposób statystycznie ( $p < 0,001$ ).

Przeprowadzone badania sugerują, iż oznaczanie aktywności katepsyny D może być wykorzystane w ginekologicznej diagnostyce onkologicznej jako informacja komplementarna w stosunku do badania histopatologicznego.

Słowa kluczowe: katepsyna D, mięśniaki macicy.

# Aktywność katepsyny D u kobiet w przypadkach mięśniaków macicy

*Cathepsin D activity in cases of uterine leiomyoma*

Sławomir Dariusz Szajda, Beata Zalewska,  
Kamil Michalak, Zdzisław Skrzydlewski

Samodzielna Pracownia Biofarmacji, Zakład Diagnostyki Obrazowej Samodzielnego Publicznego Dziecięcego Szpitala Klinicznego Akademii Medycznej w Białymstoku oraz SPZOZ Wojewódzkiego Szpitala Zespołowego im. J. Śniadeckiego, Oddziału Ginekologii w Białymstoku

## WSTĘP

Katepsyna D jest proteinazą lizosomalną, która pełni w organizmie wiele różnych funkcji, m.in. bierze udział w trawieniu białek, dokonuje ograniczonej proteolizy biologicznie czynnych peptydów, enzymów i hormonów [1]. Jako enzym kaskady proteolitycznej czynnie uczestniczy w procesie inwazji nowotworowej poprzez miejscowe naciekanie i tworzenie przerzutów [2]. Katepsyna D jest zdolna do degradacji macierzy międzykomórkowej [3] oraz do aktywacji innych proteaz (katepsyny B, katepsyny L i kolagenazy), odpowiedzialnych za progresję guzów nowotworowych [4]. Katepsyna D może być uznana za jeden z markerów nowotworowych. Wzrost jej aktywności stwierdzono w przypadku raka piersi [5], raka narządów rodnych kobiety [6, 7] i raka przewodu pokarmowego [8]. Katepsyna D w wyniku choroby nowotworowej przechodzi do krwi, moczu, płynu mózgowo-rdzeniowego, przez co oznaczanie aktywności tego enzymu nabiera znaczenia diagnostycznego. Dotychczas brak jest doniesień o badaniu aktywności katepsyny D w przypadkach mięśniaków macicy.

Celem pracy było określenie aktywności katepsyny D w homogenatach mięśniaków macicy oraz

tkanek prawidłowych, jak również w surowicy krwi pacjentek z mięśniakami macicy i kobiet zdrowych.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badany stanowiły tkanki mięśniaków macicy oraz tkanki zdrowego mięśnia macicy sąsiadujące z nowotworem, pobrane w czasie chirurgicznego zabiegu usunięcia mięśniaków macicy, potwierdzone badaniem histopatologicznym, pobrane od 18 kobiet (w wieku od 38 do 61 lat). Uzyskane tkanki cięto na drobne fragmenty, zawieszano w oziębionym 0,25 M roztworze sacharozy zawierającym 0,2 proc. tritonu X-100 w stosunku wagowo-objętościowym 1: 9 i homogenizowano. W czasie homogenizacji przygotowane do badania próby poddano chłodzeniu lodem. Homogenaty doprowadzano do pH 5,0 przy użyciu 0,1 M HCl, następnie poddawano wirowaniu w temp. 4°C. Pozbawiony struktur komórkowych płyn nadosadowy doprowadzano do pH 4,0 przy użyciu 0,1 M HCl. W tak przygotowanych 10-proc. homogenatach badano aktywność katepsyny D. Krew do badań od kobiet z mięśniakami macicy oraz od 18 zdrowych kobiet – wolontariuszek (w wieku od 22 do 41 lat) pobierano z żyły łokciowej w sposób typowy.

*Cathepsin D is one of proteolytic cascade enzymes involved in the process of cancer development. Physiological wearing out and decomposition of cells of various tissues and organs as well as elimination of residual corpuscles out of cells by way of exocytosis results in the occurrence of trace quantities of this enzyme in the serum and body fluids. Significant intensification of the damage and increase in cathepsin D activity in the blood takes place in certain pathological conditions. Therefore, the determination of cathepsin D activity in the serum may have a diagnostic value.*

*The goal of the study has been to determine cathepsin D activity in uterine leiomyoma homogenates as well as in control tissues and in the serum of uterine leiomyoma patients and healthy controls.*

*In the present study cathepsin D activity in homogenates of uterine leiomyomas and healthy muscle tissue of the uterus as well as in serum of women with uterine leiomyoma and healthy ones has been estimated in 18 cases. The activity of the examined enzyme was determined in 10% homogenates of uterine leiomyomas and of healthy tissue of the uterus muscle as well as in the serum using the Folin-Ciocalteu method in the cupric modification and this activity was expressed as a quantity of released tyrosine in nM Tyr/ml/2h. Cathepsin D activity was estimated to be 151.5±36.2 nM Tyr/ml/2h and 80.8±17.8 nM Tyr/ml/2h in homogenates of uterine leiomyomas and unchanged tissues, respectively. Similarly, cathepsin D activity in serum of women with uterine leiomyoma is 40.5±13.5 nM Tyr/ml/2h whereas that of healthy women was 26.5±11.8 nM Tyr/ml/2h. Values obtained from examined and control material were significantly different in statistic terms ( $p < 0.001$ ). Our study suggests that the determination of cathepsin D activity may be useful in gynecological oncological diagnostics as complementary information in relation to histopathological examination.*

*Key words: cathepsin D, uterine leiomyomas.*

**Tab. 1. Aktywność katepsyny D w homogenatach tkanek i w surowicy krwi kobiet z mięśniakami macicy oraz w homogenatach odpowiednich tkanek prawidłowych mięśnia macicy i surowicy krwi kobiet zdrowych**

**Table. 1. Cathepsin D activity in tissue homogenates and in the serum of uterine leiomyoma patients as well as in the homogenates of the same healthy tissue of uterine muscle and in the serum of healthy controls**

Badany materiał	Aktywność katepsyny D, nM Tyr/ml/2 godz.		
	$\bar{X}$	SD/±/	$p$
homogenat mięśniaków macicy	151,5 (104–227)	36,2	<0,001
homogenat zdrowej tkanki mięśnia macicy	80,8 (58–115)	17,8	—
surowica krwi kobiet z mięśniakami macicy	40,5 (26–70)	13,5	<0,001
surowica krwi kobiet zdrowych	26,5 (15–54)	11,8	—

Aktywność katepsyny D, zarówno w homogenatach badanych tkanek, jak i w surowicy krwi, badano metodą Folina-Ciocalteu w modyfikacji miedziowej [9] i wyrażono ją ilością uwolnionej tyrozyny w nM Tyr/ml/2 godz. Analizę statystyczną wykonano testem Manna-Whitneya.

## WYNIKI

Wyniki badania aktywności katepsyny D w homogenatach mięśniaków macicy i zdrowych tkanek mięśnia macicy oraz w surowicy krwi przedstawia tab. 1. Z przeprowadzonych badań wynika, że aktywność katepsyny D, mierzona przyrostem tyrozyny, w homogenatach mięśniaków macicy wynosiła od 104 do 227 nM Tyr/ml/2 godz. (średnio 151,5±36,2 nM Tyr/ml/2 godz.), a w homogenatach zdrowej tkanki mięśnia macicy od 58 do 115 nM Tyr/ml/2 godz. (średnio 80,8±17,8 nM Tyr/ml/2 godz.). Aktywność badanego enzymu w surowicy krwi kobiet z mięśniakami macicy wyniosła od 26 do 70 nM Tyr/ml/2 godz. (średnio 40,5±13,5 nM Tyr/ml/2 godz.), a w surowicy krwi kobiet zdrowych od 15 do 54 nM Tyr/ml/2 godz. (średnio 26,5±11,8 nM Tyr/ml/2 godz.). Różnice w aktywności katepsyny D między grupami badanymi a odpowiednimi grupami kontrolnymi są istotne statystycznie ( $p < 0,001$ ).

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzone badania wskazują, że w przypadkach mięśniaków

macicy aktywność katepsyny D, zarówno w homogenatach badanych tkanek nowotworowych, jak i w surowicy krwi, przewyższa w sposób znamieny statystycznie aktywność enzymu, w odpowiednim materiale kontrolnym. Aktywność katepsyny D w tkankach i w surowicy krwi chorych z mięśniakami macicy jest prawie 2-krotnie wyższa niż w odpowiednich tkankach prawidłowych i w surowicy krwi kobiet zdrowych.

Literaturowe dane eksperymentalne świadczą o udziale enzymów proteolitycznych w rozroście tkanek nowotworowych [10]. Sylven i Boiss-Svensson [11] wyrażają pogląd, że nowotwory bardziej złośliwe charakteryzują się wyższą aktywnością kwaśnych proteaz niż nowotwory łagodne. Zaobserwowano wysoką aktywność katepsyny D u kobiet z rakiem sutka [5], rakiem jajnika [6], rakiem endometrium, rakiem szyjki macicy [7] oraz w innych nowotworach [8, 12]. Wyższa aktywność wewnątrzkomórkowych proteaz w tkankach nowotworowych niż w tkankach, z których się one wywodzą, może nasuwać przypuszczenie o przyspieszonym katabolizmie białek nowotworowych [3]. Chen i wsp. [13] uważają, że zarówno w stanach fizjologicznych, jak i w patologicznych, w tym również w powstawaniu przerzutów nowotworowych, proteolityczne procesy degradacyjne zachodzą w miejscach, gdzie powierzchnia komórki kontaktuje się z macierzą międzykomórkową.

Na aktywność proteolityczną katepsyny D wpływ może mieć wiele czynników, takich jak wewnętrzny pH, produkty metabolizmu, hormony, czynniki wzrostu oraz inhibitory [14]. Nie można wykluczyć, że stwierdzona wyższa aktywność katepsyny D w homogenatach mięśniaków macicy, niż w homogenatach tkanki prawidłowej, spowodowana jest jednym z wymienionych czynników, który w czasie wzrostu mięśniaka macicy może wpływać na aktywność tego enzymu.

Jak wynika z przeprowadzonych badań, różnica między aktywnością katepsyny D w surowicy krwi kobiet z mięśniakami macicy, a jej aktywnością w surowicy osób zdrowych jest mniejsza niż w przypadku tkanek nowotworowych. Być może stwierdzenie mniejszego wzrostu aktywności katepsyny D w surowicy krwi jest spowodowane maskowaniem jej przez inhibitory lub inne czynniki [8].

Przypuszcza się, że wydzielana w nadmiarze przez komórki nowotworowe katepsyna D może aktywować proenzymy innych proteaz, uruchamiając kaskadę proteolityczną, która przyczynia się do inwazji procesu nowotworowego i tworzenia przerzutów [2].

Uzyskane wyniki badania sugerują, że oznaczanie aktywności katepsyny D w przypadkach mięśniaków macicy może być wykorzystane w diagnostyce ginekologicznej.

## WNIOSKI

1. Aktywność katepsyny D w homogenatach mięśniaków macicy jest znacznie wyższa niż w homogenatach zdrowej tkanki mięśniowej macicy.
2. Aktywność katepsyny D w surowicy kobiet z mięśniakami macicy przewyższa aktywność tego enzymu w surowicy krwi kobiet zdrowych.
3. Oznaczanie aktywności katepsyny D w przypadkach mięśniaków macicy może być wykorzystane do celów diagnostycznych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Worowski K, Ostrowska H. *Katepsyna D*. Post Biol Kom 1980; 7: 119-47.
2. Tomaszewski JJ, Tomaszewski T. *Enzymy lityczne w proliferacji nowotworowej*. Diagn Lab 1991; 27: 56-62.
3. Briozzo P, Morisset M, Capony F, et al. *In vitro degradation of extracellular matrix with Mr 52,000 cathepsin D secreted by breast cancer cells*. Cancer Res 1988; 48: 3688-92.
4. Watanabe M, Higashi T, Watanabe A, et al. *Cathepsin B and L activities in gastric cancer tissue: correlation with histological findings*. Biochem Med Metabol Biol 1989; 42: 21-9.
5. Bevilacqua P, Boracchi P, Gasparini G. *Prognostic indicators for early stage breast carcinoma. Part II: Value cathepsin D expression, detected by immunocytochemistry. A multiparametric study*. Int J Oncol 1994; 5: 559-601.
6. 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.
7. Scambia G, Benedetti Panici P, Ferrandina G, et al. *Significance of cathepsin-D expression in uterine tumours*. Eur J Cancer 1995; 31: 1449-54.
8. Kiluk M, Skrzydlewski Z, Kiluk A i wsp. *Aktywność katepsyny D w niektórych nowotworach przewodu pokarmowego*. Pol Merkuriusz Lek 1997; 11: 307-8.
9. Barret AJ. *Proteinases in mammalian cells and tissues*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford 1977: 46-135.
10. Mylonas I, Makovitzky J, Richter DU, i wsp. *Cathepsin D expression in normal, hyperplastic and malignant endometrial tissue: an immunohistochemical analysis*. Acta Histochem 2003; 105: 245-252.
11. Sylven B, Bois-Svensson J. *On the chemical pathology of intestinal fluid. Proteolytic activities in transplanted mouse tumors*. Cancer Res 1965; 25: 458-68.
12. Droller MJ. *Expression of cathepsin D in urothelial carcinoma of the urinary bladder: an immunohistochemical study including correlations with extracellular matrix components, CD 44, p53, Rb, c-erb B-2 and the proliferation indices*. J Uro 2003; 170: 671-672.
13. Chen WT, Olden K, Bernard BA, et al. *Expression of transformation-associated protease (s) that degrade*

*fibronectin at cell contact sites*. J Cell Biol 1984; 98: 1546-55.

14. Leto G, Gebbia N, Rausa L, et al. *Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic disease*. Anticancer Res 1982; 12: 235-48.

## ADRES DO KORESPONDENCJI

dr med. **Kamil Michałak**  
 SP WSZ Białystok  
 Oddział Położnictwa  
 15-089 Białystok  
 ul. Warszawska 15  
 e-mail: stanlek54m@wp.pl