

Katepsyna D [EC 3.4.23.5] jest proteinazą aspartylową. Jest jednym z enzymów kaskady proteolitycznej zaangażowanej w inwazję nowotworową i tworzenie przerzutów. Jej obecność stwierdzono zarówno w tkankach prawidłowych, jak i nowotworowych. Katepsyna D uczestniczy w penetracji guza w tkankach, migracji komórek nowotworowych i ich umiejscowieniu w ogniskach przerzutowych. Przeprowadzone badania miały na celu ocenę przydatności diagnostycznej oznaczania aktywności katepsyny D u chorych na gruczolakoraka jelita grubego. Badanie przeprowadzono w surowicy krwi i moczu 9 chorych, w wieku od 56 do 81 lat, z rozpoznaniem histopatologicznie rakiem jelita grubego (*adenocarcinoma*), leczonych w I Klinice Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej AM w Białymstoku, oraz 6 osób zdrowych w wieku od 28 do 40 lat, stanowiących grupę kontrolną.

Aktywność katepsyny D oznaczano metodą Folina-Ciocalteu w modyfikacji miedziowej i wyrażano ją w surowicy krwi w nmol Tyr/ml/6 godz., a w moczu w nmol Tyr/mg białka/6 godz. Stężenie białka w moczu oznaczano metodą Lowry, a wyniki wyrażano w mg/ml.

Aktywność katepsyny D w surowicy krwi chorych na raka jelita grubego była istotnie (o ponad półtora raza) wyższa od aktywności tego enzymu u osób zdrowych ($p < 0,003$). Wyniki badań moczu wskazywały na obniżenie aktywności katepsyny D w gruczolakoraku jelita grubego w porównaniu z osobami zdrowymi. Brak jest natomiast istotnych statystycznie różnic zarówno aktywności katepsyny D ($p = 0,426$), jak i stężenia białka ($p = 0,139$) w moczu chorych na gruczolakoraka jelita grubego, a grupą osób zdrowych.

Wyniki sugerują możliwość wykorzystania aktywności katepsyny D w surowicy krwi jako markera gruczolakoraka jelita grubego.

Słowa kluczowe: rak, jelito grube, katepsyna D, surowica krwi, mocz.

Aktywność katepsyny D w surowicy krwi i moczu chorych na raka jelita grubego

Cathepsin D activity in the blood serum and urine in patients with colonic adenocarcinoma

Stawomir Dariusz Szajda¹, Wiesława Roszkowska-Jakimiec²,
Jadwiga Snarska³, Krzysztof Zwierz¹

¹Zakład Biochemii Farmaceutycznej,

²Zakład Analizy Instrumentalnej,

³I Klinika Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku

Wstęp

Katepsyna D [EC 3.4.23.5] jest proteinazą aspartylową, która występuje w lizosomach oraz w połączeniach z błonami w erytrocytach i endosomach makrofagów [1, 2]. Aktywność katepsyny D jest regulowana przez wewnętrzkomórkowe pH, produkty metabolizmu, hormony, czynniki wzrostu i inhibitory [3]. Katepsyna D współuczestniczy w powstaniu stanów zapalnych, niedokrwienia mięśnia sercowego, chorób wątroby, dystrofii mięśniowej i stwardnienia rozsianego [3–5]. Wzrost ekspresji tej proteazy zaobserwowano także w chorobie nowotworowej [6–10].

Celem niniejszej pracy jest ocena przydatności diagnostycznej oznaczania aktywności katepsyny D w surowicy krwi i moczu chorych na gruczolakoraka jelita grubego.

Materiał i metody

Materiał do badań pobierano, przed wdrożeniem chemioterapii oraz radioterapii, w I Klinice Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej AM w Białymstoku, od 9 chorych (6 kobiet i 3 mężczyzn) w wieku 56–81 lat (średnia wieku $71 \pm 9,1$ lat) z rozpoznaniem histopatologicznie gruczolakorakiem (*adenocarcinoma*) jelita grubego ze stopniem złośliwości G2, w stopniu zaawansowania pT2 stwierdzonym u 3 chorych, a pT3 u 6 chorych. Grupę kontrolną stanowiło 6 osób zdrowych (3 kobiety i 3 mężczyzn) w wieku 28–40 lat (średnia wieku $36 \pm 5,2$ lat). Krew pobierano w godzinach rannych z żyły łokciowej od pacjentów będących na czczo, do probówki bez antykoagulantu i odstawiano na godzinę w temperaturze pokojowej do skrzepnięcia. Surowicę otrzymano przez odwirowanie krwi po skrzepnięciu ($4000 \times g$ w ciągu 10 min). Mocz do badań otrzymano z środkowego strumienia rannej porcji i odwirowano ($4000 \times g$ w ciągu 10 min).

Aktywność katepsyny D oznaczano w surowicy krwi i moczu. Substratem była 6-% hemoglobina denaturowana kwasem solnym. Reakcję przeprowadzono w pH 3,5, temp. 37°C, w ciągu 6 godz., a następnie ją hamowano 10-% roztworem kwasu trichlorooctowego (TCA). Miarą aktywności katepsyny D była ilość uwolnionej tyrozyny kwasorozpuszczalnej oznaczanej metodą Folina-Ciocalteu w modyfikacji miedziowej [11].

Stężenie białka w moczu oznaczano metodą Lowry i wsp. [12] i odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej z 0,03% liofilizowanej albuminy wołowej firmy POCH Gliwice, Polska.

Oceny statystycznej wyników dokonano testem Manna-Whitneya. Za poziom istotności statystycznej różnic przyjęto $p < 0,05$.

Cathepsin D [EC 3.4.23.5] is an aspartyl proteinase, which is one of the enzymes of the proteolytic cascade involved in cancerous invasion and formation of metastases. It has been found in both normal and cancerous tissues. Cathepsin D takes part in the penetration of a cancerous tumour in the tissues, migration of the neoplastic cells and their location in the metastatic foci.

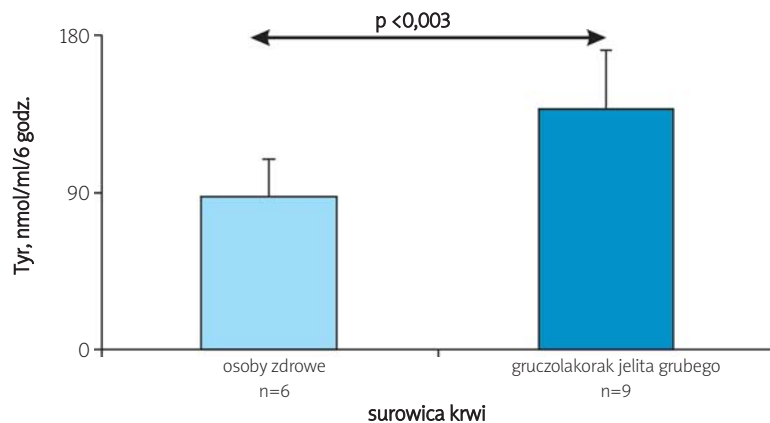
The aim of the study was to evaluate a diagnostic value of determination of cathepsin D activity in patients with colonic adenocarcinoma.

The study was carried out on samples of the blood serum and urine of 9 patients treated in the First Department of General and Endocrinological Surgery of the Medical University of Białystok, aged 56 to 81 years with histologically diagnosed colonic adenocarcinoma, and of 6 healthy individuals aged from 28 to 40 years constituting controls.

Cathepsin D activity was assessed by the Folin-Ciocalteu method in the cupric modification and expressed in nmol Tyr/ml/6 h in the blood serum, and in nmol Tyr/mg of protein/6h in the urine. Protein concentration was determined by Lowry's method and the results were expressed in mg/ml.

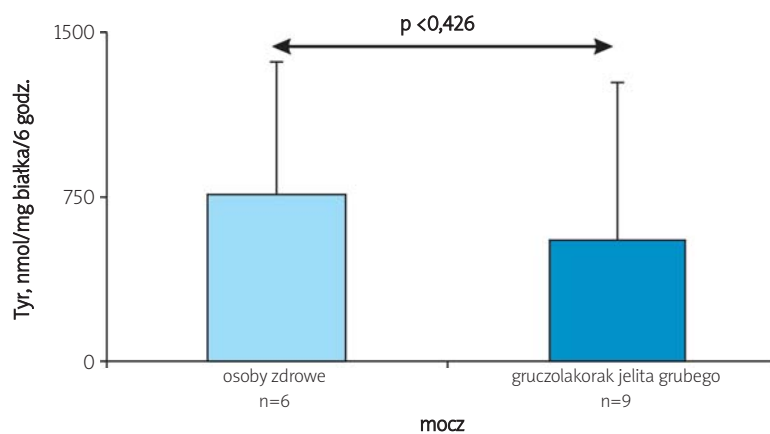
Cathepsin D activity was significantly higher (1.5 – fold) in the blood serum of patients with colonic adenocarcinoma than in controls ($p < 0.003$). However, it was decreased in the urine of patients with colonic adenocarcinoma in comparison with healthy people. No statistically significant differences were found in cathepsin D activity ($p = 0.426$) or protein concentration ($p = 0.139$) in the urine of patients with colonic adenocarcinoma compared to controls. The results suggest that cathepsin D activity can be used as a marker of colonic adenocarcinoma.

Key words: cancer, colon, cathepsin D, blood serum, urine.



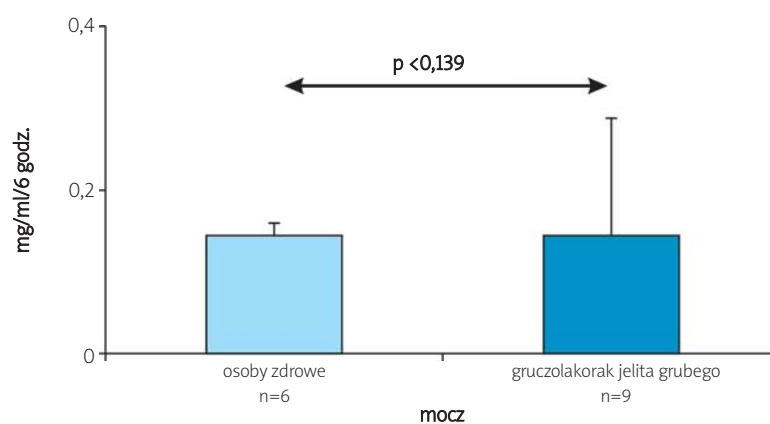
Ryc. 1. Aktywność katepsyny D w surowicy krwi osób zdrowych oraz chorych na gruczolakoraka jelita grubego

Fig. 1. Cathepsin D activity in the blood serum of healthy people and patients with colonic adenocarcinoma



Ryc. 2. Aktywność katepsyny D w moczu osób zdrowych oraz chorych na gruczolakoraka jelita grubego

Fig. 2. Cathepsin D activity in the urine of healthy people and patients with colonic adenocarcinoma



Ryc. 3. Stężenie białka w moczu osób zdrowych oraz chorych na gruczolakoraka jelita grubego

Fig. 3. Protein concentration in the urine of healthy people and patients with colonic adenocarcinoma

Wyniki

Aktywność katepsyny D w surowicy krwi chorych na gruczolakoraka jelita grubego wynosiła $138,04 \pm 32,91$ nmol/ml/6 godz. i była istotnie statystycznie wyższa ($p < 0,003$) w porównaniu z aktywnością katepsyny D w surowicy krwi osób zdrowych $87,07 \pm 21,53$ nmol/ml/6 godz. (ryc. 1). Brak istotnych statystycznie różnic ($p = 0,426$) stwierdzono w badaniu aktywności katepsyny D w moczu, która w gruczolakoraku jelita grubego wynosiła $268,25 \pm 224,86$ nmol/mg białka/6 godz., a u osób zdrowych $407,77 \pm 315,88$ nmol/mg białka/6 godz. (ryc. 2.) oraz między stężeniem białka w moczu ($p = 0,139$) chorych na gruczolakoraka jelita grubego ($0,144 \pm 0,144$ mg/ml) i osób zdrowych ($0,144 \pm 0,016$ nmol/mg białka/6 godz.) (ryc. 3.).

Omówienie wyników

Komórki nowotworowe charakteryzują się niekontrolowaną proliferacją [13]. Proteazy lizosomalne, w tym katepsyna D, pochodzące z komórek proliferujących nowotworu, biorą udział w degradacji elementów tkanki łącznej otaczających komórki. Proteazy uczestniczą w penetracji guza w tkankach, migracji komórek nowotworowych i ich umiejscowieniu w ogniskach przerzutowych [4]. Obecność katepsyny D stwierdzono zarówno w tkankach prawidłowych, jak i w nowotworowych [9, 10, 14]. Dotychczasowe badania pozwalają na stwierdzenie, że aktywność katepsyny D w surowicy krwi zależy od lokalizacji narządowej nowotworu. Obserwowany jest istotny statystycznie wzrost aktywności katepsyny D w surowicy krwi chorych z powierzchniowym rakiem pęcherza moczowego w porównaniu z aktywnością tego enzymu w surowicy krwi osób zdrowych. Stwierdzono zależność między aktywnością katepsyny D a typem histologicznym, stopniem złośliwości oraz stopniem klinicznego zaawansowania powierzchniowego raka pęcherza moczowego [8]. Istotnych statystycznie różnic nie stwierdzono natomiast w aktywności katepsyny D w surowicy krwi u chorych z rakiem przetyku [6] i rakiem trzustki [7], gdzie ekspresja badanego enzymu u chorych na nowotwory była zbliżona do wartości prawidłowych.

Z uzyskanych danych eksperymentalnych wynika, że aktywność katepsyny D w surowicy krwi chorych na gruczolakoraka jelita grubego jest ponad półtora razy wyższa od aktywności katepsyny D w surowicy krwi osób zdrowych. Aktywność katepsyny D w moczu chorych na gruczolakoraka jelita grubego wskazuje na obniżenie aktywności tego enzymu u chorych z gruczolakorakiem jelita grubego w porównaniu z aktywnością w moczu osób zdrowych. Brak jest jednak istotnych statystycznie różnic w aktywności katepsyny D między porównywanymi grupami.

Z dotychczasowych doniesień wynika, że badanie w surowicy krwi aktywności katepsyny D może znaleźć zastosowanie w rozpoznaniu gruczolakoraka jelita grubego oraz powierzchniowego raka pęcherza moczowego.

Wniosek

1. Gruczolakorak jelita grubego wykazuje podwyższenie aktywności katepsyny D w surowicy krwi.

Piśmiennictwo

1. Worowski K, Ostrowska H. Katepsyna D. *Post Biol Kom* 1980; 7: 119-1947.
2. Diment S, Leech MS, Stahl PD. Cathepsin D is membrane-associated in macrophage endosomes. *J Biol Chem* 1988; 263: 6901-7.
3. Leto G, Gebbia N, Rausa L, Tumminello FM. Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases (review). *Anticancer Res* 1992; 12: 235-40.
4. Tomaszewski JJ, Tomaszewski T. Enzymy lityczne w proliferacji nowotworowej. *Diagn Lab* 1991; 27: 56-62.
5. Bever CT Jr, Morgan KD, Whitaker JN. Cathepsin D activity in human peripheral blood mononuclear leukocytes. *Inflammation* 1989; 13: 309-16.
6. Szajda SD, Kiluk M, Wiśniewski R, Skrzydlewski Z. Wartość diagnostyczna markerów nowotworowych: CEA, AFP, katepsyny D i prokoagulantu nowotworowego (CP) w przypadkach raka ptuca i przetyku. *Współcz Onkol* 2002; 6: 9-11.
7. Szajda SD, Snarska J, Chlabicz M, Mroczo B, Skrzydlewski Z. Ocena przydatności badania niektórych markerów nowotworowych w diagnostyce raka trzustki. *Współcz Onkol* 2004; 8: 338-41.
8. Szajda SD, Darewicz B, Kudelski J, Chlabicz M, Domel T, Chabielska E, Skrzydlewski Z. Aktywność nowotworowego prokoagulantu i katepsyny D w surowicy chorych na raka pęcherza moczowego. *Pol Merk Lek* 2005; 18: 651-3.
9. Szajda SD, Jankowski M, Zalewska B, Kożuszko B, Gabrylewski W, Skrzydlewski Z. Aktywność prokoagulantu nowotworowego i katepsyny D w przypadkach raka sutka. *Współcz Onkol* 2004; 8: 132-5.
10. Szajda SD, Zalewska B, Michalak K, Skrzydlewski Z. Aktywność katepsyny D u kobiet w przypadkach mięśniaków macicy. *Współcz Onkol* 2004; 8: 266-8.
11. Barrett AJ. Cathepsin D and other carboxylproteinases. In: Barrett AJ (ed). *Proteinases in mammalian cells and tissues*. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford 1977; 240-3.
12. Kokot F. *Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice*. PZWL, Warszawa 1969; 130.
13. Rubin E, Faber JL. Neoplasia. In: *Pathology*. Rubin E, Faber JL (red.). Wyd. JB Lippincott Company, Philadelphia 1994.
14. von Ardenne M. Lysosomal enzymes in pericellular environment: a factor in tumor regression. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51: 313-14.

Adres do korespondencji

dr med. **Stawomir D. Szajda**
Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Akademia Medyczna
ul. Mickiewicza 2
15-230 Białystok 8
tel. +48 85 748 56 90, +48 85 748 56 91
e-mail: spoak@amb.edu.pl