Współczesna Onkologia (2006) vol. 10; 10 (502–505)

Aktywność izoenzymów A i B N-acetylo-β-heksozoaminidazy w tkance raka nerki

Activity of isoenzymes A and B of N-acetyl-β-glucosaminidase in renal cancer tissue

Małgorzata Borzym-Kluczyk[1], Ewa Olszewska[1], Sławomir Dariusz Szajda[1], Małgorzata Knaś[1], Barbara Darewicz[2], Krzysztof Zwierz[1]

[1]Zakład Biochemii Farmaceutycznej, [2]Klinika Urologii, Akademia Medyczna w Białymstoku

W Polsce rak nerki stanowi 3–4% wszystkich nowotworów złośliwych. W niszczeniu tkanki nerkowej przez nowotwór biorą udział między innymi lizosomalne glikozydazy, które degradują łańcuchy oligosacharydowe glikokoniugatów (glikoprotein, proteoglikanów i glikolipidów). N-acetylo-β-D-heksozoaminidaza (E.C.3.2.1.52) (HEX) jest kwaśną egzoglikozydazą lizosomalną odszczepiającą reszty N-acetyloglukozoaminy (GlcNAc) lub N-acetylogalaktozoaminy (GalNAc) z nieredukującego końca łańcuchów oligosacharydowych glikokoniugatów. HEX jest glikoproteiną zbudowaną z łańcuchów polipeptydowych α i β. Łańcuchy te występują parami, w trzech możliwych kombinacjach. Wyróżnia się, zatem trzy izoenzymy HEX: izoenzym A-αβ, izoenzym B-ββ oraz izoenzym S-αα. W tkankach najwyższą aktywność wykazują izoenzymy A i B, jednak stosunek ilościowy izoenzymów A/B w każdej z tkanek jest różny. W naturalnych oligosacharydach HEX hydrolizuje wiązania β-glikozydowe N-acetyloheksozoamin z innymi cukrami. Enzym ten również działa na drobnocząsteczkowe sztuczne substraty, takie jak pochodne p-nitrofenolu i metyloumbelliferonu. Do wykrywania aktywności izoenzymów A i B z guza nerki i tkanki otaczającej guza w żelach poliakryloamidowych po izoelektroogniskowaniu wykorzystaliśmy α-naphtyl-AS-BI-N-acetyl-β-glucosaminide jako substrat. Elektroogniskowanie jest metodą rozdziału elektroforetycznego białek, która wykorzystuje wędrówkę cząstek w gradiencie pH wytworzonym po przyłożeniu pola elektrycznego do mieszaniny amfolitów wprowadzonej do żelu poliakryloamidowego.
Celem pracy było oznaczenie ilościowe aktywności izoenzymów N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy dwiema metodami: kolorymetryczną i elektroforetyczną, przy użyciu dwóch różnych substratów. Materiał badany stanowiły fragmenty nerek, pobrane podczas operacji od 30 pacjentów obu płci, z rozpoznanym rakiem nerki.
Wyniki: W tkance nerkowej, zarówno zdrowej, jak i nowotworowej, znamiennie wyższą aktywność specyficzną oznaczaną obydwoma metodami miał izoenzym A N-acetylo-β-heksozoaminidazy, w porównaniu ze specyficzną aktywnością izoenzymu B.
Wnioski: Oznaczanie aktywności izoenzymów HEX metodą kolorymetryczną może być uznane za cenny marker diagnostyczny chorób nerek, gdyż daje wyniki zgodne z technicznie trudniejszą i bardziej kosztowną metodą opartą na elektroogniskowaniu.

Słowa kluczowe: rak nerki, izoenzymy A i B N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy, izoelektroogniskowanie, metoda kolorymetryczna.

Wstęp

W Polsce rak nerki występuje głównie u osób dorosłych i stanowi 3–4% wszystkich wykrywanych nowotworów złośliwych. Pomimo wprowadzenia w ostatnich latach wielu nowych metod diagnostycznych, rozwijający się skrycie rak nerki rozpoznawany jest najczęściej w zaawansowanym stadium chorobowym, w którym stwierdza się naciekania okolicznych tkanek oraz zmiany przerzutowe. Rokowanie jest wtedy zazwyczaj niepomyślne. Z chwilą pojawienia się nacieków jedynym skutecznym sposobem usunięcia nowotworu jest zabieg chirurgiczny [1].

Większość guzów nerki pochodzi z komórek nabłonkowych proksymalnych cewek krętych, które posiadają wysoką aktywność N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy i jej izoenzymów (HEX A i HEX B). N-acetylo-β-D-heksozoaminidaza jest glikoproteiną zbudowaną z łańcuchów polipeptydowych α i β. Masa cząsteczkowa izoenzymu A waha się w granicach 96–110 kDa w zależności od tkanki, z której został wyizolowany. Izoenzym B posiada masę cząsteczkową 100–112 kDa [2]. Izoenzymy HEX są obecne w różnych tkankach i płynach ustrojowych [3–5]. Na podstawie wirowania różnicowego kanalików i kłębków stwierdzono, że aktywność HEX w kanalikach nerkowych jest ponadtrzykrotnie wyższa niż w kłębkach. W rdzeniu i korze nerki wykazano obecność izoenzymów A i B z wyraźną przewagą frakcji A [6–8]. W warunkach prawidłowych tylko niewielkie ilości HEX mogą przeniknąć do moczu. HEX jest uwalniana z lizosomów bez naruszania błony plazmatycznej na drodze sekrecji i egzocytozy [3, 9].

Izoenzymy HEX można oznaczać kolorymetrycznie po denaturacji cieplnej izoenzymu A, używając jako substratów połączeń N-acetyloglukozoaminy z p-nitrofenolem [10] lub metyloumbelliferonem [11]. Jest to metoda prosta, ale nie daje pewności, że w zastosowanych warunkach nie ulega denaturacji również izoenzym B, co mogłoby wpływać na wynik analizy. Aby sprawdzić, na ile wiarygodna jest metoda kolorymetryczna oznaczania izoenzymów A i B N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy w tkance raka nerki i makroskopowo niezmienionej tkance nerkowej, postanowiliśmy równolegle do oznaczeń kolorymetrycznych zastosować ocenę aktywności HEX A i HEX B po rozdziale za pomocą elektroogniskowania w płaskich żelach poliakryloamidowych.

Materiał badany i metody

Materiał stanowiły fragmenty zdrowej tkanki nerkowej makroskopowo prawidłowej (Z) n=30 i fragmenty guza nowotworowego (N) n=30 pobrane od pacjentów obu płci, z rozpoznanym rakiem nerki, podczas zabiegów operacyjnych przeprowadzonych w Klinice Urologii Samodzielnego Publicznego Szpitala Kli-

In Poland, renal cancer makes up 3-4% of all malignant tumours. Lysosomal glycosidases take part in renal tissue destruction. The exoglycosidases degrade the oligosaccharide chains of glycoconjugates (glycoproteins, proteoglycans and glycolipids).
N-acetyl-β-glucosaminidase (E.C.3.2.1.52) (HEX) is an acid lysosomal exoglycosidase which releases N-acetylglucosamine (GlcNAc) and N-acetylgalactosamine (GalNAc) residues from the non-reducing ends of oligosaccharide chains of glycoconjugates (glycoproteins, glycolipids, proteoglycans). HEX is a glycoprotein composed of two polypeptide chains α and β. The chains are present in pairs in three possible combinations: isoenzyme A-αβ, isoenzyme B-ββ and isoenzyme S-αα. Isoenzymes A and B demonstrate the highest activity in the tissues; however, the ratio of isoenzymes A/B is different in various tissues. In the natural oligosaccharides, HEX hydrolyzes the β glycoside bond of N-acetylhexosamine with other sugars. The enzyme reacts with artificial substrates such as derivatives of hexosamines with p-nitrophenol and umbelliferone. To determine the activity of isoenzymes A and B in renal tumour and neighbouring macroscopically normal renal tissue in polyacrylamide gel after isoelectrofocusing, we used α-naphtyl-AS--BI-N-acetyl-β-glucosaminide as a substrate. Electrofocusing is an electrophoretic method of protein separation in polyacrylamide gel which uses the migration of molecules in a pH gradient that is formed after applying an electric field to an ampholyte mixture.
The aim of the study was quantitative determination of N-acetyl-β-D hexosaminidase isoenzymes activity by using two methods: colorimetric and electrophoretic and two different substrates.
Materials: Renal specimens harvested from 30 patients during surgery due to renal cancer were used for the study.
Results: In cancerous and normal human renal tissues, isoenzyme A of N-acetyl-β-D hexosaminidase showed statistically higher specific activity, in comparison to isoenzyme B, after determination of both isoenzymes by two different methods.
Conclusion: Determination of HEX isoenzyme activity using the colorimetric method may be considered as a valuable diagnostic marker in renal diseases. The results of HEX isoenzyme activity determination by colorimetric and electrophoretic method are compatible, although for routine determinations the colorimetric method is recommended as the electrofocusing is more technically difficult and more expensive than the colorimetric one.

Key words: renal cancer, isoenzymes A and B, N-acetyl-β-hexosaminidase, isoelectrofocusing, colorimetric method.

nicznego AM w Białymstoku. Usunięte nerki z guzem nowotworowym przecinano tak, aby płaszczyzna przekroju przechodziła przez środek guza i oś długą nerki. Pobrane wycinki o wymiarach (2 x 2 x 2 cm) z guza nowotworowego i tkanki zdrowej (makroskopowo prawidłowej) przemywano roztworem soli fizjologicznej, osuszano bibułą i przechowywano w -70°C, do czasu wykonywania badań biochemicznych. Pozostałą część preparatu bezpośrednio po operacji umieszczono w 10% roztworze formaliny i przesyłano do Zakładu Patomorfologii Lekarskiej Akademii Medycznej w Białymstoku. Badania biochemiczne przeprowadzono w Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Białymstoku, po ustaleniu rozpoznania przez patomorfologów.

Przygotowanie tkanki do badań biochemicznych

Około 0,5 g tkanki rozmrożono, ważono i zawieszono w 0,1 M buforze cytrynianowym pH 4,3 w stosunku 1:9 (w/v) i homogenizowano homogenizatorem nożowym przez 2 min. Homogenaty wirowano przez 30 min przy 12 000 x g w temperaturze 4°C.

Do dalszych badań zachowano płyn nadosadowy, który przechowywano w temperaturze -20°C.

Oznaczenie aktywności całkowitej HEX oraz izoenzymów A i B

Kolorymetryczne oznaczanie aktywności całkowitej N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy (HEX) i jej izoenzymów A i B przeprowadzono metodą Chatterjee i wsp. [12] w modyfikacji Zwierza i wsp. [10].

Izolację z tkanki nerki, izoelektroogniskowanie oraz ocenę aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy i jej izoenzymów w żelach poliakryloamidowych przeprowadzono wg Hayase K [13] i Hayashi M [14], w naszej modyfikacji zastosowanej do rozdziału izoenzymów HEX z materiału pochodzącego z ludzkiego łożyska [15].

Aktywności izoenzymów A i B N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy oceniano densytometrycznie. Na podstawie wyników uzyskanych w postaci wykresów, dla każdego rozdziału izoelektroforetycznego wyliczono pole powierzchni pod krzywą dla aktywności N-acetylo-β-D-heksozoaminidazy i procentowy udział izoenzymów. Po rozdziale izoelektroforetycznym materiału z guza nerki i otaczającej tkanki makroskopowo niezmienionej, aktywności izoenzymów HEX w żelach poliakryloamidowych analizowano metodą statystyczną.

Wartości oznaczeń w poszczególnych grupach osób badanych przedstawiono jako wartości średnie. Analizy statystycznej wyników dokonano na podstawie statystyk nieparametrycznych testem kolejności par Wilcoxona. Przyjęto $p<0,05$ jako istotne statystycznie.

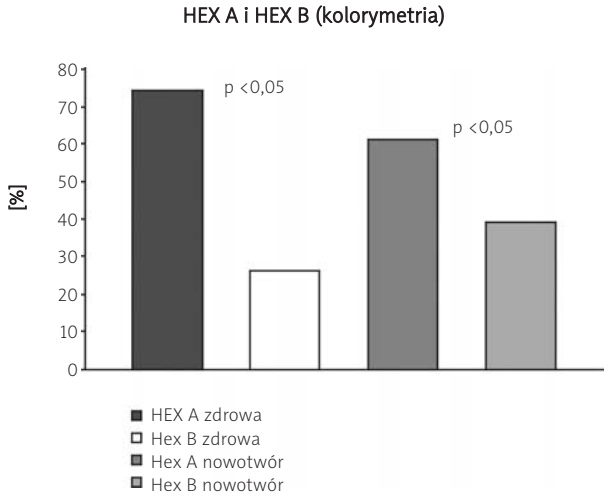
Wyniki

Wyniki przedstawiono na ryc. 1–3.

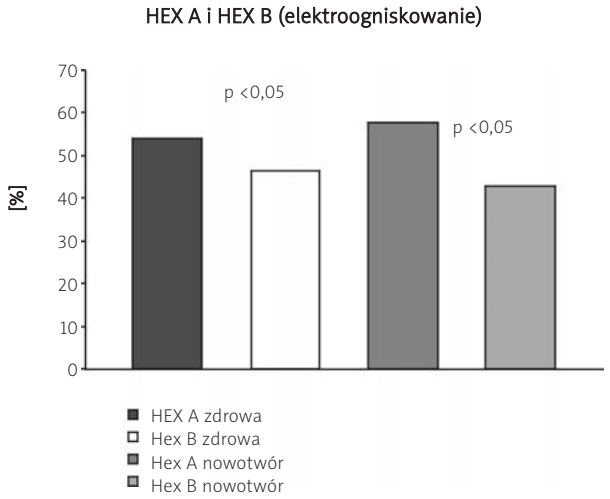
Omówienie wyników

Od wielu lat wysiłki badaczy koncentrują się na poszukiwaniu dodatkowych biochemicznych wykładników, które pozwoliłyby na wcześniejsze wykrycie nowotworu, ocenę jego zaawansowania i monitorowania skuteczności leczenia. Większość nowotworów nerki rozwija się z nabłonka kanalików nerkowych [16]. Rozwój nowotworu może prowadzić do zmian struktury i aktywności wielu enzymów. Spośród kilkudziesięciu enzymów produkowanych w nabłonku cewek proksymalnych tylko nieliczne znalazły zastosowanie diagnostyczne w ocenie uszkodzenia nerek. Enzymy te nie ulegają denaturacji w kwaśnym pH moczu. Wydalane są one w minimalnych ilościach do moczu ludzi zdrowych, natomiast w stanach patologicznych wydalanie to drastycznie wzrasta. Uznanym markerem dysfunkcji cewek proksymalnych jest N-acetylo-β-heksozoaminidaza i jej izoenzymy A i B.

W tkankach zdrowych i patologicznych spotyka się różne proporcje aktywności izoenzymów A do B N-acetylo-β-heksozoaminidazy. W tkance normal-



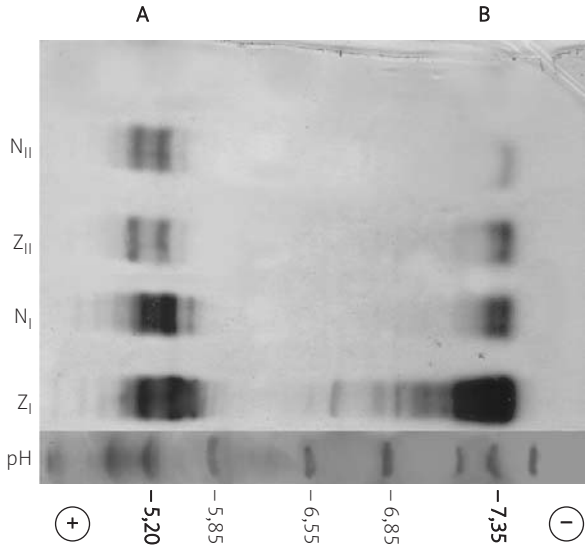
Ryc. 1. Udział procentowy izoenzymów A i B N-acetylo-β-heksozoaminidazy w tkance nerkowej nowotworowej (n=30) i makroskopowo niezmienionej (n=30), oznaczany metodą kolorymetryczną
Fig. 1. *Percentage of N-acetyl-β-hexosaminidase isoenzymes A and B in cancerous renal tissue (n=30) and macroscopically normal tissue (n=30) determined by colorimetric method*



Ryc. 3. Udział procentowy izoenzymów A i B N-acetylo-β-heksozoaminidazy w tkance nerkowej nowotworowej (n=30) i makroskopowo niezmienionej (n=30), oznaczany po izoelektroogniskowaniu
Fig. 3. *Percentage of N-acetyl-β-hexosaminidase isoenzymes A and B in cancerous renal tissue (n=30) and macroscopically normal tissue (n=30) determined by electrofocusing*

nego jajnika przeważa aktywność HEX-B (B/A= 1,13), a w nowotworach jajnika – izoenzym A (B/A=0,74) [17]. Aktywność izoenzymów HEX w guzach nerki jest dotychczas mało poznana. Izoenzym A jest wrażliwy na ogrzewanie i ulega inaktywacji po 3-godzinnym ogrzaniu w temp. 50°C w pH 5,0. Izoenzym B jest termostabilny [18]. Te cechy izoenzymów N-acetylo-β-heksozoaminidazy wykorzystano do różnicowego oznaczania aktywności izoenzymów A i B w mieszaninie.

Nasze wyniki, przedstawione na ryc. 1., wskazują na udział izoenzymów A i B w rozkładzie łańcuchów heterooligo- i heteropolisacharydowych białek i glikozoaminoglikanów w nerce zdrowej i nowotworowej. W tkance nerkowej zdrowej i nowotworowej znamiennie wyższą aktywność specyficzną (mie-



N – tkanka nowotworowa próba II
Z – tkanka zdrowa próba II
N – tkanka nowotworowa próba I
Z – tkanka zdrowa próba I
pH – wzorzec białek o określonym punkcie izoelektrycznym

Ryc. 2. Izoenzymy A i B HEX zdrowej i nowotworowej tkanki nerkowej, po elektroogniskowaniu na płaskim żelu poliakryloamidowym
Fig. 2. *HEX isoenzymes A and B in normal and cancerous renal tissues after electrofocusing on flat polyacrylamide gel*

rzoną przy pomocy pochodnych p-nitrofenolowych N-acetyloglukozoaminy) wykazał izoenzym A N-acetylo-β-heksozoaminidazy w porównaniu do izoenzymu B (p<0,05) (ryc. 1.).

Obecność izoenzymów A i B N-acetylo-β-heksozoaminidazy w zdrowej i nowotworowej tkance nerkowej potwierdziliśmy po rozdziale przy pomocy elektroogniskowania w płaskich żelach poliakryloamidowych (ryc. 2.). Rozdziały (wzory) ukazują dwie grupy prążków izoenzymów: jedne pochodzące z izoenzymu A, o maksimum aktywności w pH 5,20 (*Acid isoelectric point*), które migrują w pobliżu anody; drugie pochodzące z izoenzymu B, o maksimum aktywności w pH 7.35 (*Basic isoelectric point*), które migrują bliżej katody (ryc. 2.).

W wyniku analizy statystycznej aktywności izoenzymów HEX po rozdziale w płaskich żelach poliakrylamidowych po rozdziale metodą izoelektroogniskowania, wykazano istotnie wyższą aktywność izoenzymu A w porównaniu z aktywnością izoenzymu B zarówno w nerkowej tkance nowotworowej, jak i makroskopowo niezmienionej (ryc. 3.). Przewagę aktywności izoenzymu A N-acetylo-β-heksozoaminidazy nad B, opisali Dance w zdrowej nerce [4], Robinson w mózgu [19] i Robinson w śledzionie [20]. Stosunek aktywności izoA/B w guzie nerki oznaczany metodą kolorymetryczną wynosi 1,56, a w otaczającej guz makroskopowo prawidłowej tkance nerkowej 2,84 (ryc. 1.), natomiast po rozdziale przy pomocy elektroogniskowania w guzie nerki stosunek izoA/B wynosi 1,35, a w otaczającej guz makroskopowo zdrowej tkance 1,16 (ryc. 3.). Różnice między proporcją aktywności izoA/izo B w oznaczaniu kolorymetrycznym

i elektroforetycznym mogą wynikać z odmienności metodyki. W metodzie izoelektroogniskowania oba izoenzymy oznaczamy równocześnie po przeprowadzeniu kilkugodzinnego rozdziału elektroforetycznego. W czasie rozdziału elektroforetycznego część izoenzymu A może ulegać denaturacji, co ma wyraz w mniejszych różnicach aktywności izoenzymu A w stosunku do izoenzymu B oznaczanych po izoelektroogniskowaniu, w porównaniu do kolorymetrycznego oznaczania obu izoenzymów po denaturacji cieplnej, gdzie oznaczamy aktywność tylko izoenzymu B.

Przy oznaczaniu izoenzymów A i B N-acetylo-β-heksozoaminidazy w guzie nerki i makroskopowo zdrowej tkance otaczającej guz obu metodami, mimo różnic ilościowych obserwuje się tę samą główną tendencję, tzn. znamiennie wyższą aktywność izoenzymu A w porównaniu z aktywnością izoenzymu B.

Wnioski

Oznaczanie kolorymetryczne izoenzymów A i B N-acetylo-β-heksozoaminidazy jest metodą prostą, powtarzalną i dostępną. Izoelektroogniskowanie jest metodą dłuższą, trudną technicznie i wykorzystującą inny substrat. Zgodne wyniki obu tych metod sugerują, że metoda kolorymetryczna jest pewną metodą oznaczania aktywności izoenzymów HEX.

Piśmiennictwo

1. Borkowski A, Czaplicki M. Nowotwory i torbiele nerek. PZWL, Warszawa 2002.
2. Zwierz K, Juszkiewicz J, Arciuch LP, Gindzieński A. N-acetylo-β--D-heksozoaminidaza – enzym chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa. Post Biochem 1992; 38: 127-32.
3. Dance N, Price RG, Cattell WR, Lansdell J, Richards B. The excretion of N-acetyl-beta-glucosaminidase and beta-galactosidase by patients with renal disease. Clin Chim Acta 1970; 27: 87-92.
4. Dance N, Price RG, Robinson D. Differential assay of human hexosaminidase A and B. Biochim Biophys Acta 1970; 222: 662-4.
5. Zwierz K, Zalewska A, Zoch-Zwierz W. Isoenzymes of N-acetyl-β--hexosaminidase. Acta Bioch Pol 1999; 46: 739-751.
6. Hauser AC, Fabrizii V, Derfler K, Balcke P. Beta-N-acetylglucosaminidase (beta-NAG) as a parameter in the diagnosis and evaluation of primary glomerular and tubulointerstitial kidney diseases. Wien Klin Wochenschr Suppl 1991; 189: 13-16.
7. Morita A, Numata Y, Kosugi Y, Noto A, Takeuchi N, Uchida K. Stabilities of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) isoenzymes in urine: advantage of NAG isoenzyme B measurement in clinical applications. Clin Chim Acta 1998; 278: 35-43.
8. Rustom R, Costigan M, Shenkin A, Bone JM. Proteinuria and renal tubular damage: urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and isoenzymes in dissimilar renal disease. Am J Nephrol 1998; 18: 179-85.
9. Price RG, Dance N, Richards B, Cattell WR. The excretion of N-acetyl-β-glucosaminidase and β-galactosidase following surgery to the kidney. Clin Chim Acta 1970; 27: 65-72.
10. Zwierz K, Gindzieński A, Głowacka D, Porowski T. The degradation of glycoconjugates in the human gastric mucous membrane. Acta Med Acad Sci Hung 1981; 38: 145-52.
11. Shikhman AR, Brinson DC, Lotz M. Profile of glycosaminoglycan-degrading glycosidases and glycoside sulfatases secreted by human articular chondrocytes in homeostasis and inflammation. Arthritis Rheum 2000; 43: 1307-14.
12. Chatterjee S, Velicer LF, Sweeley CC. Glycosphingolipid glycosyl hydrolases and glycosidases of synchronized human KB cells. J Biol Chem 1975; 250: 4972-9.
13. Hayase K, Kritchevsky D. Separation and comparison of isoenzymes of N-acetyl-beta-D-hexosaminidase of pregnancy serum by polyacrylamide gel electrofocusing. Clin Chim Acta 1973; 46: 455-64.
14. Hayashi M. Histochemical demonstration of N-acetyl-β-glucosaminidase employing naphthol AS-BI N-acetyl-β-glucosaminidase as substrate. J Histochem Cytochem 1965; 13: 355-60.
15. Arciuch LP, Bielecki D, Borzym M, Południewski G, Arciszewski K, Różański A, Zwierz K. Isoenzymes of N-acetyl-beta-hexosaminidase in complicated pregnancy. Acta Biochim Polon 1999; 46: 977-83.
16. Pawlicki M. Nowotwory układu moczowo-płciowego. W: Krzakowski M. Onkologia kliniczna. Borgis 2001; 265-70.
17. Chatterjee SK, Chowdhury K, Bhattacharya M, Barlow JJ. Beta-hexosaminidase activities and isoenzymes in normal human ovary and ovarian adenocarcinoma. Cancer 1982; 49: 128-35.
18. Perez LF, Tutor JC. Assay of beta-N-acetylhexosaminidase isoenzymes in different biological specimens by means of determination of their activation energies. Clin Chem 1998; 44: 226-31.
19. Robinson D, Jordan TW, Horsburgh T. The N-Acetyl-β-D-hexosaminidases of calf and human brain. J Neurochem 1972; 19: 1975-85.
20. Robinson D, Stirling JL. N-acetyl-β-glucosaminidases in human spleen. Biochem J 1968; 107: 321-7.

Adres do korespondencji

dr med. Małgorzata Borzym-Kluczyk
Zakład Biochemii Farmaceutycznej
Akademia Medyczna
ul. Mickiewicza 2A
15-230 Białystok
tel. +48 85 748 56 89, +48 85 748 56 89
e-mail: gocha@amb.edu.pl