Archive of SID

بررسي ميزان فعاليت آنزيم كاتپسين D در بيماران مبتلا به سرطان پستان در مقايسه با افراد سالم

فخرالملوك رضوي (M.Sc.)*
بيژن فرازي(M.D.)**
ناصر ملك نيا(M.D.)**

چكيده

سابقه و هدف : سرطان پستان مهمترین عامل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در زنان بوده و حدود ۳۳ درصد کل سرطان‌ها در زنان را تشکیل می‌دهد. با توجه به این که بیش از یک‌سوم زنان مبتلا به سرطان پستان در مرحله پیشرفته این بیماری جهت درمان مراجعه می‌کنند، هدف از این بررسی تعیین روشی برای تشخیص سرطان پستان در مراحل اولیهٔ آن می‌باشد.

مواد و روش ها : در این پژوهش، ابتدا آنزیم خام کاتپسین D از لوکوسیت‌ها جدا شده و سپس باکروماتوگرافی تعویض یون با DEAE-۲۵ ، ابتدا اسید پروتئازها از بقیه آنزیم‌ها جدا شدند و سنجش میزان فعالیت آنزیم کاتپسین D و وجود بیشترین میزان فعالیت آنزیمی در ناحیه اسید پروتئازی،کروماتوگرافی حساس با سفادکس G-200 انجام شد. سپس با انطباق فراکسیون‌های محدوده پیک تک‌شارپ در ناحیه ۲۸۰ نانومتر با پیک تک‌آنزیمی و مشاهده باند تک به روی پلی‌اکریل آمید جداسازی آنزیم کامل گردید. این مراحل جداسازی و سنجش فعالیت آنزیم در بیمارستان امام خمینی تهران بر روی بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم (تست کنترل) انجام گرفت. سنجش فعالیت آنزیم با استفاده از روش اصلاح شده Anson انجام شد.

یافته ها : میانگین فعالیت آنزیم کاتپسین D درخون افراد مبتلا به سرطان پستان ۲/۵۶ ± ۳۷/۴۲ و درافراد سالم (گروه شاهد) ۱/۰۱۱ ± ۱۱/۹۴ به دست آمد که این اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۳).

استنتاج : با توجه به یافته‌های این پژوهش اندازه‌گیری آنزیم کاتپسین D به عنوان یک شاخص تشخیصی برای شناسایی زودرس افراد مبتلا به سرطان پستان می‌تواند مورد توجه قرار گیرد.

واژه هاي كليدي : آنزیم کاتپسین D ، سرطان پستان، سرطان‌ها

مقدمه

سرطان پستان شایعترین سرطان در زنان می‌باشد و براساس آمار ۳۳ درصد کل سرطان‌ها در زنان را تشکیل می‌دهد(۱)، به طوری که در آمریکا از هر ۹ زن یک نفر مبتلا به سرطان پستان می‌باشد(۱). امروزه جهت تشخیص سرطان‌پستان از ماموگرافی و خودآزمایی پستان استفاده می‌شود. مطالعه ماموگرافی در پستان‌های سفت

* عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان
** استاد دانشگاه علوم پزشکی تهران
✉ کرمان- خیابان مدیریت، دانشکده پرستاری و مامایی رازی

www.SID.ir

Archive of SID

یا در بیمارانی که تغییرات فیبروکیستیک پستان دارند، مشکل می‌باشد ونتایج مطلوبی درجهت تشخیص زودهنگام سرطان پستان ندارد.

آنزیم کاتپسین D ، یک آنزیم پروتئاز لیزوزومی است و در گروه آسپارتیک پروتئازها قرار دارد. این آنزیم ابتدا به فرم پیش‌ساز پروکاتپسین D سنتز شده و پس از اسیدی شدن محیط، قطعات پپتیدی از قسمت انتهایی آن آزاد و آنزیم از فرم غیرفعال به فرم فعال در می‌آید. برای بررسی و مطالعه آنزیم کاتپسین D از کشت سلول‌های توموری استفاده شده است که پس از کشت سلول‌های مزبور، مایع بین بافتی را جمع‌آوری کرده و مورد تجزیه و بررسی قرار دادند. این مطالعات نشان دادند که میزان کاتپسین D در مایع بین بافتی سلول‌های تومورال افزایش می‌یابد. بر اساس مطالعات گارسیا (۱۹۹۶) افراد مبتلا به سرطان پستان دارای سطح بالایی از کاتپسین D هستند که به علت افزایش میزان رونویسی از ژن کاتپسین D به وسیله هورمون‌های استروژن و هورمون رشد در سلول‌های سرطانی پستان با یک مکانیزم ناشناخته است(۲).

راجر فورد و همکاران(۱۹۹۶) نیز همراه با بیان افزایش میزان کاتپسین D در سرطان پستان، مطالعه‌ای را بر روی توالی اسیدهای آمینه در ساختمان آنزیم کاتپسین D در افراد مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم انجام دادند و مشاهده کردند که توالی اسیدهای آمینه آنزیم کاتپسین D در افراد مبتلا به سرطان پستان با افراد سالم یکسان است(۳).

هدف از این مطالعه که برای نخستین بار در ایران انجام می‌شود، بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتپسین D در لوکوسیت‌های خون افراد مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم ست.

مواد و روش ها

اولین مرحله در انجام این تحقیق، استخراج آنزیم خام از لوکوسیت‌های خون بود. در این روش، جهت جداسازی گلبول‌های سفید، به لوله پلاستیکی حاوی خون هپارینه به ازای هر میلی‌لیتر خون، ۳/۵ میلی‌لیتر دکستران اضافه گردید. بعد از مدت یک ساعت، فازپلاسمایی حاوی گلبول‌های سفید را به لوله آزمایش دیگر انتقال داده و به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس رسوب را از لایه‌رویی جدا کرده و عمل هموژنیزاسیون (۹ $u/_{min}$) به مدت یک دقیقه در ۵ نوبت بر روی رسوب انجام شد. گرانول‌ها از سایر اجزاء هسته، طی دو مرحله سانتریفوژ افتراقی جدا شدند، و سپس رسوب را از لایه‌رویی جدا کرده و ۳ میلی‌لیتر بافرتریس کلراید (pH=۷/۸mmol) حاوی Triton x- 100 جهت پاره‌کردن دیواره گرانول‌ها به رسوب اضافه شد. بعد از اضافه کردن استن سرد به محلول ۷۵ درصد، محلول به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و بعد از عمل سانتریفوژ، رسوب از لایه‌رویی جدا شد. در عمل دیالیز محلول آنزیمی بر علیه بافر EDTA Tris به مدت ۲٤ساعت انجام شد و سپس بر علیه بافرTris HCL برای همان مدت انجام گرفت. در مرحله دوم جداسازی، با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یون (۵۲- DEAE) جداسازی اسید پروتئازها از بقیه اجزاء انجام شد و کروماتوگرافی بر روی ستون به ابعاد ۱cm×۳۰cm و سرعت ۱/۸ میلی‌لیتر در ساعت در دمای ٤ درجه سانتیگراد، در فراکسیون‌های ۴ میلی‌لیتر انجام گردید. هر دو مرحلهٔ جداسازی با استفاده از گرادیان پله‌ای، با افزایش غلظت نمک طعام، سست شدن اتصالات و خروج مرحله‌ای مواد از ستون انجام شد.

در مرحله اول، با غلظت نمک ۳۵ میلی مولار، Neutral proteases جدا شدند و سپس با افزایش غلظت نمک، در غلظت یک دهم نرمال اسیدپروتئازها از بقیه اجزاء جدا شدند.

پیک دوشاخه اسیدپروتئازی بر روی رکوردر ثبت

www.SID.ir

Archive of SID

شد و سنجش فعالیت آنزیم بر روی فراکسیون‌های حاصل از این کروماتوگرافی انجام گردید و منحنی مربوط به آن رسم شد. سپس کروماتوگرافی بسیار حساستری با سفادکس G-۲۰۰ بر روی ستون به ابعاد ۱۰٦cm×٦۰cm به‌مدت۴۸ساعت باسرعت۱/۸میلی‌لیتر در ساعت انجام شد. با انطباق فراکسیون‌های محدوده پیک تک شارپ درناحیه۲۸۰ نانومتر با منحنی آنزیم، وجود پیک تک فعالیت آنزیم کاتپسینD در محدوده پیک تک شارپ، دلیل بر خلوص و جداسازی کامل آنزیم بود.

در مرحله بررسی میزان فعالیت آنزیم، سنجش فعالیت‌آنزیم با استفاده از روش اصلاح شده Anson که دارای حساسیت ۳۰۰ng آنزیم بود، بر روی هموگلوبین به عنوان سوبسترای‌کاتپسین D انجام شد. pH محیط ۱/۱ و دمای محیط آزمایش ۳۸ درجه سانتی‌گراد بود.

این مراحل جداسازی و سنجش فعالیت آنزیم بر روی ۸ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۸ فرد سالم (تست کنترل) انجام شد.

یـــافـــتـــه هـــا

در این مطالعه که به منظور مقایسه میزان فعالیت آنزیم کاتپسین D در زنان مبتلا به سرطان پستان با زنان سالم صورت گرفت، هشت بیمار مبتلا به سرطان پستان و هشت فرد سالم به عنوان گروه کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. میانگین سن گروه بیمار ۴۰/۳۷ (با انحراف معیار ۵/۸) میانگین سن گروه کنترل ۳۹/۲۵ (با انحراف معیار ۸/۱۷۲) بود. آزمون آماری t تفاوت معنی‌داری را از نظر سنی بین دو گروه نشان نداد. نتایج به دست آمده در مورد اندازه‌گیری آنزیم کاتپسین D نشان داد که فعالیت این آنزیم در افراد مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افرادسالم(کنترل) افزایش بیشتری دارد. نتیجه آزمایشات تک‌تک افراد دو گروه در (جداول شمارهٔ ۱و۲) نشان داده شده است.

جدول شماره ۱ : میزان فعالیت آنزیم کاتپسین D در افراد مبتلا به سرطان پستان

نمونه بیمار	unit	mg/mlpro	u/ml
شماره (۱)	۲/۹۶	۰/۰۷۸	۳۷/۶۹
شماره (۲)	۲/۲۳	۰/۰۶۲	۳۵/۹۶
شماره (۳)	۲/۱۶	۰/۰۵۹	۳۶/۶۱
شماره (۴)	۳/۱۲	۰/۰۸	۳۹
شماره (۵)	۳/۰۹	۰/۰۷۹	۳۹/۱۱
شماره (۶)	۲/۶۳	۰/۰۷۱	۳۷
شماره (۷)	۲/۴۴	۰/۰۵۹	۴۱/۳۵
شماره (۸)	۲/۷۸	۰/۰۸۵	۳۲/۷۰

جدول شماره۲ : میزان فعالیت آنزیم‌کاتپسینD درافرادسالم (کنترل)

نمونه کنترل	unit	mg/mlpro	u/ml
شماره (۱)	۱/۶۸	۰/۱۳۱	۱۲/۸۲
شماره (۲)	۱/۲۸	۰/۰۹۸	۱۳
شماره (۳)	۱/۱۴	۰/۰۹۲	۱۲/۳۹
شماره (۴)	۱/۰۹	۰/۱۰۷	۱۰/۱۸
شماره (۵)	۱/۳۲	۰/۱۱	۱۲
شماره (۶)	۱/۳۸	۰/۱۲	۱۱/۱۵
شماره (۷)	۱/۳۴	۰/۱۰۵	۱۲/۷۶
شماره (۸)	۱/۴۸	۰/۱۳۶	۱۰/۹

میانگین فعالیت آنزیم کاتپسین D در گروه بیمار ۳۷/۴۳ (با انحراف معیار ۲/۵۶) و در گروه سالم

www.SID.ir

Archive of SID

(کنترل) ۱۱/۹۴ (با انحراف معیار ۱/۰۱۱) بود (جدول‌شمارهٔ۳).

جدول شماره ۳ : مقایسه میزان فعالیت آنزیم کاتپسین D گروه بیمار با گروه سالم

گروه	میانگین	انحراف معیار
بیمار	۳۷/۴۳	۲/۵۷
سالم (کنترل)	۱۱/۹۴	۱/۰۱
نتیجه آزمون		P<۰/۰۰۱

جهت مقایسه میزان فعالیت آنزیم کاتپسینD از آزمون Menn- Whitney استفاده شد که نتیجه آزمون تفاوت معنی‌داری را میان فعالیت آنزیم کاتپسینD در افرادبیمار با افراد سالم(کنترل)نشان می‌دهد(P<۰/۰۰۱). این تفاوت نشان دهنده افزایش فعالیت آنزیم در افراد مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم (کنترل) است.

بحث

یافته‌های این تحقیق نشان می‌هد که میزان فعالیت آنزیم‌کاتپسین D در افراد مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افرادسالم افزایش بیشتری دارد. مطالعات آلمادور(Almador) (۱۹۹۶)، گارسیا (Garcia) (۱۹۹۶) و راج فورد(Rachford) (۱۹۹۶) انجام گرفت نشاندهنده افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتپسین D در افراد مبتلا به سرطان پستان بود(۴،۳،۱).

نتایج به دست آمده از این تحقیق نشاندهندهٔ افزایش میزان فعالیت آنزیم کاتپسین D در افراد مبتلا به سرطان پستان با میانگین فعالیت ۲/۵۶ ± ۳۷/۴۲ در مقایسه با افراد سالم با میانگین ۱/۰۱۱ ± ۱۱/۹۴ است.

سرطان پستان شایعترین سرطان در زنان و بیشترین علت مرگ‌ومیر دراثر بدخیمی درآنهاست و از مهمترین عواملی که در بروز سرطان پستان نقش دارد می‌توان سابقه تولید مثل، فعالیت تخمدان، بیماری خوش خیم پستان، اختلاف ژنتیکی و فاکتورهای تغذیه‌ای و اندوکرینی اختصاصی را نام برد. پیش‌آگهی بیماری بستگی به میزان گسترش آن دارد. و هرچه زودتر در مراحل اولیه تشخیص داده شود، پیش آگهی بهتری دارد. بنابراین باید در جهتی گام برداشت و امکاناتی را فراهم کرد تا بتوان بیماری را در مراحل اولیه تشخیص داده و درمان کرد. تکنیک‌های رایج پیشنهادی برای تشخیص سرطان‌پستان، معاینه فیزیکی و ماموگرافی می‌باشند. متأسفانه، اگرچه ۷۰ تا ۷۵ درصد تومورها توسط خودآزمایی پستان کشف می‌شوند ولی این زمانی است که اندازه تومور ۲/۵cm است. دراین اندازه تومور،۵۰ درصد احتمال سرایت به عقده‌های لنفاوی وجود دارد. با توجه به این که بیش از یک سوم زنان در مرحله پیشرفتهٔ سرطان برای درمان مراجعه می‌کنند، به منظور کاهش میزان مرگ‌ومیر، باید از روشی در جهت تشخیص زود هنگام این بیماری استفاده کرد. آسکولا (۱۹۹۶) آنزیم کاتپسین D را به عنوان یک مارکر در جهت تشخیص سرطان پستان معرفی کرده است(۵). در این بررسی، افزایش قابل توجه آنزیم کاتپسین D در بیماران مبتلا به سرطان پستان می‌تواند شاخص مهمی در برای تشخیص این بیماری باشد. با توجه به نتایج آماری این بررسی میزان فعالیت آنزیم کاتپسین D در افراد مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم (تست کنترل) اختلاف معنی داری را نشان می‌دهد. با در نظرگرفتن افزایش فعالیت‌آنزیم، شاید سنجش فعالیت آنزیم کاتپسین D در افراد مبتلا به سرطان پستان به عنوان یک مارکر در جهت تشخیص زود هنگام سرطان پستان در مراحل اولیه مفید باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

سپاسگزاري

از سرکارخانم محمدعلی‌زاده عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی کرمان به خاطر مساعدت بی‌دریغ‌شان تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

فهرست منابع

1. Lipponen PK. Expression of cathepsin D in transitional cell bladder tumours. ***J. Pathol*** 1996; 178(1): 59-64.
2. Garcia M, Platet N, Liaudet E. Biological and clinical significant of cathepsin K in breast cancer tem-cells. 1996; 14(6): 642-50.
3. Rochefort H, liaudet E, Gareia M. Alteration and role of human cathepsin K in cancer metastasis enzyme-protein. 1996; 49(1-3): 106- 116.
4. Mauriz M, Almadori G, Cadonic G. Cathepsin D concentration in primary laryngeal cancer. ***Int. J. Can.*** 1996; 69(2): 105-9.
5. Asculai E, Gopas J, Coheny Cathepsin D as aprognostic marker in breast cancer Have fuah 1996; 13(11): 787- 90.

www.SID.ir