

'n Vergelyking tussen Lisosomale Ensiemaktiwiteite in Normale Ektoservikale Plaveiselepiteel en Plaveiselkarsinoom van die Ektoserviks

E. J. CRANNA

SUMMARY

A comparative study was made of the total lysosomal enzyme activity found in homogenates of normal ectocervical squamous epithelium and squamous carcinoma of this epithelium. The activities of acid phosphatase, β -glucuronidase, cathepsin D and acid ribonuclease were higher in carcinoma tissue than in normal tissue.

The most important observation made was with regard to the distribution of enzyme activity in homogenates. In carcinoma homogenates most of the enzyme activity was detected in the lysosomal fractions, whereas in controls the activity was predominantly found in the cytosol fractions.

No histochemical and electron microscopical techniques were used in this study. Because it was possible to sediment the enzyme activity and to demonstrate latency, these can be referred to as lysosomal enzymes with certainty.

S. Afr. med. J., 54, 528 (1978).

Die totale lisosomale ensiemaktiwiteite in karsinoomweefsel is hoër as dié in normale weefsel. Hierdie verhoging word in 'n groot verskeidenheid weefseltipes van die mens en ander soogdiere gevind.¹⁻³ Daar bestaan 'n positiewe korrelasie tussen lisosomale ensiemaktiwiteite en snelheid van proliferasie of infiltrasie van 'n maligne tumor.^{3,4} Die moontlike rol van lisosomale ensieme in metastase is bestudeer met behulp van weefselkultuur. Hierdie studies het getoon dat lisosomale ensieme die loslating van selle kan veroorsaak vanaf die glas waarop hulle in kultuurmedium groei.⁵ Aan die hand van hierdie resultate is dit dus geregverdig om 'n lisosomale betrokkenheid in die hele kankerproses te vermoed. Die hipotese het dan ook ontstaan dat lisosome in 'n tussenstap by karsinogenese betrokke is.^{6,7}

In hierdie artikel word 'n vergelykende studie beskryf van die totale lisosomale ensiemaktiwiteite in normale ektoservikale plaveiselepiteel en plaveiselkarsinoom van die ektoserviks.

MATERIAAL EN METODEDES

Normale weefsel is verkry deur monsters te neem van die ektoservikale plaveiselepiteel van uteri wat tydens vaginale histerektomieë verwyder is. Sorg is gedra om so min as

moontlik van die onderliggende stroma by die epiteel in te sluit, en nadat die weefsel gewas is, is die oortollige stroma met behulp van 'n skerppuntskêr verwyder. Karsinoomweefsel is verkry deur, met behulp van 'n Alexander-tang, ponsbiopsie-monsters te neem van eksofitiese tumore van die ektoserviks, wat in 'n gevorderde stadium van infiltrasie was. Alle chemikalieë wat gebruik is, was van Analar-gehalte, en water is deurgaans dubbeld gedistilleer. Die roetine-chemikalieë is van Merck (Darmstadt, Wes-Duitsland) en die substrate van die lisosomale ensieme van Sigma (St. Louis, VSA) verkry.

Homogenisasie

Weefsel is gewas in yskoue 0,25M sukrose, afgedroog en geweeg. Die weefsel is daarna versnipper en gesuspendeer in 10 volumes yskoue 0,25M sukrose (m/v). Homogenisasie is uitgevoer met 'n Politron PT 10 homogenerder vir 5 sekondes, gevolg deur 5 stote (op en af) in 'n lospassende Dounce glashomogenerder.

Fraksionering

Na sentrifugering van homogenate teen 800 g om kerne en selreste te sedimenteer, is die supernatant teen 22 000 g gesentrifugeer. Hierdeur is twee fraksies verkry, naamlik 'n postmitochondriale supernatantfraksie en 'n mitochondriale/lisosomale fraksie. In hierdie twee fraksies is die totale lisosomale ensiemaktiwiteite bepaal nadat alle latente aktiwiteite vrygestel is deur die byvoeging van 1% (v/v) Triton X-100.

Ensiembepaling

Suur fosfatase-aktiwiteite is bepaal volgens die metode van Shibko en Tappel,⁸ wat berus op die spektrofotometriese meting by 420 nm van vrygestelde *p*-nitrofenol-groepe. Die hidrolise, gekataliseer deur suur fosfatase, van *p*-nitrofenielfosfaat is by 37°C in 'n asetaatbuffer (pH 5,0) uitgevoer. Die aktiwiteit is bereken met 'n mikromolare uitwissingskoëffisiënt van 0,016 vir *p*-nitrofenol.

Die β -glukuronidase-aktiwiteite is bepaal volgens die metode van Gianetto en De Duve,⁹ wat berus op die spektrofotometriese meting by 540 nm van vrygestelde fenolftaleïen. Die hidrolise, gekataliseer deur β -glukuronidase, van fenolftaleïenglukuronied is by 37°C in 'n 0,1M asetaatbuffer (pH 4,5) bepaal. Die aktiwiteit is bereken met 'n mikromolare uitwissingskoëffisiënt van 11,5 vir fenolftaleïen.

Die metode van Anson¹⁰ is gebruik vir die bepaling van die katepsien D-aktiwiteite. Die reaksie is by 45°C in 'n

Departement Verloskunde en Ginekologie, Universiteit van Stellenbosch, Parowvallei, KP

E. J. CRANNA, M.Sc.

Ontvangsdatum: 26 Januarie 1978.

natriumformaat-buffer (pH 3,0) uitgevoer, met gedena-tureerde hemoglobienoplossing as substraat. Die produkte met lae molekulêre massa wat nie deur trichloorasynsuur gepresipiteer is nie, is na inkubasie spektrofotometries by 280 nm bepaal. Die aktiwiteit is bereken met 'n mikromolare uitwissingskoëffisiënt van 1 000 vir die produkte met lae molekulêre massas.

Die metode van Kalnitsky *et al.*¹¹ is gebruik om die aktiwiteit van suur ribonuklease by pH 5,0 aan te toon. Die reaksie is by 37°C uitgevoer in 'n 0,1M natrium-asetaat-buffer (pH 5,0), met 'n gedialiseerde RNS-oplossing as substraat. Die perchloorsuur-oplosbare oligonukleotiedes is na inkubasie spektrofotometries by 260 nm bepaal. Die aktiwiteit is bereken op die basis dat een eenheid aktiwiteit 'n styging in absorpsie van 1 000 by 260 nm teweegbring.

Alle bepalinge van ensiemaktiwiteite is kineties onder-soek. Te alle tye is gewerk binne die perke waar 'n liniêre verband tussen reaksiesnelheid en ensiemkonsen-trasie asook inkubasietyd bestaan. Sorg is gedra om altyd by substraatkonsentrasies te werk waar die verskillende ensieme met hul onderskeie substrate versadig was.

RESULTATE

'n Vergelyking is gemaak tussen die totale lisosomale en-siemaktiwiteite wat in die lisosomale en postmitochon-driale supernatantfraksies van homogenate van normale ekto-servikale plaveiselepiteelweefsel en plaveiselkarsinoom van die ekto-serviks aangetref word. Die kerne en selreste is buite rekening gelaat, aangesien slegs die aktiwiteite wat deur die homogenisasie vrygestel word in hierdie studie van belang was.

In Tabel I word die totale aktiwiteite van die vier lisosomale ensieme weergegee as 'n gemiddeld van die waardes in vyf verskillende monsters van normale weefsel sowel as in vyf verskillende monsters van karsinoom-weefsel.

By karsinoomweefsel is 'n baie duidelike verhoging in die totale aktiwiteite van al vier ensieme waargeneem. In die geval van suur ribonuklease is wel gevind dat sommige monsters normale weefsel hoër aktiwiteite bevat het as sommige van die monsters karsinoomweefsel. Veral insiggewend was die verandering wat plaasgevind het in die verspreiding van aktiwiteite in 'n homogenaat. In die geval van die karsinoomweefsel het die aktiwiteite na homogenisasie oorwegend in die lisosomale fraksie voorgekom, terwyl die teenoorgestelde waar was in die geval van die normale weefsel. Die proteïenkonsentrasies wat in Tabel I aangegee word, is nie bepaal in dieselfde weefselmonsters waarin die ensiemaktiwiteite bepaal is nie. Dit blyk egter duidelik dat die verhoging in totale ensiemaktiwiteite wat in die monsters karsinoomweefsel aangetref is, nie aan 'n verhoogde vrystelling van proteïen toegeskryf kan word nie.

Om die verskille tussen die twee weefseltipes ten op-sigte van die verspreiding van aktiwiteite beter te illus-treer, is die verhouding bereken tussen die aktiwiteite wat partikelgebonde voorgekom het en dié wat 'vry' in die supernatant voorgekom het.

Die verspreiding van aktiwiteite in karsinoomweefsel

TABEL I. TOTALE ENSIEMAKTIWITEITE

Fraksie	Ensiemaktiwiteite									
	Proteïenkonsentrasie (mg/ml)		Suur fosfatase ($\mu\text{mol}/\text{min}$)		β -glukuronidase ($\mu\text{mol}/\text{min} \times 10^{-3}$)		Katepsien D ($\mu\text{mol}/\text{min} \times 10^{-3}$)		Suur ribonuklease ($\mu\text{mol}/\text{min} \times 10^{-6}$)	
	Normaal	Karsinoom	Normaal	Karsinoom	Normaal	Karsinoom	Normaal	Karsinoom	Normaal	Karsinoom
Supernatant	2,98 \pm 1,20	2,84 \pm 0,69	0,89 \pm 0,22	1,38 \pm 0,50	0,71 \pm 0,17	1,60 \pm 0,10	2,04 \pm 0,41	1,75 \pm 0,61	7,08 \pm 2,65	5,55 \pm 1,99
Lisosomaal	0,74 \pm 0,24	1,11 \pm 0,22	0,46 \pm 0,14	4,19 \pm 1,53	0,64 \pm 0,20	3,07 \pm 1,02	1,57 \pm 0,33	3,86 \pm 0,66	5,30 \pm 1,36	7,20 \pm 1,82
Totaal	3,72 \pm 1,36	3,95 \pm 0,67	1,35 \pm 0,35	5,57 \pm 1,91	1,35 \pm 0,30	4,76 \pm 0,94	3,61 \pm 0,65	5,61 \pm 0,77	12,38 \pm 3,10	12,75 \pm 3,95

het 'n baie duidelike verskuiwing na die partikelgebonde toestand getoon (Tabel II). Hierdie feit dui daarop dat die lisosome van karsinoomweefsel die homogenisasie-tegnieke wat toegepas is beter kon weerstaan as die lisosome van normale weefsel.

TABEL II. DIE VERHOUDING VAN PARTIKELGEBONDE TOT 'VRY' LISOSOMALE ENSIEMAKTIWITEITE IN 'N HOMOGENAAT

Ensiem	Normale weefsel	Karsinoomweefsel
Suur fosfatase	0,52	3,04
β -glukuronidase	0,90	1,92
Katepsien D	0,77	2,21
Suur ribonuklease	0,75	1,30

BESPREKING

Die verhoging in die totale ensiemaktiwiteite wat in karsinoomweefsel gevind is, toon 'n ooreenkoms met die resultate wat deur ander navorsers verkry is.^{2,3}

Die mees insiggewende resultate van hierdie studie is egter die verskille wat aangetoon kon word in die verspreiding van ensiemaktiwiteite in die homogenate. In die gevalle van suur fosfatase, β -glukuronidase en katepsien D, is verhoogde aktiwiteite in albei fraksies van die karsinoomweefsel-homogenate gevind. Die grootste verhoging is egter deurgaans in die lisosomale fraksies gevind, in teenstelling met die situasie in normale weefsel-homogenate waarin die teenoorgestelde waar was (Tabel I).

In die geval van suur ribonuklease word die verskil in die verspreiding van lisosomale ensiemaktiwiteite baie dramaties geïllustreer deur die bevinding dat die ver-

spreidingspatroon in karsinoomweefsel-homogenate feitlik presies die teenoorgestelde was van dit wat in normale weefsel-homogenate gevind word (Tabel I).

Die resultate van hierdie studie dui dus daarop dat daar nie slegs 'n verhoging in die sintese van lisosomale ensieme in karsinoomweefsel gevind word nie, maar dat daar ook wesenlike verskille bestaan tussen die lisosome in die twee weefseltipes. Dit is baie duidelik dat die lisosome van karsinoomweefsel meer bestand is teen die homogenisasie-tegniek wat gebruik is. Hierdie groter weerstandigheid mag die gevolg wees van 'n verskil in die werklike fisiese grootte van die lisosome van die twee weefseltipes. Die alternatief is dat daar verskille bestaan in die membraansamestelling van die lisosome van die twee weefseltipes, wat tot gevolg het dat die breekbaarheid van die lisosome in eksperimentele prosedures verskil.

Die Mediese Superintendent van Tygerberg-hospitaal word bedank vir die gebruik van laboratoriumfasiliteite en eksperimentele materiaal. Professor W. Gevers van die Departement Geneeskundige Biochemie, Universiteit van Stellenbosch, word bedank vir sy belangstelling en advies.

VERWYSINGS

1. Dzialoszynski, L. M., Fröhlich, A. en Kroll, J. (1966): *Nature*, **212**, 733.
2. Goldberg, D. M. en Pitts, J. F. (1966): *Brit. J. Cancer*, **20**, 729.
3. Watts, C. en Goldberg, D. M. (1969): *Europ. J. Cancer*, **5**, 465.
4. Blackwood, C. E., Mandl, I. en Long, M. E. (1965): *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **91**, 419.
5. Sylven, B. (1968): *Europ. J. Cancer*, **4**, 559.
6. Allison, A. C. (1966): *Proc. roy. Soc. Med.*, **59**, 868.
7. Allison, A. C., Magnus, I. A. en Young, M. R. (1966): *Nature*, **209**, 874.
8. Shibko, S. en Tappel, A. L. (1963): *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, **73**, 76.
9. Gianetto, R. en De Duve, C. (1955): *Biochem. J.*, **59**, 433.
10. Anson, M. L. (1936). *J. gen. Physiol.*, **20**, 565.
11. Kalnitsky, G., Hummel, J. P. en Dierks, C. (1959): *J. biol. Chem.*, **234**, 1512.

Books Received : Boeke Ontvang

Recent Advances in Clinical Immunology. Ed. by R. A. Thompson. Pp. ix + 299. Illustrated. R23,20. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1977.

Shark Attack and Treatment of Victims in Southern African Waters. By T. Walleit. Pp. 176. Illustrated. R10,00. Cape Town: Purnell. 1978.

Current Concepts in Pediatric Radiology. Ed. by O. Eklöf. Pp. xii + 150. Illustrated. DM 54,00. Berlin: Springer-Verlag. 1977.

A Radiographic Index. By M. Goldman and D. Cope. 6th ed. Pp. vi + 98. £2,50. Bristol: John Wright & Sons. 1978.

School Nursing. A Basic Introduction to Nursing in Primary and Secondary Education. By Patricia A. Slack. Pp. ix + 190. Illustrated. London: Baillière Tindall. 1978.

Mathematics in Nursing. 5th ed. Revised by Pamela M. Jefferies. Pp. viii + 204. R5,30. London: Baillière Tindall. 1978.