

MONIKA CHMAREK¹, HALINA MILNEROWICZ¹, STANISŁAW MILNEROWICZ²,
STANISŁAW NABZDYK²

Stężenie interleukiny 6 oraz aktywność enzymów lizosomalnych: N-acetyl- β -D-glukozaminidazy i β -glukuronidazy w surowicy chorych na zapalenie trzustki

The Concentration of Interleukin-6 and the Activity of Lysosomal Enzymes: N-acetyl- β -D-glucosaminidase and β -glucuronidase in Serum of Patients with Pancreatitis

¹ Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych AM we Wrocławiu

² Katedra i Klinika Chirurgii Przewodu Pokarmowego i Chirurgii Ogólnej AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Badania kliniczne i eksperymentalne wskazują na istotny udział cytokin w rozwoju zapalenia trzustki. Wśród nich ważne miejsce zajmuje IL-6. Ważną rolę w patogenezie ostrego i przewlekłego zapalenia trzustki odgrywają enzymy lizosomalne: N-acetylo- β -D-glukozaminidaza (NAG) oraz β -D-glukuronidaza (β -GD).

Cel pracy. Wykazanie, czy w miarę zaostrzania się procesu zapalnego trzustki zmienia się aktywność enzymów lizosomalnych w surowicy oraz czy w związku z tym obserwuje się zmianę profilu form molekularnych A i B N-acetylo- β -D-glukozaminidazy.

Materiał i metody. Badania wykonano w surowicy krwi 92 osób: 35 pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki (p.z.t.), 20 pacjentów z przewlekłym zaostrzającym zapaleniem trzustki (p.z.z.t.), 15 pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki (o.z.t.) oraz u 22 osób zdrowych. Stężenie interleukiny 6 (IL-6) oznaczano metodą enzymoimmunologiczną za pomocą zestawu DuoSet-ELISA. Aktywność NAG i jej form molekularnych oznaczano wobec substratu p-nitrofenylo-N-acetylo- β -D-glukosaminidu, a aktywność β -GD oznaczano wobec substratu p-nitrofenylo- β -D-glukuronidu.

Wyniki. Wykazano istotny wzrost stężenia IL-6 w o.z.t. ($85,0 \pm 36,7$ pg/ml) i p.z.z.t. ($17,7 \pm 12,6$ pg/ml) w porównaniu z grupą kontrolną ($1,3 \pm 0,82$ pg/ml). Stwierdzono istotny statystycznie wzrost aktywności NAG w surowicy pacjentów chorych na o.z.t. ($34,3 \pm 19,8$ U/l) oraz na p.z.z.t. ($18,4 \pm 6,2$ U/l) w stosunku do grupy kontrolnej ($8,1 \pm 4,0$ U/l). W surowicy pacjentów z zapaleniem trzustki wykazano obecność izoformy NAG-B, której najwyższą aktywność stwierdzono u chorych na p.z.t. Odnotowano istotny wzrost aktywności β -GD w surowicy pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej (p.z.t.: $1,2 \pm 0,5$ U/l; p.z.z.t.: $1,6 \pm 0,6$ U/l; o.z.t.: $2,4 \pm 0,6$ U/l; grupa kontrolna: $0,8 \pm 0,3$ U/l).

Wnioski. Oznaczanie stężenia IL-6 w surowicy jest użytecznym markerem różnicującym odmienne postacie zapalenia trzustki. Pomiar aktywności NAG, NAG-B i β -GD może być przydatny w różnicowaniu stanów zapalnych trzustki (Adv Clin Exp Med 2004, 13, 6, 961–967).

Słowa kluczowe: molekularne formy N-acetylo- β -D-glukozaminidazy, β -D-glukuronidaza, interleukina 6, zapalenie trzustki.

Abstract

Background. Experimental and clinical studies have indicated that cytokines play an essential role as mediators of inflammatory process associated with pancreatitis. One of the most important mediators of inflammation is interleukin-6. A specific role of lysosomal enzymes: N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), β -D-glucuronidase (β -GD) has been postulated in the pathogenesis of acute and chronic pancreatitis.

Objectives. The aim of the present study was to assess whether in progress of the exacerbation of pancreatitis, the activity of lysosomal enzymes changes and as a consequence the profiles of isoenzymes A and B of N-acetyl- β -D-glucosaminidase alter, too.

Material and Methods. The study was performed in serum of 92 subjects: 35 patients with chronic pancreatitis (CP), 20 patients with chronically exacerbated pancreatitis (CEP), 15 patients with acute pancreatitis (AP), 22 normal healthy subjects. Interleukin-6 (IL-6) concentration in serum was determined using the enzymeimmunochemical method (DuoSet-ELISA Development System). NAG and its isoenzymes activity were determined against p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide and β -GD against p-nitrophenyl- β -D-glucuronide.

Results. The study demonstrated a significant increase in level IL-6 in patients with AP (85.0 ± 36.7 pg/ml), CEP (17.7 ± 12.6 pg/ml) as compared with the reference population (1.3 ± 0.82 pg/ml). In the serum of patients with AP (34.3 ± 19.8 U/l) and CEP (18.4 ± 6.2 U/l) the activity of NAG were also elevated in comparison to the control group (8.1 ± 4.0 U/l). In the serum of all patients with pancreatitis the presence of isoform NAG-B was revealed – the highest activity in patients with CP was noticed. In all cases of pancreatitis a significant elevation of β -GD as compared with the control group was observed (CP: 1.2 ± 0.5 U/l; CEP: 1.6 ± 0.6 U/l; AP: 2.4 ± 0.6 U/l; control group: 0.8 ± 0.3 U/l).

Conclusions. The determination of IL-6 concentration in serum is a valuable marker permitting the differentiation of various types of pancreatitis. The assessment of activity of NAG, NAG-B and β -GD in patients with pancreatitis can be useful for diagnosis of these diseases (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 6, 961–967).

Key words: molecular forms of N-acetyl- β -D-glucosaminidase, β -D-glucuronidase, interleukin-6, pancreatitis.

Stan zapalny trzustki jest następstwem złożonych procesów rozwijających się lawinowo, zależnych od wielu czynników, wśród których istotne miejsce zajmują mediatory odczynu zapalnego. Spośród kilkunastu glikoprotein wykazujących zdolność do modyfikowania nasilenia odczynu zapalnego i związanej z nim reakcji obronnej organizmu w przebiegu zapalenia trzustki, istotne miejsce zajmuje IL-6.

Zauważono, że w ostrej fazie zapalenia wzrost stężenia IL-6 w surowicy pacjentów wyprzedza o około 24 godziny wzrost stężenia białka CRP [1]. Zwiększenie stężenia IL-6 i szczyt jej wydzielania występuje między 24–48 godziną od wystąpienia objawów choroby [2].

Badania eksperymentalne u zwierząt, a także wyniki badań u ludzi nie wyjaśniają do końca następstw zmian biochemicznych w rozwoju procesu zapalnego trzustki. Przypuszcza się, że nieprawidłowa wewnątrzkomórkowa aktywacja proenzymów jest podstawą procesu autodestrukcji [3–6]. Komórki pęcherzykowe trzustki zawierają złożony system lizosomalny składający się z pierwotnych i wtórnych lizosomów zaangażowanych w procesy endocytozy i błonowego recyklingu. Do enzymów lizosomalnych, których oznaczanie aktywności może mieć wartość diagnostyczną należą: N-acetylo- β -D-glukozaminidaza (NAG) oraz β -D-glukuronidaza (β -GD).

N-acetylo- β -D-glukozaminidaza (EC3.2.1.30) jest glikoproteiną o masie 150–160 kDa, która odszepia reszty N-acetyloglukozaminy lub N-acetylogalaktozaminy z nieredukującego końca łańcuchów oligosacharydowych glikolipidów, glikoprotein i proteoglikanów. Wzrost aktywności NAG stwierdza się u kobiet w ciąży w przebiegu porfirii, w stanach zapalnych stawów, chorobach nerek, a także nowotworach żołądka, wątroby i trzustki [7–9]. Wykryto wiele form molekularnych N-acetylo- β -D-glukozaminidazy [10]. Prze-

ważają jednak dwa izoenzymy – termolabilna, bardziej elektroujemna postać A oraz termostabilna postać B. Ich wzajemny stosunek ilościowy oraz obecność innych form jest różna w rozmaitych tkankach. Izoenzym A występuje w lizosomach w postaci wolnej, niezwiązanej z błoną lizosomalną i jest wydzielany w wyniku funkcjonalnej egzocytozy. Izoforma B natomiast jest formą związaną z błonami lizosomalnymi i przyjmuje się, iż jej uwalnianie jest następstwem uszkodzenia tych struktur [11, 12]. Oznaczanie form molekularnych NAG znalazło zastosowanie m.in. w ocenie ekspozycji środowiskowej na metale ciężkie oraz w toksycznym uszkodzeniu nerek, a także u kobiet z rozpoznaniem małowodzie idyopatycznym lub przedwczesnym odpływaniem wód płodowych [9, 12]. Obserwuje się wzrost w surowicy N-acetylo- β -D-glukozaminidazy u chorych na nowotwory trzustki oraz na cukrzycę, brak jest jednak informacji na temat aktywności izoenzymów NAG w surowicy chorych na zapalenia trzustki [8].

β -D-glukuronidaza (β -GD) (EC3.2.1.31) jest glikoproteiną w postaci tetrametu o masie 310–380 kDa, hydrolizującą głównie glukuronidy. Wzrost aktywności β -GD jest użytecznym wskaźnikiem monitorującym zwiększoną przepuszczalność błon komórek fagocytujących jeszcze przed wystąpieniem ich lizy [13, 14]. Zwiększoną aktywność surowiczej i tkankowej β -GD stwierdzono w stanach zapalnych stawów, dermatozach, chorobach wątroby, AIDS, nowotworach piersi, żołądka, odbyticy, a także trzustki [8].

Celem pracy było wykazanie, czy w miarę zaost్రzania się procesu zapalnego trzustki zmienia się aktywność enzymów lizosomalnych oraz profil form molekularnych A i B N-acetylo- β -D-glukozaminidazy w surowicy pacjentów chorych na zapalenie trzustki i czy zmiany te mogą być przydatne w różnicowaniu stopnia zaost్రzenia procesu zapalnego tego narządu.

Materiał i metody

Materiałem do badań była surowica krwi pacjentów hospitalizowanych w Klinice Chirurgii Przewodu Pokarmowego i Chirurgii Ogólnej Akademii Medycznej we Wrocławiu. Materiał biologiczny był gromadzony w latach 2000–2002. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej NR KB: 257/2000.

Krew żylną do badań pobierano rano, na czczo, a otrzymywaną surowicę przechowywano do czasu oznaczeń w temperaturze -80°C (do oznaczania aktywności enzymów okres ten nie przekraczał tygodnia, w przypadku interleukiny 6 trzech miesięcy).

Badania wykonano u 92 osób. Grupę kontrolną stanowiły 22 osoby (7 kobiet i 15 mężczyzn w wieku 22–48 lat). Pacjentów podzielono na trzy grupy na podstawie stężenia IL-6 w surowicy oraz wywiadu i rutynowych badań diagnostycznych stosowanych w ocenie zapalenia trzustki: stężenia α -amylazy w surowicy, USG, ERCP, a także na podstawie powszechnie stosowanej skali prognozy Ransona.

Grupa z przewlekłym zapaleniem trzustki (p.z.t.) liczyła 35 osób (9 kobiet i 26 mężczyzn w wieku 35–64 lat). Do grupy z przewlekłym zaostrzającym zapaleniem trzustki (p.z.z.t.) należało 20 osób (6 kobiet i 14 mężczyzn w wieku 32–70 lat), a do grupy z ostrym zapaleniem trzustki (o.z.t.) 15 osób (2 kobiety i 13 mężczyzn w wieku 28–77 lat).

U 3 chorych stwierdzono cukrzycę (DM): u 2 mężczyzn z p.z.t. oraz u jednej kobiety z o.z.t. Cukrzycę rozpoznano na podstawie wyników testu tolerancji glukozy, hiperglicemii i glikozurii.

Stężenie IL-6 w surowicy oznaczano metodą enzymoimmunologiczną za pomocą zestawu Duo-Set-ELISA Development System (R&D Systems; Nr Kat. DY 206). Aktywność enzymów w surowicy wyrażano w jednostkach międzynarodowych na litr (U/l). Aktywność NAG i jej form molekularnych oznaczano wobec substratu p-nitrofenylo-N-acetylo- β -D-glukozaminidu (10 mM) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA, Nr Kat. N 9376) [15]. Aktywność form molekularnych NAG-A i NAG-B oznaczono w stosunku do tego samego substratu metodą opublikowaną wcześniej [10, 12]. Aktywność β -GD oznaczano wobec substratu p-nitrofenylo- β -D-glukuronidu (4,68 mM) (Sigma Chemicals Co., St. Louis, USA, Nr Kat. N 1627) [13].

Wyniki oznaczeń w stanach zapalnych trzustki w odniesieniu do grupy kontrolnej analizowano testem *t*-Studenta, poprzedzonym testem normalności (Shapiro-Wilka) i jednorodności wariancji (Leveana). W przypadku braku jednorodności wariancji stosowano test Cochran-Coxa. Test ANOVA Kruskal-Wallisa był zastosowany do porównania wyników oznaczeń aktywności enzymu NAG i IL-6

w trzech postaciach zapalenia. Test wielokrotnego porównania Scheffe'go służył do porównania wyników pomiaru aktywności β -GD w wydzielonych grupach chorych na zapalenie trzustki. Testowanie istotności przeprowadzono na poziomie $p < 0,05$.

Wyniki

Interleukina 6

Wykazano istotny wzrost stężenia IL-6 w o.z.t. i p.z.z.t. w porównaniu z grupą kontrolną. Nie stwierdzono różnicy istotnej statystycznie między stężeniem IL-6 w grupie chorych na p.z.t. a grupą kontrolną, wykazano natomiast statystycznie istotne różnice w stężeniu IL-6 między wszystkimi postaciami zapalenia (tab. 1). Pomiar tego markera pozwala zatem na zróżnicowanie postaci zapalenia trzustki.

N-acetylo- β -D-glukozaminidaza i jej formy molekularne

Wykazano istotny wzrost aktywności NAG w surowicy pacjentów chorych na o.z.t. oraz na p.z.z.t. w stosunku do grupy kontrolnej (tab. 2).

Tabela 1. Stężenie IL-6 w surowicy pacjentów chorych na zapalenie trzustki w pierwszych 48 godzinach hospitalizacji

Table 1. Serum level IL-6 in patients with pancreatitis during the first 48 hours of hospitalization

Badane grupy (Studied groups)	IL-6 pg/ml $\bar{x} \pm \text{SD}$	Min.–Maks. (Min–Max)	Mediana (Median)
p.z.t. (CP) $n = 35$	$2,0 \pm 1,3$	0,1–4,1	19
p.z.z.t. (CEP) $n = 20$	$17,7 \pm 12,6^*$	5,0–37,1	10,8
o.z.t. (AP) $n = 15$	$85,0 \pm 36,7^{**}$	41,4–143,4	78,5
Kontrolna (Controls) $n = 22$	$1,3 \pm 0,82$	0,3–2,5	1,1

Różnice istotne statystycznie między: * grupą kontrolną i p.z.z.t. ($p < 0,01$); ** grupą kontrolną i o.z.t. ($p < 0,001$).

Test ANOVA Kruskal-Wallisa: p.z.t. i o.z.t.: $p < 0,001$; p.z.t. i p.z.z.t.: $p < 0,001$; p.z.z.t. i o.z.t.: $p < 0,001$.

Statistically significant differences between: * control group and CEP ($p < 0,01$); ** control group and AP ($p < 0,001$).

Kruskal-Wallis ANOVA test: CP and AP: $p < 0,001$; CP and CEP: $p < 0,001$; CEP and AP: $p < 0,001$.

Tabela 2. Aktywność NAG w surowicy pacjentów chorych na zapalenia trzustki w pierwszych 48 godzinach hospitalizacji**Table 2.** Serum activity of NAG in patients with pancreatitis during the first 48 hours of hospitalization

Badane grupy (Studied groups)	NAG U/l $x \pm SD$	Min.–Maks. (Min–Max)	Mediana (Median)
p.z.t. (CP) n = 35	10,4 \pm 3,9	3,5–17,8	9,9
p.z.z.t. (CEP) n = 20	18,4 \pm 6,2*	8,1–27,1	18,9
o.z.t. (AP) n = 15	34,3 \pm 19,8**	12,9–81,3	31,4
Kontrolna (Controls) n = 22	8,1 \pm 4,0	1,1–15,4	8,1

Różnice istotne statystycznie między: * grupą kontrolną i p.z.z.t. ($p < 0,001$); ** grupą kontrolną i o.z.t. ($p < 0,001$).

Statistically significant differences between: * control group and CEP ($p < 0,001$); ** control group and AP ($p < 0,001$).

Nie stwierdzono różnicy statystycznie istotnej między całkowitą aktywnością NAG w grupie chorych na p.z.t. a grupą kontrolną, natomiast różnice w aktywności NAG między wszystkimi postaciami zapalenia były istotne statystycznie (ryc. 1).

W przypadku osób ze współistniejącą cukrzycą (u dwóch mężczyzn z p.z.t. oraz u kobiety z o.z.t.) aktywność N-acetylo- β -D-glukozaminidazy kształtowała się w górnej granicy obserwowanego zakresu (w przypadkach p.z.t. były to odpowiednio wartości: 12,0 U/l i 17,3 U/l, natomiast u pacjentki z o.z.t.: 81,3 U/l).

W surowicy wszystkich pacjentów z zapaleniem trzustki wykazano obecność formy A i B N-acetylo- β -D-glukozaminidazy, a w surowicach osób zdrowych tylko formę A, określaną przez wielu badaczy mianem formy A^s (tab. 3, ryc. 2, 3). Wykazano, że różnice w aktywności formy NAG-A w surowicy chorych na p.z.z.t. i o.z.t. były statystycznie istotne w stosunku do kontroli. Nie wykazano różnic istotnych statystycznie między aktywnością formy A u chorych na p.z.t. i grupą kontrolną. Różnice w aktywności NAG-A między grupą chorych na p.z.t. i p.z.z.t. oraz p.z.t. i o.z.t. były istotne statystycznie (ryc. 2).

β -D-glukuronidaza

W surowicach wszystkich pacjentów chorych na zapalenie trzustki stwierdzono istotny wzrost aktywności β -GD w porównaniu do grupy kontrolnej (tab. 4.). Stosując jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA) oraz parametryczny test Scheffe'go wykazano, że obserwowane różnice są istot-

Tabela 3. Aktywność molekularnych form NAG i ich procentowy udział w surowicy pacjentów chorych na zapalenie trzustki w pierwszych 48 godzinach hospitalizacji**Table 3.** Serum activity of molecular forms of NAG and their percentage ratio in patients with pancreatitis during the first 48 hours of hospitalization

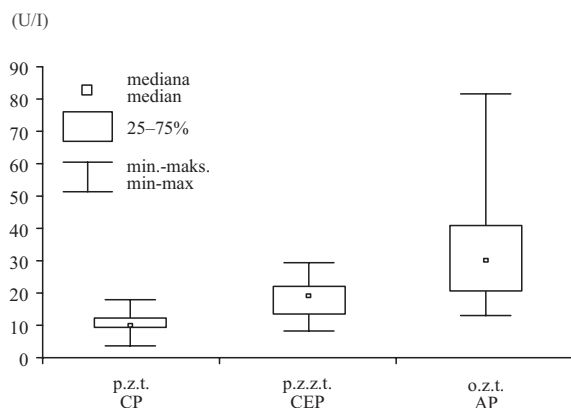
Badane grupy (Studied group)	Izoforma A NAG (Izoform NAG-A) U/l $x \pm SD$	Procentowy udział izoformy A (% of total activity of NAG-A) $x \pm SD$	Izoforma B NAG (Izoform NAG-B) U/l $x \pm SD$	Procentowy udział izoformy B (% of total activity of NAG-B) $x \pm SD^b$
p.z.t. (CP) n = 35	9,3 \pm 3,7	89 \pm 4,8	1,1 \pm 0,5	11 \pm 4,8
p.z.z.t. (CEP) n = 20	17,5 \pm 5,8*	95 \pm 2,3	0,9 \pm 0,6	5 \pm 2,3
o.z.t. (AP) n = 15	37,2 \pm 23,7**	97 \pm 1,3	0,9 \pm 0,5	3 \pm 1,3
Kontrolna (Controls) n = 22	8,1 \pm 4,0	100	0	0

Różnice istotne statystycznie między: * grupą kontrolną i p.z.z.t. ($p < 0,001$); ** grupą kontrolną i o.z.t. ($p < 0,001$).

^b Porównanie średnich *post-hoc*, test Scheffe'go: p.z.t. i o.z.t.: $p < 0,001$; p.z.t. i p.z.z.t.: $p < 0,001$; p.z.z.t. i o.z.t.: $p > 0,05$.

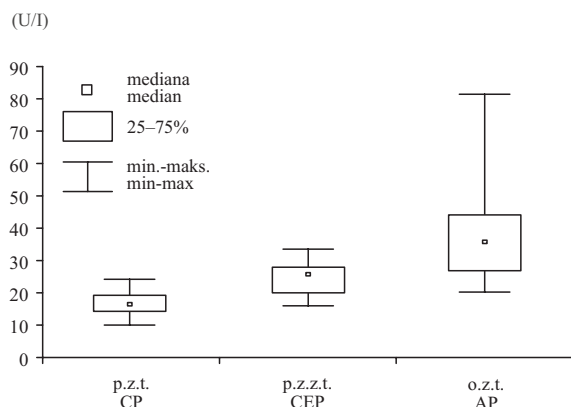
Statistically significant differences between: * control group and CEP ($p < 0,01$); ** control group and AP ($p < 0,001$).

^b Comparison of means *post-hoc*, Scheffe test: CP and AP: $p < 0,001$; CP and CEP: $p < 0,001$; CEP and AP: $p > 0,05$.



Ryc. 1. Aktywność NAG w stanach zapalnych trzustki. Test ANOVA Kruskala-Wallisa: p.z.t. i o.z.t.: $p < 0,001$; p.z.t. i p.z.z.t.: $p < 0,001$; p.z.z.t. i o.z.t.: $p < 0,05$

Fig. 1. Activity of NAG in pancreatitis. Kruskal-Wallis ANOVA test: CP and AP: $p < 0.001$; CP and CEP: $p < 0.001$; CEP and AP: $p < 0.05$



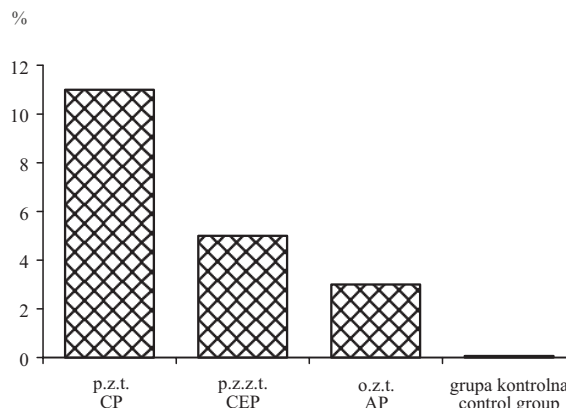
Ryc. 2. Aktywność izoformy NAG-A w stanach zapalnych trzustki. Test ANOVA Kruskala-Wallisa: p.z.t. i o.z.t.: $p < 0,001$; p.z.t. i p.z.z.t.: $p < 0,001$; p.z.z.t. i o.z.t.: $p > 0,05$

Fig. 2. Activity of isoform NAG-A in pancreatitis. Kruskal-Wallis ANOVA test: CP and AP: $p < 0.001$; CP and CEP: $p < 0.001$; CEP and AP: $p > 0.05$

ne statystycznie. Zaobserwowano, że w przypadku 3 osób ze współistniejącą towarzyszącą cukrzycą (u dwóch mężczyzn z p.z.t. oraz u kobiety z o.z.t.) aktywność β -GD kształtowała się w górnej granicy obserwowanego zakresu (w przypadkach p.z.t. były to wartości odpowiednio: 1,5 U/l oraz 2,0 U/l, natomiast u pacjentki z o.z.t.: 3,3 U/l).

Omówienie

Rozpoznanie stanów zapalnych trzustki, mimo postępów medycyny, wciąż sprawia ogromne trudności. Podejmowano liczne próby oceny stop-



Ryc. 3. Procentowy udział izoformy B N-acetylo- β -D-glukozaminidazy w surowicy pacjentów chorych na zapalenie trzustki

Fig. 3. Percentage ratio of NAG-B in serum of patients with pancreatitis

Tabela 4. Aktywność β -GD w surowicy chorych i zdrowych ludzi w pierwszych 48 godzinach hospitalizacji

Table 4. Serum activity of β -GD in patients with pancreatitis during the first 48 hours of hospitalization

Badane grupy (Studied group)	β -GD U/l $\bar{x} \pm SD^b$	Min.–Maks. (Min–Max)	Mediana (Median)
p.z.t. (CP) n = 35	$1,2 \pm 0,5^*$	0,2–2,1	1,1
p.z.z.t. (CEP) n = 20	$1,6 \pm 0,6^{**}$	0,8–2,4	1,6
o.z.t. (AP) n = 15	$2,4 \pm 0,6^{***}$	1,8–3,6	2,4
Kontrolna (Controls) n = 22	$0,8 \pm 0,3$	0,3–1,6	0,7

Różnice statystycznie istotne między: * grupą kontrolną i PZT ($p < 0,01$); ** grupą kontrolną i p.z.z.t. ($p < 0,001$); *** grupą kontrolną i o.z.t. ($p < 0,001$).

^b Porównanie średnich *post-hoc*, test Scheffe'go: p.z.t. i o.z.t.: $p < 0,001$; p.z.t. i p.z.z.t.: $p < 0,05$; p.z.z.t. i o.z.t.: $p < 0,001$.

Statistically significant differences between: * control group and CP ($p < 0.01$); ** control group and CEP ($p < 0.001$); *** control group and AP ($p < 0.001$).

^b Comparison of means *post-hoc*, Scheffe test: CP and AP: $p < 0.001$; CP and CEP: $p < 0.05$; CEP and AP: $p < 0.001$.

nia zaawansowania i rokowania dla stanów zapalnych trzustki [4, 16]. Mimo wprowadzenia ogólnego podziału na ostre i przewlekłe zapalenie, przyjęta klasyfikacja nie jest doskonała i w dal-

szym ciągu poszukuje się nowych markerów przydatnych do oceny stopnia zaawansowania stanu zapalnego trzustki.

Badania kliniczne i eksperymentalne wskazują na istotny udział cytokin jako głównych mediatorów reakcji zapalnej organizmu. Wyniki badań różnych autorów wykazały, że IL-6 spełnia rolę wczesnego wskaźnika prognostycznego w tej chorobie [2, 17–19]. Badania prowadzone przez Lesera et al. wskazują na znacząco wyższe stężenie IL-6 u chorych z ciężkimi, powikłanymi postaciami o.z.t. [20]. Obserwacje te potwierdzają także badania przeprowadzone przez Viedema et al., zwracające uwagę na znaczny wzrost stężenia IL-6 w surowicy u tych chorych, u których w czasie choroby dochodziło do rozwoju powikłań wielonarządowych [21].

Przedstawione badania wykazały znaczące różnice w stężeniu IL-6 w surowicy chorych na o.z.t., p.z.z.t., p.z.t. podczas 48. godziny hospitalizacji. W grupie chorych na o.z.t. zaobserwowano ponad 60-krotny wzrost stężenia IL-6 w porównaniu z grupą kontrolną i ponad 40-krotny wzrost w porównaniu z grupą p.z.t. Stężenie IL-6 w grupie pacjentów z p.z.z.t. wykazywało około 13-krotny wzrost w porównaniu do grupy kontrolnej i 8-krotny w porównaniu do pacjentów z rozpoznaniem p.z.t. Najwyższym stężeniem IL-6 charakteryzowała się grupa chorych na o.z.t. ($85,0 \pm 36,7$ pg/ml). Wzrost stężenia IL-6 korelował z ciężkością przebiegu zapalenia trzustki – i w przypadku dwóch osób z o.z.t. oraz jednej z p.z.z.t., gwałtowny wzrost IL-6 zakończył się zgonem.

Enzymy lizosomalne odgrywają szczególną rolę w patogenezie ostrego i przewlekłego zapalenia trzustki, chociaż nie jest do końca poznany mechanizm uruchamiający tę kaskadę [2, 4, 5]. Na podstawie badań doświadczalnych sugeruje się istnienie dwóch mechanizmów odpowiedzialnych za wewnątrzkomórkową aktywację proenzymów w komórkach zewnątrzwydzielniczych trzustki: 1) fuzja błon ziarnistości zymogenowych i lizosomalnych w procesie krynofagii i tworzenie się wakuoli krynofagicznych [5] oraz 2) nieprawidłowe dojrzewanie na biegunie *trans* aparatu Golgiego wakuoli sekrecyjnych i formowanie się dużych wakuoli zawierających zarówno lizosomalne hydrolazy, jak i enzymy trawienne [6].

Baniukiewicz [3] oraz Willemer [6] podają jednak w wątpliwość, czy kolokalizacja enzymów lizosomalnych jest procesem patogenetycznym. Inni autorzy podtrzymują nadal hipotezę o roli enzymów lizosomalnych w procesie aktywacji zymogenów w o.z.t., od czasu, gdy wiadomo, że katepsyna B ma zdolność aktywacji trypsynogenu [2, 4, 5].

Przedstawione badania potwierdziły wzrost aktywności NAG wraz z zaostrzeniem się procesu zapalnego trzustki. Najwyższą aktywność enzymu stwierdzono w grupie pacjentów chorych na o.z.t. ($34,3 \pm 19,8$ U/l). Stwierdzono również, że w przypadku cukrzycy aktywność N-acetylo- β -D-glukozaminidazy kształtowała się w górnej granicy obserwowanego zakresu.

Wyniki badań wykazały także obecność izoformy NAG-B we wszystkich stanach zapalnych trzustki (tab. 3, ryc. 3). Udział patologicznej formy B był najniższy w grupie pacjentów z o.z.t., a najwyższy u pacjentów z p.z.t. Można więc przypuszczać, że zwiększenie udziału formy B u chorych z rozpoznaniem przewlekłym stanem zapalnym trzustki świadczy o rozległym, zaawansowanym i długotrwałym procesie destrukcyjnym, toczącym się w komórkach zmienionego zapalnie narządu.

Wykazano także wzrost aktywności β -glukuronidazy we wszystkich postaciach zapalenia w porównaniu do grupy kontrolnej. Najwyższą aktywność stwierdzono u chorych na o.z.t., a najniższą w przebiegu p.z.t. W przypadku osób ze współistniejącą cukrzycą aktywność β -GD kształtowała się w górnej granicy obserwowanego zakresu. Wzrost aktywności β -GD u chorych na cukrzycę wykazali także inni autorzy [22, 23]. Podwyższoną aktywność β -GD obserwowaną u tych chorych należałoby tłumaczyć nasileniem zmian katabolicznych w tkankach i wzmożeniem procesu glukuronidacji. Wzrost aktywności tego enzymu stwierdza się również w moczu pacjentów we wczesnym stadium rozwoju nefropatii cukrzycowej i uważa się, że jest to czuły wskaźnik wczesnych zmian metabolicznych i strukturalnych w kłębuszkach nerkowych u chorych na cukrzycę [22].

Jako inne źródło zwiększonej aktywności enzymów lizosomalnych w surowicy chorych na zapalenie trzustki uważa się komórki nacieku zapalnego, z których są uwalniane enzymy. W wyniku nieokreślonego dotychczas mechanizmu zapoczątkowującego uszkodzenie komórki pęcherzykowej – wczesnym objawem jest naciek neutrofilów, monocytów i makrofagów na podścielisko łącznotkankowe trzustki [14, 18, 19]. Nadmierna aktywacja tych komórek i uwolnienie z nich mediatorów stanu zapalnego (cytokin, cząsteczek przylegania, NO, PAF), w tym także enzymów lizosomalnych, jest następnym etapem w rozwoju zapalenia. Potwierdzeniem tych obserwacji są wyniki badań immunohistochemicznych w skrawkach zmienionej zapalnie trzustki [24].

Wzrost aktywności enzymów lizosomalnych w surowicy, szczególnie w zaostrzającej i ostrej postaci zapalenia, świadczy o zwiększonym ich uwalnianiu ze struktur lizosomalnych i znacznym uszkodzeniu komórek trzustki.

Piśmiennictwo

- [1] **Pezzilli R, Cappelletti O, Barakat B:** Serum interleukin 6 in the prognosis of acute biliary pancreatitis. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998, 30, 291–294.
- [2] **Bathia M, Brady M, Shokui S, Christmas S, Noeplemos JP, Salvin J:** Inflammatory mediators in acute pancreatitis. *J Pathol* 2000, 190, 117–125.
- [3] **Baniukiewicz AA, Dlugosz JW, Gabrylewicz A:** The lysosomal hydrolases in rat pancreas after maximal or supramaximal stimulation with cerulein. *Int J Pancreatol* 1994, 16, 71–79.
- [4] **Mitchell RSM, Byrne M, Baillie J:** Pancreatitis. *Lancet* 2003, 361, 1447–1455.
- [5] **Steer ML, Meldolesi J, Figarella C:** Pancreatitis. The role of lysosomes. *Dig Dis Sci* 1984, 29, 934–938.
- [6] **Willemer S, Bialek R, Adler G:** Localization of lysosomal and digestive enzymes in cytoplasmic vacuoles in cerulein-pancreatitis. *Histochemistry* 1990, 94, 161–170.
- [7] **Milnerowicz H, Słowińska M:** Concentration of metals, ceruloplasmin, metallothionein and the activity of N-acetyl- β -D-glucosaminidase and γ -glutamyltransferase in pregnant women who smoke and in those environmentally exposed to tobacco smoke and in their infants. Part I. *Int J Occup Med Environ Health* 1997, 10, 187–202.
- [8] **Severini G, Diana L, Di Giovannandrea R, Tirelli C:** A study of serum glycosidases in cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1995, 121, 61–63.
- [9] **Tucker SM, Pierce RJ, Price RG:** Characterisation of human N-acetyl- β -D-glucosaminidase isoenzymes as an indicator of tissue damage in disease. *Clin Chim Acta* 1980, 102, 29–40.
- [10] **Price RG, Dance N:** The demonstration of multiple heat stable forms of N-acetyl- β -D-glucosaminidase in normal human serum. *Biochim Biophys Acta* 1972, 271, 145–153.
- [11] **Bernard A, Thielemans N, Roels H:** Association between NAG-B and cadmium in urine with no evidence of threshold. *Occup Environ Med* 1995, 52, 177–180.
- [12] **Milnerowicz H, Zalewski J, Milnerowicz-Nabzyk E, Woytoń J:** Aktywność molekularnych form N-acetylo- β -D-glukozaminidazy w płynie owodniowym kobiet palących papierosy podczas ciąży powikłanej małowodziem lub przedwczesnym odpływaniem płynu owodniowego. *Ginekolog* 2000, 71, 4–8.
- [13] **Cobben NAM, Drent M, De Vries J, Wouters EF:** Serum β -glucuronidase activity in a population of ex-coalminers. *Clin Biochem* 1999, 32, 659–664.
- [14] **Emmerich J, Weber I, Nausch M, Sparmann G, Koch K, Seyfarth M, Lohr M, Liebe S:** Immunohistochemical characterization of the pancreatic cellular infiltrate in normal pancreas, chronic pancreatitis and pancreatic carcinoma. *Digestion* 1998, 59, 192–198.
- [15] **Maruhn D:** Rapid colorimetric assay of β -galactosidase and N-acetyl- β -glucosaminidase in human urine. *Clin Chem Acta* 1976, 73, 453–461.
- [16] **Nabzyk S, Milnerowicz H, Milnerowicz S, Knast W:** Przydatność skali Ransona w ocenie stanów zapalnych trzustki. *Gastroenterol Pol* 2002, 9, Supl. 1, 121.
- [17] **Nabzyk S, Milnerowicz H, Milnerowicz S, Knast W:** Stężenie interleukiny 6 w zapaleniu trzustki. *Gastroenterol Pol* 2002, 9, Supl. 1, 123.
- [18] **Norman J:** The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 1998, 175, 76–83.
- [19] **Wereszczyńska-Siemiatkowska U, Kajmiński K:** Rola cytokin i cząsteczek przylegania w ostrym zapaleniu trzustki. *Gastroenterol Pol* 2000, 7, 319–323.
- [20] **Leser HG, Gross V, Scheinbenbogen C:** Elevation of interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1991, 101, 782–791.
- [21] **Viedema JA, Perez-Mateo M, Dominguez JE:** Role of interleukin-6 in acute pancreatitis. Comparison with C-reactive protein and phospholipase A. *Gut* 1992, 33, 1264–1272.
- [22] **Perez-Blanco FJ, Munoz-Cassabon T, Miras-Parra F, Perez-Chica G, Rodriguez-Cuartero A:** Urinary activity of β -glucuronidase and excretion of glycosaminoglycans in the diagnosis of diabetic nephropathy. *Clin Nephrol* 2000, 53, 156–158.
- [23] **Rao GMM:** Serum beta-glycosidases in diabetes mellitus. *Clin Physiol Biochem* 1989, 7 (3–4), 161–164.
- [24] **Milnerowicz H, Chmerek M, Rabczyński J, Milnerowicz S, Nabzyk S, Knast W:** Immunohistochemical localization of metallothionein in chronic pancreatitis. *Pancreas* 2004, 29, 28–32.

Adres do korespondencji

Monika Chmerek
Zakład Biomedycznych Analiz Środowiskowych AM
ul. Grunwaldzka 2
50-355 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 30.01.2004 r.

Po recenzji: 13.07.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 23.07.2004 r.

Received: 30.01.2004

Revised: 13.07.2004

Accepted: 23.07.2004