

# Izoenzymy A i B N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy w tkance raka jelita grubego

## Isoenzymes A and B of N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase in tissue of colon cancer

Napoleon Waszkiewicz<sup>1</sup>, Beata Zalewska-Szajda<sup>2</sup>, Sylwia Chojnowska<sup>3</sup>, Alina Kępką<sup>4</sup>, Wioletta Zasadowska<sup>5</sup>, Paweł Kołodziejczyk<sup>6</sup>, Jacek Dadan<sup>7</sup>, Krzysztof Zwierz<sup>6</sup>, Jerzy Robert Ładny<sup>8</sup>, Sławomir Dariusz Szajda<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Klinika Psychiatrii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

<sup>2</sup>Zakład Radiologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

<sup>3</sup>Państwowa Wyższa Szkoła Informatyki i Przedsiębiorczości w Łomży

<sup>4</sup>Instytut „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie

<sup>5</sup>Oddział Chorób Wewnętrznych i Diagnostyki Onkologicznej z Pododdziałem Kardiologicznym Warmińsko-Mazurskiego Centrum Onkologii w Olsztynie

<sup>6</sup>Wyższa Szkoła Zawodowa Ochrony Zdrowia TWP w Łomży

<sup>7</sup>I Klinika Chirurgii Ogólnej i Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

<sup>8</sup>Zakład Medycyny Ratunkowej i Katastrof Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

Prz Gastroenterol 2012; 7 (6): 374–378

DOI: 10.5114/pg.2012.33045

**Słowa kluczowe:** N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidaza (HEX), izoenzymy HEX A i B, rak jelita grubego, tkanka nowotworowa.

**Key words:** N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase (HEX), isoenzymes HEX A and B, colon cancer, cancer tissue.

---

**Adres do korespondencji:** dr n. med. Napoleon Waszkiewicz, Klinika Psychiatrii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, 16-070 Choroszcz, tel.: +48 85 719 39 77, e-mail: napoleonwas@yahoo.com; napwas@wp.pl

### Streszczenie

**Wstęp:** Przewiduje się, że w Polsce na nowotwory jelita grubego w 2025 roku zachoruje około 15 500 mężczyzn i 9100 kobiet. Szacuje się, że z powodu nowotworów jelita grubego liczba zgonów mężczyzn zwiększy się prawie dwukrotnie, a kobiet o około 1/3. W usuwaniu zniszczonych przez nowotwór tkanek bierze udział N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidaza (HEX), która jest najaktywniejszą kwaśną egzoglikozydazą lizosomalną odszczepiającą reszty cukrowe z nieredukcyjnego końca łańcuchów oligosacharydowych glikokoniuatów (glikolipidów, glikoprotein i proteoglikanów). Badanie aktywności HEX może się przyczynić do lepszego diagnozowania i zmniejszenia liczby zgonów z powodu raka jelita grubego.

**Cel:** Ocena aktywności HEX oraz jej izoenzymów A i B w tkankach guza i w makroskopowo niezmiennych fragmentach jelita grubego.

**Materiał i metody:** Badano tkanki raka jelita grubego o stopniu dojrzałości komórkowej G2 pobrane od 17 chorych w wieku 39–82 lat (68,39  $\pm$  11,34 roku) z rozpoznaniem *adenocarcinoma* ( $n = 15$ ) i *adenocarcinoma mucinosum* ( $n = 2$ ) jelita grubego oraz tkanki jelita pobrane od tych samych chorych 5 cm od granic zmiany nowotworowej ( $n = 15$ ) stanowiące kontrolę. Aktywność HEX oraz jej izoenzymów A i B w tkankach oznaczano spektrofotometrycznie metodą Marciniak i wsp. Stężenie białka oznaczano metodą Lowry i wsp.

### Abstract

**Introduction:** It is anticipated that in Poland, colon cancer in 2025 will affect approximately 15 500 men and 9100 women. It is estimated that the number of deaths from colorectal cancer will almost double in the male population and increase by about 1/3 in women. In removing tissues damaged by cancer a role is played by N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase (HEX), which is the most active of lysosomal exoglycosidases removing sugar residues from the non-reducing end of oligosaccharide chains of glycoconjugates (glycolipids, glycoproteins and proteoglycans). Activity of HEX may be useful for diagnosis and reducing the incidence of colorectal cancer.

**Aim:** To evaluate the activity of HEX, HEX A and B in tumour tissues and macroscopically unchanged parts of the colon.

**Material and methods:** For analysis portions of colon cancer tissue with the degree of cell maturity G2 were obtained from 17 patients aged 39 to 82 years (68.39  $\pm$  11.34 years) diagnosed with adenocarcinoma ( $n = 15$ ) and mucinous adenocarcinoma ( $n = 2$ ), as well as colon tissue fragments collected from the same patients from locations distant (5 cm) from the tumour ( $n = 15$ ) constituting the control. The activity of HEX and its isoenzymes A and B in the tissues was determined spectrophotometrically by the method of Marciniak et al. Protein concentration was determined by the method of Lowry et al.

**Wyniki:** W tkance raka jelita grubego w porównaniu z niezmienioną makroskopowo kontrolną tkanką jelita grubego wykazano istotny wzrost aktywności HEX oraz jej izoenzymów A i B. Na podstawie klasyfikacji Duke'a stwierdzono istotny wzrost aktywności izoenzymu B u chorych z guzami jelita grubego klasy A, B i C oraz aktywności HEX i HEX A w guzach jelita grubego klasy C w porównaniu z tkankami niezmienionymi nowotworowo. HEX B wykazuje istotnie wyższą aktywność w guzach raka jelita grubego w klasie A w porównaniu z klasą B.

**Wnioski:** W raku jelita grubego dochodzi do wzmożonego katabolizmu glikokoniuatów w porównaniu z tkanką kontrolną jelita, o czym świadczy istotny wzrost aktywności HEX oraz jej izoenzymów A i B w tkance raka jelita grubego w porównaniu z tkanką kontrolną. We wczesnej fazie rozwoju raka jelita grubego oraz w klasie A w porównaniu z klasą B następuje istotny wzrost katabolizmu obojętnych glikokoniuatów, o czym świadczy istotny wzrost aktywności HEX B we wczesnej fazie rozwoju raka jelita grubego w porównaniu z tkanką kontrolną jelita oraz w klasie A w porównaniu z klasą B.

**Results:** Tissues of colorectal cancer, compared to control tissue of the macroscopically unchanged colon, showed a significant increase in the activity of HEX and its isoenzymes A and B. Based on Duke's classification there was found a significant increase in activity of HEX B in tissue of colorectal tumours of class A, B and C and the activity of HEX and HEX A in the tissue of colon tumours of class C, in comparison to the unchanged colon tissue. HEX B shows a significantly higher activity in the tumours of colorectal cancer class A as compared to class B.

**Conclusions:** Colorectal cancer increases glycoconjugate catabolism in comparison to remote colon tissue, reflected by a significant increase in the activity of HEX and its isoenzymes A and B in the tissue of colorectal cancer, as compared to controls. In the early stages of colorectal cancer mainly catabolism of neutral glycoconjugates increases, reflected by a significant increase in HEX B activity, as compared to control, and in carcinomas of class A in comparison to class B according to Duke's classification.

## Wstęp

Prognoza dla Polski zakłada szybki wzrost zachorowalności na nowotwory jelita grubego i umieralności z ich powodu mężczyzn w wieku średnim (45–64 lata) i dojrzałym (po 65. roku życia). Wśród kobiet prognozuje się niewielki wzrost zachorowalności i dalsze ograniczenie umieralności [1]. Szacuje się, że na nowotwory jelita grubego w 2025 roku zachoruje około 15 500 mężczyzn i 9100 kobiet [1]. W ciągu najbliższych dwóch dekad liczba zgonów z powodu nowotworów jelita grubego zwiększy się prawdopodobnie w populacji mężczyzn prawie dwukrotnie (do około 10 000) i o około 1/3 w populacji kobiet (do 6400) [1].

W usuwaniu glikokoniuatów (glikolipidów, glikoprotein i proteoglikanów) tkanek zniszczonych przez nowotwór bierze udział N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidaza – HEX (E.C. 3.2.1.25), najaktywniejsza kwaśna egzoglikozydaza lizosomalna odszczepiająca reszty N-acetyloglucozamiiny (GlcNAc) i N-acetylogalaktozamiiny (GalNAc) z nieredukcyjnego końca łańcuchów oligosacharydowych glikokoniuatów [2, 3].

Wcześniejsze badania wskazują na dużą wartość diagnostyczną oznaczenia stężenia HEX i jej izoenzymów A i B w surowicy, a także stężenia HEX oraz jej izoenzymów A i B w przeliczeniu na kreatyninę w moczu chorych na raka jelita grubego. Także oznaczanie aktywności specyficznej HEX i izoenzymu A w moczu ma wartość diagnostyczną w wykrywaniu raka jelita grubego [4].

## Cel

Celem badań była ocena aktywności HEX oraz jej izoenzymów A i B w guzach nowotworowych pobranych od

chorych z gruczolakorakiem jelita grubego i gruczolakorakiem śluzotwórczym jelita grubego, z uwzględnieniem typu histopatologicznego, klasyfikacji Duke'a oraz płci.

## Materiał i metody

Podczas zabiegu chirurgicznego pobrano fragmenty tkanki nowotworowej o stopniu dojrzałości komórkowej G2 od 17 chorych (11 kobiet i 6 mężczyzn) w wieku 39–82 lat (średnia: 68,39  $\pm$  11,34 roku) z rozpoznaniem gruczolakorakiem ( $n = 15$ ) i gruczolakorakiem śluzotwórczym ( $n = 2$ ) jelita grubego oraz fragmenty jelita pobranego z miejsc odległych od zmiany nowotworowej o 5 cm (granica czystości onkologicznej) ( $n = 15$ ). Cztery wycięte nowotwory nie przekraczały ściany jelita (klasa A według Duke'a), 5 wyciętych nowotworów przekraczało ścianę jelita do surowicówki lub tkanki tłuszczowej okołoodbytniczej (klasa B), a 8 dało przerzuty do węzłów chłonnych (klasa C). Materiał do badań uzyskano od pacjentów leczonych w I Klinice Chirurgii Ogólnej i Endokrynologii Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku (RI-003/300/2006).

Fragmenty tkanek zawieszano w oziębionym 0,15-molowym roztworze KCl zawierającym 0,2% trytonu X-100 w stosunku wagowo-objętościowym 1 : 9 i homogenizowano za pomocą homogenizatora nożowego Ultra-turrax T8 IKA-Werke w naczyniach obłożonych lodem. Homogenaty wirowano przy 10 000  $\times$  g w ciągu 30 min w temperaturze +4°C. Płyn nadosadowy przechowywano w temperaturze –80°C.

N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazę i jej izoenzymy A i B oznaczano metodą Marciniak i wsp. [5] w modyfika-

cji Szajdy i wsp. [4, 6]. Do 10 µl odpowiednio rozcieńczonego płynu nadosadowego z odwirowanego homogenatu dodawano 40 µl 0,1-molowego buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 i 30 µl 20-milimolowego roztworu substratu (4-nitrofenylo-N-acetylo-β-D-glukozaaminid – Sigma, St. Louis, MO, USA) w 0,1-molowym buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 4,7. Mieszankę inkubowano 60 min w temperaturze 37°C. Reakcję przerywano przez dodanie 200 µl 0,2-molowego buforu boranowego o pH 9,8. W celu oznaczenia aktywności izoenzymu B do 10 µl odpowiednio rozcieńczonego płynu nadosadowego z odwirowanego homogenatu dodawano 40 µl 0,1-molowego buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 i preinkubowano 180 min w temperaturze 50°C w celu dezaktywacji termolabilnego izoenzymu A, a następnie dodawano 30 µl 20-milimolowego roztworu substratu i inkubowano 60 min w temperaturze 37°C. Reakcję przerywano przez dodanie 200 µl 0,2-molowego buforu boranowego o pH 9,8. Aktywność izoenzymu A obliczano z różnicy między aktywnością HEX i HEX B (HEX A = HEX – HEX B). Aktywność HEX i HEX B, odpowiadającą ilości uwolnionego *p*-nitrofenolu z 4-nitrofenylo-N-acetylo-β-D-glukozaaminidu, mierzono przy długości fali 405 nm przy użyciu czytnika płytek ELx800 i programu komputerowego KC junior (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA).

Białko w homogenatach tkanek oznaczano metodą Lowry'ego i wsp. [7]. Stężenie białka odczytywano z krzywej wzorcowej sporządzonej dla liofilizowanej albuminy (Sigma, St. Louis, MO, USA). Aktywności HEX oraz jej izoenzymów A i B wyrażono w nKat na 1 mg białka (aktywność specyficzna) i w nKat na 1 g mokrej tkanki.

### Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wyników testem Manna-Whitneya wykorzystano program SPSS® 8.0 for Windows PL (SPSS, Chicago, IL, USA). Korelacje badano przy

użyciu testu Spearmana. Wartości *p* mniejsze niż 0,05 uznano za statystycznie istotne. Badania powtarzalności (precyzji w serii) oznaczania HEX wykonano w 6 nadsączach z homogenatów tkanek kontrolnych jelita grubego (oddalonych od guza o 5 cm).

### Wyniki

Współczynnik zmienności pomiarów aktywności HEX wykonanych w 6 próbkach makroskopowo niezmiennego jelita pobranych podczas operacji od pacjentów z gruczolakorakiem jelita grubego wynosił  $4,69 \pm 0,66$ .

Badanie wskazuje na istotny wzrost aktywności specyficznej (nKat/1 mg białka) oraz stężenia (nKat/1 g mokrej tkanki) HEX i jej izoenzymów A i B w tkankach gruczolakoraka jelita grubego w porównaniu z makroskopowo niezmiennymi fragmentami kontrolnymi jelita (tab. I). W porównaniu z tkanką kontrolną na podstawie klasyfikacji Duke'a stwierdzono istotnie wyższą aktywność specyficzną HEX B oraz stężenie HEX i HEX B w guzach jelita grubego klasy A, istotnie wyższą aktywność specyficzną HEX B i stężenie HEX, jej izoenzymów A i B w guzach klasy B oraz istotnie wyższą aktywność specyficzną i stężenie w klasie C (tab. II). Odnotowano także istotnie wyższą aktywność specyficzną HEX B oraz stężenie HEX i HEX B w tkance raka jelita grubego klasy A w porównaniu z klasą B. Nie stwierdzono natomiast istotnych różnic między aktywnością HEX i jej izoenzymów A i B w tkankach raka jelita grubego kobiet i mężczyzn (tab. III).

Nie odnotowano istotnych zależności (korelacji) między aktywnością specyficzną HEX ( $r = -0,4360$ ,  $p = 0,119$ ), HEX A ( $r = -0,2370$ ,  $p = 0,415$ ) i HEX B ( $r = -0,43875$ ,  $p = 0,171$ ) oraz stężeniem HEX ( $r = -0,4375$ ,  $p = 0,118$ ), HEX A ( $r = -0,3566$ ,  $p = 0,211$ ) i HEX B ( $r = -0,2411$ ,  $p = 0,406$ ) a etapem rozwoju nowotworu według klasyfikacji Duke'a.

**Tabela I.** Aktywności HEX oraz jej izoenzymów A (HEX A) i B (HEX B) w guzie raka jelita grubego i kontrolnych fragmentach jelita w zależności od typu histopatologicznego zmiany

**Table I.** The activity of HEX and its isoenzymes A (HEX A) and B (HEX B) in the colon cancer tissue and control colon tissue fragments depending on histopathological change

	n	Aktywność					
		specyficzna [nKat/1 mg białka]			stężenie [nKat/1 g mokrej tkanki]		
		HEX	HEX A	HEX B	HEX	HEX A	HEX B
Grupa kontrolna (c)	15	2,21 ±1,73	1,48 ±1,02	0,73 ±0,56	48,19 ±37,69	32,18 ±26,55	16,01 ±12,15
<b>Typ histopatologiczny zmiany</b>							
gruczolakorak (I)	15	5,12 ± 2,09	3,07 ±1,66	2,05 ±1,21	127,43 ±44,12	72,97 ±26,17	54,46 ±37,79
gruczolakorak śluzotwórczy (II)	2	4,70 ± 0,50	3,66 ±0,17	1,04 ±0,33	118,92 ±21,17	92,44 ±10,91	26,48 ±10,26
<b>Wartość p</b>		< 0,001	0,003	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,001

**Tabela II.** Aktywności HEX oraz jej izoenzymów A (HEX A) i B (HEX B) w guzie raka jelita grubego i kontrolnych fragmentach jelita w zależności od klasyfikacji Duke'a

**Table II.** The activity of HEX and its isoenzymes A (HEX A) and B (HEX B) in the colon cancer tissue and control colon tissue fragments depending on Duke classification

	n	Aktywność					
		specyficzna [nKat/1 mg białka]			stężenie [nKat/1 g mokrej tkanki]		
		HEX	HEX A	HEX B	HEX	HEX A	HEX B
<b>Klasyfikacja Duke'a</b>							
A	4	6,31 ±1,76	3,32 ±1,64	2,99 ±0,83	160,96 ±19,01	83,55 ±28,69	77,41 ±17,39
B	5	4,88 ±2,76	3,67 ±2,29	1,21 ±0,57	107,06 ±37,90	80,10 ±35,10	26,96 ±6,76
C	8	4,57 ±1,38	2,71 ± 1,01	1,86 ±1,31	121,26 ±44,94	68,08 ±17,64	53,18 ±45,78
<b>Wartość p</b>							
(A/kontrola)		0,059	0,251	0,012	0,012	0,109	0,003
(B/kontrola)		0,057	0,076	0,035	0,010	0,023	0,003
(C/kontrola)		< 0,001	0,004	0,015	< 0,001	< 0,001	0,024
(A/B)		0,402	0,802	0,006	0,036	0,878	< 0,001
(A/C)		0,144	0,534	0,099	0,057	0,376	0,217
(B/C)		0,820	0,415	0,248	0,554	0,506	0,152

**Tabela III.** Aktywności HEX oraz jej izoenzymów A (HEX A) i B (HEX B) w guzie raka jelita grubego i kontrolnych fragmentach jelita w zależności od płci

**Table III.** The activity of HEX and its isoenzymes A (HEX A) and B (HEX B) in the colon cancer tissue and control colon tissue fragments depending on gender

	n	Aktywność					
		specyficzna [nKat/1 mg białka]			stężenie [nKat/1 g mokrej tkanki]		
		HEX	HEX A	HEX B	HEX	HEX A	HEX B
<b>Płeć</b>							
kobiety	11	5,46 ±2,12	3,37 ±1,75	2,09 ±1,10	134,17 ±39,05	80,55 ±27,37	53,62 ±30,54
mężczyźni	6	4,36 ±1,53	2,72 ±1,18	1,64 ±1,38	112,22 ±46,28	65,54 ±20,08	46,68 ±48,93
<b>Wartość p</b>							
(kobiety/mężczyźni)		0,24036	0,37894	0,50756	0,34996	0,21871	0,76121

## Omówienie

Rola HEX i jej izoenzymów A i B w procesie nowotworzenia nie jest dokładnie poznana. Wydaje się, że podobnie jak inne endo- [8] i egzoglikozydazy [9, 10] mogą one uczestniczyć w niszczeniu tkanki przez guz, wpływać na interakcje komórka–komórka i/lub degradację macierzy wewnątrzkomórkowej [11, 12]. Zdaniem Lewa i wsp. [13] HEX A działający na kwaśne substraty, takie jak glikozoaminoglikany i glikolipidy oraz glikoproteiny zawierające kwasy sialowe, jest mediatorem stanu zapalnego wydzielanym do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, odzwierciedla w płynach ustrojowych aktywność metaboliczną i wydzielniczą komórek. HEX B działający na obojętne łańcuchy oligosacharydowe jest wskaźnikiem uszkodzenia komórek [13].

Badania własne wskazują na istotny wzrost aktywności specyficznej i stężenia HEX, jej izoenzymów A i B w tkance gruczolakoraka jelita grubego w porównaniu z fragmentami tkanki kontrolnej (tab. I). W badaniach wykazano, że HEX B już od wczesnej fazy (klasa A według Duke'a) uczestniczy w rozwoju raka jelita grubego (tab. II). Badania własne potwierdziły wyniki Plucinsky'ego i wsp. [14], którzy nie stwierdzili zależności między aktywnością HEX i HEX B w tkance guza jelita grubego a fazą rozwoju nowotworu według klasyfikacji Duke'a. Analiza uzyskanych wyników własnych wskazuje na brak zależności między aktywnością HEX i jej izoenzymów A i B w tkance zdrowej i nowotworowej a płcią.

Wychodząc z założenia, że HEX i jej izoenzymy przechodzą do kału razem ze złuszczonejmi komórkami gru-

czolakoraka, w badaniach własnych sugeruje się celowość przeprowadzenia prób oznaczania aktywności HEX w kale pacjentów z rakiem jelita grubego. Jeżeli uda się oznaczyć aktywność HEX i jej izoenzymów w kale i wykazać jej znamieny wzrost u pacjentów z rakiem jelita grubego, może to być podstawą opracowania metody uzupełniającej oznaczenia krwi utajonej w kale, uznawanej obecnie za badanie przesiewowe w kierunku raka jelita grubego [15].

## Wnioski

Istotnie wyższa aktywność HEX i jej izoenzymów A i B w tkankach guza jelita grubego w porównaniu z tkanką jelita grubego makroskopowo niezmienną wskazuje na wzrost katabolizmu glikokoniugatów w tkance raka jelita grubego. Wykrycie oznaczalnych aktywności HEX i jej izoenzymów w kale pacjentów z nowotworami jelita grubego może być podstawą opracowania markera użytecznego w badaniach przesiewowych w kierunku raka jelita grubego.

### Piśmiennictwo

- Didkowska J, Wojciechowska U, Zatoński W. Prognozy zachorowalności i umieralności na nowotwory złośliwe w Polsce do 2025 roku. Centrum Onkologii Instytut im. M. Skłodowskiej-Curie, Warszawa 2009: 23-8.
- Winchester B. Lysosomal metabolism of glycoproteins. *Glycobiology* 2005; 15: 1R-15R.
- Zwierz K, Zalewska A, Zoch-Zwierz W. Isoenzymes of N-acetyl-beta-hexosaminidase. *Acta Biochim Polon* 1999; 46: 739-51.
- Szajda SD, Borzym-Kluczyk M, Snarska J, et al. N-acetyl-beta-D-hexosaminidase and its isoenzymes A and B in blood serum and urine, as a potential colon cancer markers. *Hepatogastroenterology* 2009; 56: 1287-98.
- Marciniak J, Zalewska A, Popko J, Zwierz K. Optimization of an enzymatic method for the determination of lysosomal N-acetyl-beta-D-hexosaminidase and beta-glucuronidase in synovial fluid. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 933-7.
- Szajda SD, Snarska J, Puchalski Z, Zwierz K. Lysosomal exoglycosidases in serum and urine of patients with colon adenocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 2008; 55: 921-5.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
- Styputkowska A, Zwierz P, Zwierz K. Endoglikozydazy i glikoamidazy. *Post Bioch* 2004; 50: 82-7.
- Chojnowska S, Kęпка A, Szajda SD, et al. Exoglycosidase markers of diseases. *Biochem Soc Trans* 2011; 39: 406-9.
- Waszkiewicz N, Szajda SD, Zalewska A, et al. Alcohol abuse and glycoconjugate metabolism. *Folia Histochem Cytochem* 2012; 50: 1-11.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular biology of the cell*. Garland Science, N.Y., 2002; 1313-62.
- Laferte S, Loh LC. Characterization of a family of structurally related glycoproteins expressing beta1-6-branched asparagi-
- ne-linked oligosaccharides in human colon carcinoma cells. *Biochem J* 1992; 283: 193-201.
- Lew DB, Dempsey BK, Zhao Y, et al. Beta-hexosaminidase-induced activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase is dependent on p21Ras and protein kinase C and mediates bovine airway smooth-muscle proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21: 111-8.
- Plucinsky MC, Prorok JJ, Alhadeff JA. Beta-hexosaminidase from colon and sera of dukes-classified colorectal cancer patients: activity levels, isozyme patterns, and kinetic properties. *J Natl Cancer Inst* 1986; 77: 57-62.
- Kasztelan-Szczerbińska B, Cichoż-Lach H, Słomka M. Rak jelita grubego jako problem zdrowia publicznego – ocena aktualnych możliwości diagnostycznych. *Pol Arch Med Wewn* 2008; 118: 1-3.