

**Wstęp:** N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidaza (HEX) jest lizosomalną egzoglikozydazą (EC 3.2.1.52), odcinającą N-acetyloheksosozoaminy od nieredukcyjnego końca łańcuchów oligosacharydowych glikoprotein, glikolipidów, proteoglikanów). Oznaczanie aktywności HEX w tkankach i płynach ustrojowych zastosowano w diagnostyce genetycznych chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa oraz uszkodzenia wątroby i nerek.

Celem pracy była ocena aktywności HEX (potencjalnego markera nowotworowego) w surowicy krwi i moczu chorych z gruczolakorakiem trzustki.

**Materiał i metody:** Krew i mocz pobrano od 7 osób leczonych w I Klinice Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej AM w Białymstoku, w wieku od 44 do 74 lat, z rakiem trzustki (*adenocarcinoma*), potwierdzonym histopatologicznie, oraz 8 osób zdrowych w wieku od 22 do 31 lat.

Aktywność HEX oznaczano metodą Chatterjee i wsp. w modyfikacji Zwierza i wsp. Do pomiaru ilości p-nitrofenolu uwolnionego przez HEX z p-nitrofenilo- $\beta$ -D-N-acetyloglukozoaminopiranozydu (Sigma), użyto czytnika płytek EL<sub>800</sub> firmy BIO-TEK. Stężenie aktywności HEX wyrażono w pKat/mL, a aktywność specyficzną w pKat/mg białka. Stężenie białka w surowicy krwi oznaczano metodą biuretową, w moczu metodą Lowry, a wyniki wyrażano w mg/mL.

**Wyniki:** Stężenie aktywności oraz aktywność specyficzną HEX w surowicy krwi chorych na raka trzustki są ponad trzy razy wyższe od aktywności w surowicy krwi osób zdrowych ( $p < 0,02$ ). Aktywność specyficzną HEX w moczu chorych na raka trzustki jest ponad 2 razy wyższa od aktywności HEX w moczu osób zdrowych ( $p < 0,02$ ).

**Wnioski:** Otrzymane wyniki sugerują możliwość wykorzystania oznaczania HEX w surowicy krwi i moczu w diagnostyce gruczolakoraka trzustki.

**Słowa kluczowe:** rak, trzustka, heksozaminidaza, surowica krwi, mocz.

## Aktywność N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy w surowicy krwi i moczu chorych na raka trzustki

*The activity of N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase in serum and urine of patients with pancreatic cancer*

Stawomir Dariusz Szajda<sup>1</sup>, Jadwiga Snarska<sup>2</sup>, Fabian Kamiński<sup>2</sup>, Katarzyna Siedlecka<sup>1</sup>, Napoleon Waszkiewicz<sup>3</sup>, Małgorzata Knaś<sup>1</sup>, Krzysztof Zwierz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biochemii Farmaceutycznej, Akademia Medyczna w Białymstoku

<sup>2</sup>I Klinika Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej, Akademia Medyczna w Białymstoku

<sup>3</sup>Klinika Psychiatrii, Akademia Medyczna w Białymstoku

### Wstęp

Diagnostyka raka trzustki wykorzystuje metody obrazowe: USG i tomografię komputerową oraz markery białkowe towarzyszące rakowi trzustki: antygen kanceroembrionalny (CEA), antygen nowotworowy przewodu pokarmowego (CA 19-9) i węglowodanowy antygen nowotworowy (CA 50) [1, 2]. Nieliczne są natomiast informacje o przydatności badania aktywności enzymów płynów biologicznych w diagnostyce onkologicznej zmian nowotworowych, w tym raka trzustki.

N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidaza [HEX] (EC 3.2.1.52) jest lizosomalną egzoglikozydazą, która odszczepia reszty N-acetyloglukozoaminy lub N-acetylogalaktozoaminy z nieredukcyjnego końca łańcuchów oligosacharydowych glikolipidów, glikoprotein i proteoglikanów [3]. Zmiany aktywności HEX mogą wpływać na katabolizm i organizację komórek oraz istoty międzykomórkowej w chorobie nowotworowej. Choroba nowotworowa cechuje się wzmożoną proliferacją wynikającą z rozkojarzenia mechanizmów regulacyjnych oraz naprawczych, zabezpieczających prawidłowe dojrzewanie i podział komórek oraz różnicowanie, wzrost i odnowę tkanek, migrację komórek zmienionych nowotworowo oraz przebudowę i organizację struktury macierzy międzykomórkowej [4].

Celem naszych badań jest ocena przydatności oznaczania aktywności lizosomalnej egzoglikozydazy (HEX) w surowicy krwi i moczu w diagnostyce chorych z gruczolakorakiem trzustki (*adenocarcinoma*).

### Materiał i metody

Badanie przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej Akademii Medycznej w Białymstoku (Nr zgody: R-I-003/153/2005). Krew z żyły łokciowej i mocz ze środkowego strumienia rannej porcji pobierano od 7 pacjentów (2 kobiet i 5 mężczyzn) w wieku od 44 do 74 lat (średnia 61,17 $\pm$ 10,42 lat) z rozpoznaniem gruczolakorakiem trzustki (*adenocarcinoma*), niepoddanych chemioterapii ani radioterapii, leczonych operacyjnie w I Klinice Chirurgii Ogólnej i Endokrynologicznej AM w Białymstoku, oraz 8 zdrowych mężczyzn w wieku od 22 do 31 lat (średnia 27,25 $\pm$ 2,49 lat).

Surowicę (po skrzepnięciu krwi) i mocz wirowano przy 4 000 x g w ciągu 10 min. Płyn nadosadowy przechowywano w temperaturze -20°C.

Aktywność HEX oznaczano metodą Chatterjee i wsp. [5] w modyfikacji Zwierza i wsp. [6]. Do 10  $\mu$ l surowicy krwi lub moczu dodawano 40  $\mu$ l 0,1 M

**Background:** N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase (HEX) is lysosomal exoglycosidase (EC 3.2.1.52), which releases N-acetylhexosamines from non reducing ends of oligosaccharide chains of glycoconjugates (glycoproteins, glycolipids and proteoglycans). Determination of HEX activity in tissues and body fluids was applied in diagnostics of Tay-Sachs and Sandhoff's, as well as, kidney and liver diseases.

The aim of our work was to evaluate the activity of HEX in blood serum and urine of patients with pancreatic cancer, as a potential cancer marker.

**Material and methods:** Blood and serum were taken from 7 patients (44-77 years old) with histopathologically confirmed adenocarcinoma of the pancreas, in I Department of General and Endocrinological Surgery, Medical University, Białystok, Poland, and 8 (22-31 years old) healthy volunteers.

The activity of HEX was determined by Chatterjee et al method as modified by Zwierz et al. Amount of p-nitrophenol released from p-nitrophenyl- $\beta$ -D-N-acetylglucosaminepyranoside (Sigma) was evaluated on microplate reader *ELx800*, BIO-TEK at 410 nm. The concentration of HEX activity was expressed in pKat/mL, and specific activity in pKat/mg protein. Protein in serum was determined by the biuret, and in urine by the Lowry method.

**Results:** Concentration and specific of the HEX activity in serum of patients with pancreatic cancer were more than three times higher than concentration and specific of HEX activity in serum of healthy persons ( $p < 0.02$ ). Specific activity of HEX in urine of patients with pancreatic cancer was more than twice higher, than concentration of HEX in urine of healthy persons ( $p < 0.02$ ).

**Conclusions:** Our results suggest possibility of the determination of the HEX activity in serum and urine as a marker of pancreatic cancer.

**Key words:** cancer, pancreas, hexosaminidase, serum, urine.

buforu fosforanowo-cytrynianowego o pH 4,7 oraz 30  $\mu$ l 20 mM roztworu substratu (p-nitrofenyl- $\beta$ -D-N-acetyloglukozoaminopiranozydu, firmy Sigma USA) w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 4,7. Mieszanię inkubowano 60 min w temperaturze 37°C. Reakcję przerwano dodając 200  $\mu$ l 0,2 M buforu boranowego o pH 9,8. Pomiaru p-nitrofenolu uwolnionego z p-nitrofenyl- $\beta$ -D-N-acetyloglukozoaminopiranozydu dokonywano w 410 nm, za pomocą czytnika płytek *ELx800* i programu komputerowego KC junior firmy BIO-TEK.

Białko w surowicy krwi oznaczano metodą biuretową [7]. Do 50  $\mu$ l surowicy krwi dodawano 2 450  $\mu$ l odczynnika biuretowego. Próby inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Absorbancję powstałego kompleksu o barwie niebiesko-purpurowej mierzono za pomocą spektrofotometru Specol 221 przy długości fali 550 nm. Stężenie białka odczytano z krzywej wzorcowej sporządzonej z 0,05 proc. roztworu liofilizowanej albuminy wołowej (firmy POCH Gliwice, Polska) w 0,1 M buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 4,7.

Białko całkowite w moczu oznaczano metodą Lowry [8]. Do 200  $\mu$ l odpowiednio rozcieńczonego moczu dodawano 1 000  $\mu$ l odczynnika miedziowego sporządzonego bezpośrednio przed wykonaniem oznaczenia. Po 10 min do mieszaniny dodawano stale mieszając na wytrząsarce 100  $\mu$ l odczynnika Folina i Ciocalteau. Próby inkubowano przez 30 min w temperaturze pokojowej. Absorbancję powstałego kompleksu o barwie niebiesko-purpurowej mierzono za pomocą spektrofotometru Specol 221 przy długości fali 750 nm. Stężenie białka odczytano z krzywej wzorcowej sporządzonej z 30 mg liofilizowanej albuminy wołowej firmy POCH Gliwice, Polska w 100 ml 0,25 M roztworze sacharozy.

Stężenie aktywności HEX w surowicy krwi i moczu wyrażono w pKat/mL, a aktywność specyficzną w pKat/mg białka.

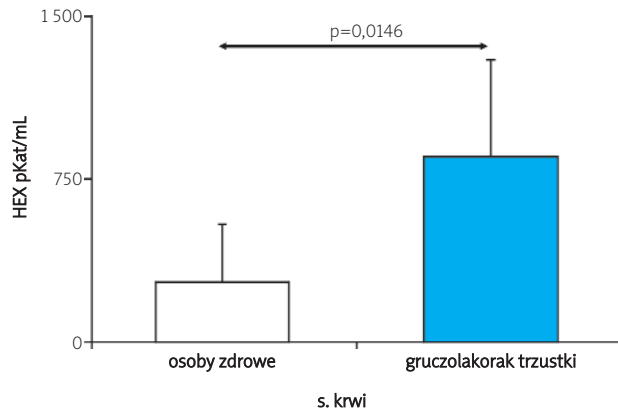
Do analizy statystycznej testem Manna-Whitney'a wykorzystano pakiet statystyczny SPSS® 8.0 for Windows PL (SPSS, Chicago, IL, USA). Za poziom istotności statystycznej przyjęto  $p < 0,05$ .

## Wyniki

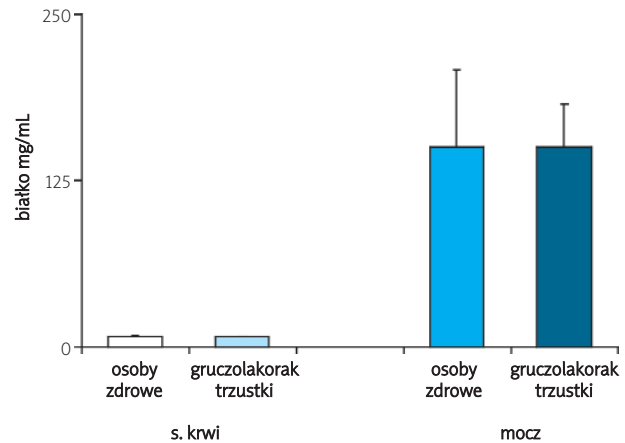
Stężenie aktywności HEX w surowicy krwi chorych z gruczolakorakiem trzustki wynosiło od 440,81 do 1 725,57 pKat/mL (średnio 845,52 $\pm$ 449,51 pKat/mL), a w surowicy krwi zdrowych mężczyzn od 221,49 do 380,44 pKat/mL (średnio 270,78 $\pm$ 60,93 pKat/mL) – ryc. 1. Jak wynika z ryc. 1. stężenie aktywności HEX w surowicy chorych na raka trzustki było istotnie wyższe w porównaniu do aktywności HEX w surowicy zdrowych mężczyzn ( $p < 0,02$ ).

Nie było istotnych statystycznie różnic ( $p = 0,3947$ ) między stężeniem białka w surowicy krwi chorych z rakiem trzustki (7,30–9,13 mg/mL, średnio 7,8 $\pm$ 0,71 mg/mL) i surowicy krwi zdrowych mężczyzn (7,50–9,00, średnio 8,24 $\pm$ 0,51 mg/mL) oraz między stężeniem w moczu ( $p = 0,9626$ ) chorych z rakiem trzustki (111,00–206,00 mg/mL, średnio 150,00 $\pm$ 32,12 mg/mL) i zdrowych mężczyzn (52,50–218,00 mg/mL, średnio 150,69 $\pm$ 57,82 mg/mL) – ryc. 2.

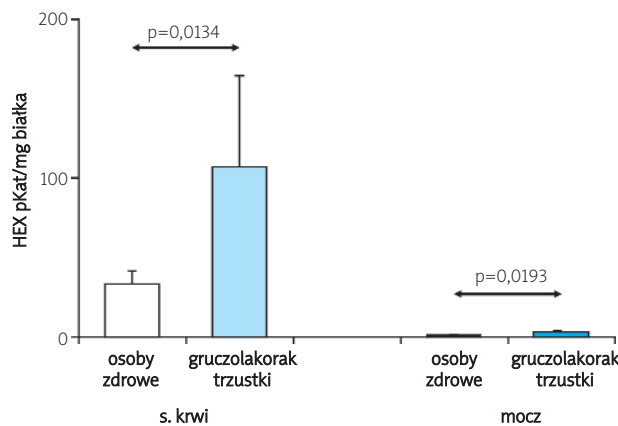
Aktywność specyficzną HEX w surowicy krwi chorych z gruczolakorakiem trzustki wynosiła od 48,31 do 214,36 pKat/mg białka (średnio 107,06 $\pm$ 56,73 pKat/mg białka), a w surowicy krwi zdrowych mężczyzn od 26,55 do 47,56 pKat/mg białka (średnio 33,08 $\pm$ 8,50 pKat/mg białka). Aktywność specyficzną HEX w moczu chorych z gruczolakorakiem trzustki wynosiła od 0,93 do 4,10 pKat/mg białka (średnio 2,55 $\pm$ 1,27 pKat/mg białka), a w moczu zdrowych mężczyzn od 0,70 do 1,33 pKat/mg białka (średnio 1,03 $\pm$ 0,29 pKat/mg białka) – ryc. 3. Jak wynika z ryc. 3. aktywność specyficzną HEX w surowicy krwi i moczu pacjentów z gruczolakorakiem trzustki jest istotnie wyższa od aktywności specyficzną HEX w surowicy i moczu zdrowych mężczyzn ( $p < 0,02$ ).



**Ryc. 1.** Stężenie aktywności N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy (pKat/mL) w surowicy krwi i moczu chorych z gruczolakorakiem trzustki  
**Fig. 1.** Activity concentration of N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase (pKat/mL) in blood serum and urine of patients with pancreatic cancer



**Ryc. 2.** Stężenie białka (mg/mL) w surowicy krwi i moczu chorych z gruczolakorakiem trzustki  
**Fig. 2.** Concentration (mg/mL) of protein in blood serum and urine of patients with pancreatic cancer



**Ryc. 3.** Aktywność specyficzna N-acetylo- $\beta$ -D-heksozaminidazy (pKat/mg białka) w surowicy krwi i moczu chorych z gruczolakorakiem trzustki  
**Fig. 3.** Specific activity of N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase (pKat/mg protein) in blood serum and urine of patients with pancreatic cancer

## Omówienie wyników

Aktywność HEX stwierdzono w: nerce [9], wątrobie [10], błonie śluzowej żołądka i jelit [11], łożysku [12], a także w płynach biologicznych: surowicy krwi, moczu [9], płynie mózgowo-rdzeniowym [13] oraz płynie stawowym [14]. Podwyższoną aktywność HEX w surowicy krwi zaobserwowano u chorych z rakiem nerki [9].

Nasze wstępne badania wskazały na podwyższenie aktywności HEX w surowicy krwi chorych z gruczolakorakiem trzustki, w porównaniu do aktywności HEX w surowicy krwi osób zdrowych [15]. Potwierdzeniem poprzednio uzyskanych wyników są dane zamieszczone na ryc. 1. i 3., w których obok istotnie ( $p < 0,02$ ) wyższych stężeń aktywności i aktywności specyficznej HEX w surowicy krwi chorych na raka trzustki w porównaniu do zdrowych mężczyzn, stwierdzono istotny wzrost ( $p < 0,02$ ) aktywności specyficznej HEX w moczu w porównaniu do zdrowych mężczyzn. Jak wynika z ryc. 1. i 3., stężenie aktywności oraz

aktywność specyficzna HEX w surowicy krwi chorych na raka trzustki są ponad 3 razy wyższe od stężenia aktywności oraz aktywności specyficznej HEX w surowicy krwi osób zdrowych. Aktywność specyficzna HEX w moczu chorych na raka trzustki jest ponad 2 razy wyższa od aktywności tego enzymu w moczu osób zdrowych. Stężenia aktywności HEX w surowicy krwi wskazują na wyraźną linię odcięcia między wartością liczbową najniższą (minimalną) chorych z rakiem trzustki – stężenie aktywności HEX=440,81 pKat/mL i aktywność specyficzna HEX=48,31 pKat/mg białka, a wartością liczbową najwyższą (maksymalną) zdrowych mężczyzn – stężenie aktywności HEX=380,44 pKat/mL i aktywność specyficzna HEX=47,56 pKat/mg białka. Podobnej zależności nie zaobserwowano w badaniu aktywności specyficznej HEX w moczu.

Wykazanie obniżonej aktywności HEX w tkankach i surowicy krwi decyduje o rozpoznaniu genetycznych chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa [3]. Oznaczenie aktywności HEX w moczu znalazło zastosowanie w monitorowaniu nefrotoksyczności leków [18, 19], stanu czynnościowego nerki po transplantacji [20] i monitorowaniu stanu zdrowia pacjentów z nowotworami nerek [9]. Wykazano, że na aktywność HEX nie wpływają wahania dobowe ilości wydalanego moczu, kwaśne pH, czy obecność elementów morfotycznych [16, 17].

Reasumując – łatwość oraz niskie koszty oznaczenia HEX w surowicy i moczu predestynują do zastosowania HEX w rozpoznaniu, różnicowaniu i monitorowaniu leczenia nowotworów złośliwych, w tym gruczolakoraka trzustki.

## Wnioski

Oznaczenie aktywności HEX w surowicy krwi i moczu może być wykorzystane w diagnostyce gruczolakoraka trzustki.

## Piśmiennictwo

- Ozkan H, Kaya M, Cengiz A. Comparison of tumor marker CA 242 with CA 19-9 and carcinoembryonic antigen (CEA) in pancreatic cancer. *Hepatogastroenterology* 2003; 50: 1669-74.

2. Lygidakis NJ, Jain S, Sacchi M, Vrachnos P. Adenocarcinoma of the pancreas-past, present and future. *Hepato-gastroenterology* 2005; 52: 1281-92.
3. Zwierz K, Juszkiewicz J, Arciuch L, Gindzieński A. N-acetylo- $\beta$ -D-heksozoaminidaza – enzym chorób Tay-Sachsa i Sandhoffa. *Post Bioch* 1992; 38: 127-31.
4. Rubin E, Farber JL. Neoplasia. In: Rubin E, Farber JL (eds). *Pathology*. JB Lippincott Company, Philadelphia 1994.
5. Chatterjee S, Vellcer LL, Sweeley CC. Glycosphingolipid glycosylhydrolases and glycosidases of synchronized human KB cells. *J Biol Chem* 1975; 250: 4972-9.
6. Zwierz K, Gindzieński A, Głowacka D, Porowski T. The degradation of glycoconjugates in the human gastric mucous membrane. *Acta Med Acad Hung* 1981; 38: 145-52.
7. Dawson RMC, Elliott WH, Jones KM. *Data of Biochemical Research*. Oxford University Press, New York and Oxford 1969; second edition s. 618.
8. Kokot F. *Metody badań laboratoryjnych stosowanych w klinice*. PZWL, Warszawa 1969; s. 130.
9. Borzym-Kluczyk M, Darewicz B, Knaś M, Szajda SD, Sulik M, Olszewska E, Zwierz K. The activity of N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase and its isoenzymes in the renal tissue, serum and urine of patients with renal cancer. *Współcz Onkol* 2005; 9: 287-90.
10. Elsafi ME, Hultberg B, Isaksson A, Hägerstrand J, Prytz H, Sternam U. Lysosomes and human liver diseases: a biochemical and immunohistochemical study of  $\beta$ -hexosaminidase. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 669-73.
11. Zwierz K, Zalewska A, Zoch-Zwierz W. Isoenzymes of N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase. *Acta Biochem Pol* 1999; 46: 739-51.
12. Arciuch L, Bielecki D, Borzym M, Południński G, Arciszewski K, Rózański A, Zwierz K. Isoenzymes of N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase in complicated pregnancy. *Acta Biochim Polon* 1999; 46: 977-83.
13. Tucker SM, Pierce RJ, Price RG. Characterisation of human N-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzymes as an indicator of tissue damage in disease. *Clin Chim Acta* 1980; 102: 29-40.
14. Popko J, Zalewska A, Sierakowski S, Macias T, Knaś M, Zwierz K, Średzińska K. Aktywność N-acetylo-beta-D-heksozoaminidazy w płynie stawowym i surowicy krwi chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów i artrozą. *Przeł Lek* 2005; 62: 650-2.
15. Szajda SD, Snarska J, Knaś M, Kamiński F, Siedlecka K, Rączkowski K, Kowalewska A, Zwierz K. Aktywność N-acetylo- $\beta$ -D-glukoaminidazy w surowicy krwi chorych z rakiem trzustki. 62. Zjazd Towarzystwa Chirurgów Polskich, 14-17 września 2005 r., Białystok, s. 142.
16. Chew SL, Lins RL, Daelemans R, Nuyts GD, De Broe ME. Urinary enzymes in acute renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 1993; 8: 507-11.
17. Costigan MG, Rustom R, Bone JM, Shenkin A. Origin and significance of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) in renal patients with proteinuria. *Clin Chim Acta* 1996; 133: 133-44.
18. Gibey R, Dupond JL, Alber D, Floris RL, Henry JCh. Predictive value of urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), alanine-aminopeptidase (AAP) and beta-2-microglobulin (B2 M) in evaluating nephrotoxicity of gentamycin. *Clin Chim Acta* 1981; 116: 25-34.
19. Gouyon JB, Aujard Y, Abisror A, Laudignon N, d'Athis P, Jacqz E. Urinary excretion of N-acetyl-glucosaminidase and beta-2-microglobulin as early markers of gentamycin nephrotoxicity in neonates. *Dev Pharmacol Ther* 1987; 10: 145-52.
20. Yuen CT, Corbett CR, Kind PR, Thompson AE, Price RG. Isoenzymes of urinary N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) in patients with renal transplants. *Clin Chim Acta* 1987; 164: 339-50.

#### Adres do korespondencji

dr n. med. **Sławomir D. Szajda**  
Zakład Biochemii Farmaceutycznej  
Akademia Medyczna  
ul. Mickiewicza 2A,  
15-230 Białystok 8  
tel. +48 85 748 56 90, +48 85 748 56 91  
e-mail: spoak@amb.edu.pl