



GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

KATEDRA I KLINIKA GASTROENTEROLOGII I HEPATOLOGII

**PRACA DOKTORSKA**

Łukasz Rojek

ANALIZA PARAMETRÓW BIOCHEMICZNYCH ZAWARTOŚCI  
OGRANICZONEJ MARTWICY TRZUSTKI ORAZ SUROWICY  
U CHORYCH PO PRZEBYTYM OSTRYM RZUCIE ZAPALENIA TRZUSTKI

Promotor: dr hab. med. Krystian Adrych

2016

Niniejsza praca została wykonana w ramach projektów naukowych finansowanych przez:  
Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MN) nr 01-0165/08/121  
Zakłady Farmaceutyczne Polpharma SA

Pragnę serdecznie podziękować Promotorowi pracy  
Panu Dr hab. Krystianowi Adrychowi za opiekę, nieustanną pomoc i cenne wskazówki

Dziękuję Panu Prof. Marianowi Smoczyńskiemu za opiekę  
i wprowadzenie mnie w fascynujący świat gastroenterologii

Dziękuję Panu Prof. Julianowi Świerczyńskiemu za wiele cennych uwag  
oraz życzliwość na różnych etapach wykonywania projektu

Dziękuję Panu Dr hab. Tomaszowi Śledzińskiemu za cierpliwą pomoc w analizie  
danych biochemicznych

Dziękuję Pani Elżbiecie Goyke za nieocenioną pomoc przy pracy laboratoryjnej

# SPIS TREŚCI

|  |    |
|--|----|
| Wykaz użytych skrótów .....  | 6  |
| 1. Wprowadzenie .....  | 8  |
| 1.1 Ostre zapalenie trzustki.....                                      | 8  |
| 1.2 Podział zbiorników trzustkowych.....                               | 14 |
| 1.3 Leczenie ostrego zapalenia trzustki i jej powikłań .....           | 16 |
| 1.4 Biochemiczna analiza płynu z trzustkowej „torbieli rzekomej” ..... | 19 |
| 1.5 Enzymy .....   | 21 |
| 1.5.1 Trypsyna.....  | 21 |
| 1.5.2 Amylaza.....   | 22 |
| 1.5.3 Dehydrogenaza mleczanowa .....                                   | 23 |
| 1.5.4 Dehydrogenaza jabłczanowa .....                                  | 24 |
| 1.6 Aminokwasy .....   | 25 |
| 1.7 Wolne kwasy tłuszczowe .....                                       | 28 |
| 1.8 Produkty reaktywnych form tlenu .....                              | 29 |
| 1.8.1 Modyfikacja białek .....   | 31 |
| 1.8.2 Modyfikacja lipidów .....  | 32 |
| 1.8.3 Modyfikacja kwasów nukleinowych .....                            | 32 |
| 1.9 Płytkowy czynnik wzrostu.....                                      | 33 |
| 1.10 Transformujący czynnik wzrostu beta .....                         | 34 |
| 1.11 Podsumowanie wprowadzenia .....                                   | 35 |
| 2. Cel pracy .....   | 36 |
| 3. Materiał i Metodyka.....  | 37 |
| 3.1 Grupa badana.....  | 37 |
| 3.1.1 Kryteria włączenia: .....  | 38 |
| 3.1.2 Kryteria wykluczające:.....                                      | 38 |
| 3.2 Procedura endoskopowa .....  | 39 |
| 3.3 Identyfikacja, pobieranie i przechowywanie płynu martwiczego ..... | 40 |
| 3.4 Metody oznaczeń wybranych parametrów biochemicznych.....           | 42 |
| 3.4.1 Dehydrogenaza mleczanowa i jabłczanowa .....                     | 42 |
| 3.4.2 Wolne kwasy tłuszczowe .....                                     | 42 |
| 3.4.3 Grupy karbonylowe .....  | 43 |
| 3.4.4 Utlenione pochodne guaniny .....                                 | 43 |
| 3.4.5 Izoprostany .....  | 44 |
| 3.4.6 Aminokwasy .....   | 44 |

|   |    |
|---|----|
| 3.4.7 Białko całkowite .....  | 44 |
| 3.4.7.1 Elektroforeza białek .....                                    | 45 |
| 3.4.8 Płytkowy czynnik wzrostu BB .....                               | 45 |
| 3.4.9 Transformujący czynnik wzrostu beta 1 .....                     | 46 |
| 3.4.10 Podstawowe badania laboratoryjne .....                         | 46 |
| 3.5 Analiza statystyczna .....  | 46 |
| 4. Wyniki.....  | 47 |
| 4.1 Charakterystyka grupy badanej .....                               | 47 |
| 4.2 Analiza podstawowych badań laboratoryjnych.....                   | 50 |
| 4.3 Analiza wybranych parametrów w surowicy i płynie martwicznym..... | 53 |
| 5. Dyskusja.....  | 66 |
| 6. Wnioski .....  | 79 |
| 7. Streszczenie .....   | 80 |
| 8. Summary .....  | 82 |
| 9. Piśmiennictwo.....   | 84 |
| 10. Spis tabel .....  | 89 |
| 11. Spis rycin i zdjęć .....  | 90 |
| 12. Załączniki .....  | 91 |
| Skala Ransona <sup>108</sup> .....                                    | 91 |
| Zmodyfikowana skala Glasgow <sup>79,109</sup> .....                   | 92 |
| Skala APACHE-II <sup>110</sup> .....                                  | 93 |
| Skala BISAP <sup>111</sup> .....                                      | 94 |
| Skala Panc 3 <sup>112</sup> .....                                     | 95 |

## WYKAZ UŻYTYCH SKRÓTÓW

|              |  |
|--------------|--|
| 8-OH-dG      | - 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna ( <i>ang. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine</i> )  |
| APA          | - <i>ang. American Pancreatic Association</i>  |
| BMI          | - wskaźnik masy ciała ( <i>ang. Body Mass Index</i> )  |
| CA 19.9      | - antygen rakowy 19.9 ( <i>ang. Cancer / Carbohydrate Antigen 19.9</i> )   |
| CEA          | - antygen rakowo-płodowy ( <i>ang. Carcinoembryonic Antigen</i> )  |
| CECT         | - wielorzędowa tomografia komputerowa ze wzmocnieniem kontrastowym ( <i>ang. Contrast-Enhanced Computed Tomography</i> ) |
| CRP          | - białko C reaktywne ( <i>ang. C-reactive Protein</i> )  |
| DNP          | - 2,4-dinitrofenylohydrazyna ( <i>ang. 2,4-Dinitrophenylhydrazine</i> )  |
| DNA          | - kwas deoksyrybonukleinowy ( <i>ang. Deoxyribonucleic Acid</i> )  |
| ECPW         | - endoskopowa cholangiopankreatografia wsteczna ( <i>ang. Endoscopic Retrograde Cholangiopancreatography</i> )           |
| EIA          | - test immunoenzymatyczny ( <i>ang. Enzyme Immunoassay</i> )   |
| ELISA        | - test immunoenzymatyczny ( <i>ang. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )  |
| EUS          | - endoskopowa ultrasonografia ( <i>ang. Endoscopic Ultrasound</i> )  |
| EXP          | - izolowana martwica okołotrzustkowa ( <i>ang. Extrapancreatic Necrosis without Pancreatic Parenchymal Necrosis</i> )    |
| FFA          | - wolne kwasy tłuszczowe ( <i>ang. Free Fatty Acids</i> )  |
| GUMed        | - Gdański Uniwersytet Medyczny ( <i>ang. Medical University of Gdańsk</i> )  |
| IAP          | - <i>ang. International Association of Pancreatology</i>   |
| IL           | - interleukina ( <i>ang. Interleukin</i> )   |
| INF $\gamma$ | - interferon gamma ( <i>ang. Inteferon Gamma</i> )   |
| IsoP         | - izoprostany ( <i>ang. Isoprostane</i> )  |
| LDH          | - dehydrogenaza mleczanowa ( <i>ang. Lactate Dehydrogenase</i> )   |
| MDH          | - dehydrogenaza jabłczanowa ( <i>ang. Malate Dehydrogenase</i> )   |
| MRI          | - rezonans magnetyczny ( <i>ang. Magnetic Resonance Imaging</i> )  |
| NAD/NADH     | - forma utleniona i zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego  |

|             |   |
|-------------|---|
| NO          | - tlenek azotu ( <i>ang. Nitric Oxide</i> )   |
| NOS         | - syntaza tlenku azotu ( <i>ang. Nitric Oxide Synthase</i> )  |
| NPV         | - wartość predykcyjna wyniku negatywnego ( <i>ang. Negative Predictive Values</i> )   |
| OB          | - odczyn Biernackiego ( <i>ang. Erythrocyte Sedimentation Rate</i> )  |
| OZT         | - ostre zapalenie trzustki ( <i>ang. Acute Pancreatitis</i> )   |
| PDGF        | - płytkowy czynnik wzrostu ( <i>ang. Platelet-Derived Growth Factor</i> )   |
| PMN         | - liczba komórek (leukocytów) wielojądrzastych w rozmazie<br>( <i>ang. Polymorphonuclear Leukocytes</i> )   |
| PPV         | - wartość predykcyjna wyniku dodatniego ( <i>ang. Positive Predictive Values</i> )  |
| PZT         | - przewlekłe zapalenie trzustki ( <i>ang. Chronic Pancreatitis</i> )  |
| RFT         | - reaktywne formy tlenu ( <i>ang. Reactive Oxygen Species</i> )   |
| RNA         | - kwas rybonukleinowy ( <i>ang. Ribonucleic Acid</i> )  |
| SDS-PAGE    | - żelowa elektroforeza płytowa w akrylamidzie w obecności detergentu dodecylosiarczanu sodu ( <i>ang. Plate Acrylamide Gel Electrophoresis - Sodium Dodecyl Sulfate</i> ) |
| SEM         | - błąd standardowy średniej ( <i>ang. Standard Error of the Mean</i> )  |
| SIRS        | - zespół uogólnionej odpowiedzi zapalnej ( <i>ang. Systemic Inflammatory Response Syndrome</i> )  |
| TCA         | - kwas trichlorooctowy ( <i>ang. Trichloroacetic Acid</i> )   |
| TGF $\beta$ | - transformujący czynnik wzrostu beta ( <i>ang. Transforming Growth Factor</i> )  |
| TNF         | - czynnik martwicy nowotworu ( <i>ang. Tumor Necrosis Factor</i> )  |
| WOPN        | - otorbiona martwica trzustki ( <i>ang. Walled-Off Pancreatic Necrosis</i> )  |

# 1. WPROWADZENIE

## 1.1 OSTRE ZAPALENIE TRZUSTKI

Uważa się, iż pierwszy kliniczny opis pacjenta z ostrym zapaleniem trzustki (OZT) przedstawił w 1652 holenderski anatom Nicholaes Tulp (1593-1674)<sup>1</sup>. Kolejne opisy autopsyjne zmian martwiczych w trzustce zostały przedstawione przez T. Bonet (1679) i J. G. Griesel (1681)<sup>1</sup>. W 1889 roku Reginald Fitz zaprezentował pracę "Acute Pancreatitis: A Consideration of Hemorrhage, Hemorrhagic, Suppurative, and Gangrenous Pancreatitis, and of Disseminated Fat Necrosis" w której to w systematyczny sposób przeanalizował obraz kliniczny u 53 chorych z ostrym zapaleniem trzustki<sup>1</sup>. W 1876 roku William Kuhne wykrył w soku trzustkowym substancję zdolną rozkładać materiał biologiczny i nazwał ją trypsyną<sup>2</sup>. Zidentyfikował on również trypsynogen jako prekursor trypsyny<sup>2</sup>. Z kolei Hans Chiari 20 lat później (w 1896 roku) jako pierwszy przedstawił tezę patofizjologiczną, iż zapalenie trzustki związane jest z samostrawieniem narządu przez trypsynę<sup>1</sup>.

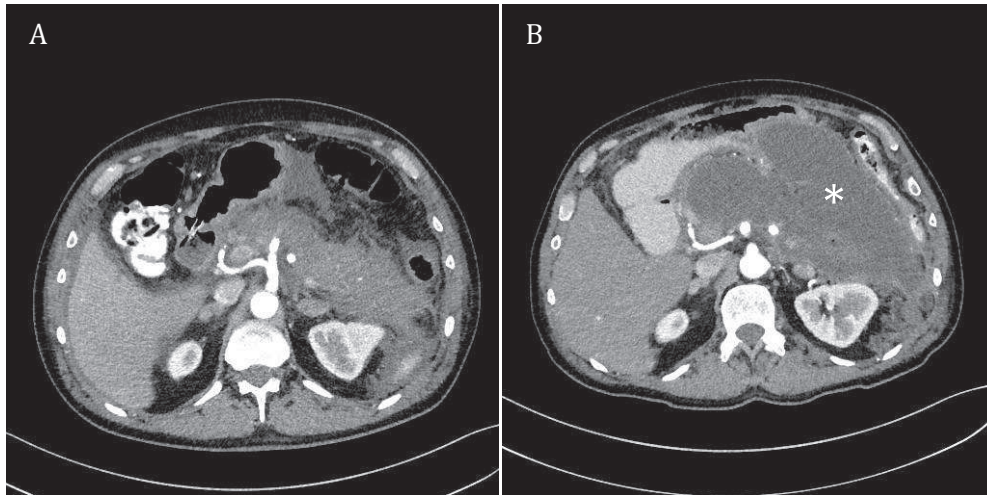
Ostre zapalenie trzustki – zgodnie z aktualną definicją - jest procesem zapalnym związanym z przedwczesną wewnątrztrzustkową aktywacją proenzymów trzustkowych oraz przebiegającym z większym lub mniejszym uszkodzeniem sąsiadujących tkanek lub odległych narządów – w zależności od nasilenia i zakresu patologicznego procesu w trzustce<sup>3</sup>. Roczna zachorowalność szacowana jest w granicach 13-45 przypadków na 100 000 osób<sup>4,5</sup>. W równym stopniu OZT dotyka kobiety i mężczyzn, choć obserwuje się różnicę w etiologii względem płci: u kobiet najczęstsza przyczyna to żółciopochodna, a u mężczyzn - poalkoholowa<sup>5</sup>.

Zgodnie z aktualną klasyfikacją z Atlanty (2012), aby rozpoznać OZT należy stwierdzić 2 z 3 następujących kryteriów<sup>6,7</sup>:



1. Nieustępliwy ból nadbrzusza o ostrym początku, często promieniujący do pleców
2. Wzrost aktywności lipazy (lub amylazy) w surowicy powyżej 3-krotnej górnej granicy referencyjnej
3. Charakterystyczne zmiany dla OZT w tomografii komputerowej ze wzmocnieniem kontrastowym (CECT), w obrazowaniu rezonansem medycznym (MRI) lub przezbrzuszej ultrasonografii.

Obrazowanie za pomocą CECT jest badaniem z wyboru w ocenie ostrego zapalenia trzustki oraz w wykrywaniu powikłań miejscowych (Rycina 1). Trzustka w badaniu bez kontrastu wykazuje gęstość radiologiczną rzędu 40-50 jH<sup>8</sup>. Po dożylnym podaniu kontrastu - w zależności od ilości i szybkości podania środka kontrastującego oraz czasu rejestracji obrazu - „żywa” trzustka ulega wzmocnieniu do 100-150 jH<sup>8</sup>. Brak ww wzmocnienia lub jego niewielki wzrost (o <30 jH), zwłaszcza gdy badanie było wykonane u pacjenta po trzeciej dobie od początku choroby, świadczy o niedokrwieniu trzustki i obecności martwicy<sup>8</sup>. W warunkach fizjologicznych brak spodziewanego wzmocnienia może być spowodowane infiltracją trzustki przez tkankę tłuszczową<sup>8</sup>. Niestety CECT nie jest optymalnym narzędziem do diagnostyki i oceny rozległości martwicy tkanki tłuszczowej przestrzeni zaotrzewnowej<sup>8</sup>. Mając na uwadze zalety i wady metody, tomografia komputerowa została wykorzystana do stworzenia użytecznych systemów prognostycznych i indeksów ciężkości (np. skala Balthazara)<sup>9,10</sup>.



**Rycina 1. Obrazy CECT chorego z ostrym martwiczym zapaleniem trzustki hospitalizowanego w Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. A - początek choroby; B - 17 dni później; \* - ostry zbiornik martwiczny**

Obrazowanie za pomocą MRI stanowi alternatywę dla osób z ostrym uszkodzeniem nerek lub przewlekłą chorobą nerek oraz u osób uczulonych na kontrast używany w CECT. Traktując jako złoty standard klasyfikację Ransona, MRI pozwala na wykrycie OZT o ciężkim przebiegu z 83% czułością i specyficznością 91%<sup>11</sup>. W badaniu tym CECT osiągnęło czułość 78% i specyficzność 86%<sup>11</sup>.

Z klinicznego punktu widzenia, OZT może przybierać trzy stopnie ciężkości<sup>6,7</sup>:

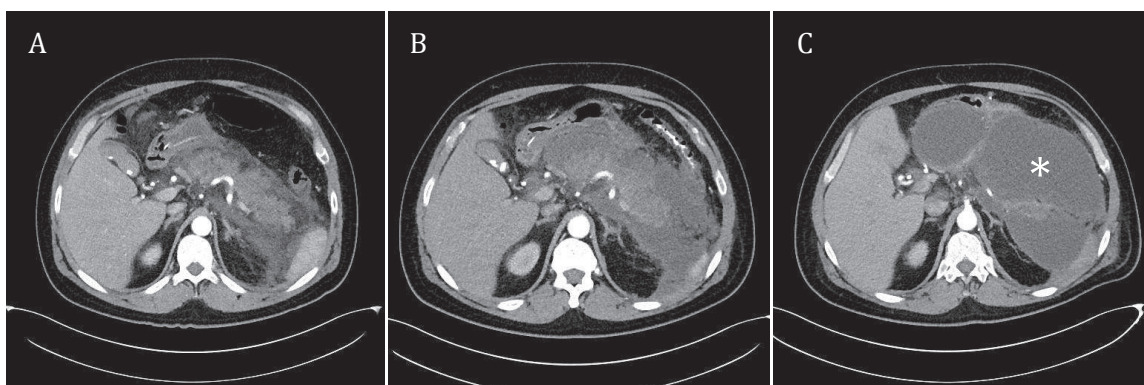
- A. Lekki - bez cech niewydolności narządowej i powikłań miejscowych/ogólnoustrojowych
- B. Umiarkowany - przemijająca (ustępująca w ciągu 48 h) niewydolność narządowa i/lub obecne powikłania miejscowe bądź ogólnoustrojowe
- C. Ciężki - przetrwała niewydolność narządowa dotycząca 1 lub wielu układów (>48 h)

Acevedo-Piedra i wsp. ocenili, że 67% OZT przybiera łagodny obraz choroby, a przebieg umiarkowany i ciężki stwierdza się u odpowiednio 30% i 4% pacjentów<sup>12</sup>.

Podążając za ww klasyfikacją OZT wyróżniamy dwie odmienne postaci choroby: śródmiąższową obrzękową oraz martwiczą<sup>6,7</sup>.

Postać śródmiąższowa obrzękowa OZT, przebiegająca zazwyczaj z minimalną dysfunkcją narządu oraz z łagodnym obrazem klinicznym, charakteryzuje się zgodnie z nazwą obrzękiem zapalnym trzustki<sup>6,7</sup>. W obrazie CECT stwierdza się jednorodne (homogenne) wzmocnienie mięszu trzustki<sup>6,7</sup>.

Obecność martwicy tkanek, czy to mięszu trzustki, czy też tkanek okołotrzustkowych, oznacza martwicze zapalenie trzustki (Rycina 2)<sup>6,7</sup>. Stanowi ono około 20% wszystkich rodzajów OZT<sup>13</sup>. W tej grupie u ok 32-33% pacjentów stwierdza się zakażenie tkanek martwiczych<sup>13,14</sup>. Częstość zakażenia wzrasta wraz ze wzrostem ilości martwicy stwierdzanej w trzustce<sup>15</sup>. Zakażoną martwicę stwierdza się w 80% gdy martwica obejmuje >50% narządu, w 10% gdy martwica stanowi 30-50% narządu oraz w 10% gdy martwica obejmuje <30% trzustki<sup>15</sup>.



**Rycina 2. Chory z ostrym martwiczym zapaleniem trzustki hospitalizowany w Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Obrazy CECT: A – początek choroby; B - 10 dni później; C - 32 dni później; \* - otorbiona martwica trzustki**

Głównymi drogami wtargnięcia mikroorganizmów do martwicy są: translokacja poprzez ścianę jelita cienkiego lub grubego, droga krwionośna (bakteriemia/sepsa), refluks zakażonej żółci oraz refluks treści z dwunastnicy do przewodu trzustkowego<sup>16</sup>. Berger i wsp. zauważyli, iż zakażona martwica w ponad połowie przypadków wywołana jest przez jeden mikroorganizm (65,4%), najczęściej tlenowy (86,5%)<sup>16</sup>. Najczęstszymi stwierdzanymi mikroorganizmami były: *Escherichia coli* (44,4%), *Enterococcus* (28,4%), *Klebsiella* (16%), *Staphylococcus aureus* (14,8%), *Pseudomonas* (4,9%), *Proteus* (3,7%), *Candida* (4,9%)<sup>16</sup>. Autorzy ci również wykazali, że wskaźnik zakażenia zbiornika martwiczego wzrasta wraz z czasem trwania choroby (w 1 tygodniu – 25%, w 2 tygodniu – 45%, po 3 tygodniu – 60%)<sup>16</sup>.

Śmiertelność chorych z martwiczym OZT oceniona została na 15%<sup>14</sup>. Stwierdzenie niewydolności narządowej lub zakażonej martwicy trzustki w trakcie OZT wiązało się ze wzrostem śmiertelności odpowiednio do 30 % i 32%<sup>17</sup>. Rozpoznanie u jednego pacjenta zarówno niewydolności narządowej jak i zakażonej martwicy trzustki zwiększało śmiertelność do 43% (Tabela 1)<sup>17</sup>. W prospektywnym wieloośrodkowym badaniu przeprowadzonym w 21 holenderskich szpitalach wykazano, iż leczenie zachowawcze chorych z martwicą trzustki wiązało się z mniejszą śmiertelnością niż leczenie inwazyjne (zabiegi radiologiczne, endoskopowe, chirurgiczne) (odpowiednio 7% i 27%)<sup>14</sup>. Ponadto śmiertelność pacjentów leczonych inwazyjnie była odwrotnie proporcjonalna do czasu jaki upłynął od przyjęcia chorego do szpitala i potrzeby zabiegu (odpowiednio: 0 - 14 dni 56%; 14 - 29 dni 26%; ponad 29 dni 15%)<sup>14</sup>.

**Tabela 1. Śmiertelność chorych z ostrym zapaleniem trzustki, niewydolnością narządową i zakażoną martwicą trzustki na podstawie metaanalizy przedstawionej przez Petrov M et al.<sup>17</sup>**

| <b>Niewydolność narządowa</b>     | <b>Obecna</b> |                  | <b>Nieobecna</b> |
|-----------------------------------|---------------|------------------|------------------|
| <b>Zakażona martwica trzustki</b> | <b>Obecna</b> | <b>Nieobecna</b> | <b>Nieobecna</b> |
| <b>Śmiertelność</b>               | <b>43%</b>    | <b>22%</b>       | <b>11%</b>       |

W przebiegu martwiczego OZT wyróżnić można martwicę: 1) ograniczoną tylko do samego mięszu trzustki, 2) ograniczoną tylko do tkanek okołotrzustkowych, 3) martwicę jednocześnie mięszu trzustki jak i tkanek okołotrzustkowych<sup>6,7</sup>.

Chorzy z martwicą okołotrzustkową (EXPN) charakteryzują się w porównaniu chorymi z martwicą obejmującą mięsz trzustki łagodniejszym przebiegiem klinicznym oraz mniejszą śmiertelnością<sup>14,18</sup>. U pacjentów z EXPN obserwuje się rzadziej zakażenie martwicy oraz niewydolność narządową (w tym również wielonarządową)<sup>18</sup>. Jednakże, gdy dojdzie do zakażenia martwicy, częstość powikłań jak i śmiertelność są porównywalne w obu grupach chorych, niezależnie od miejsca występowania martwicy<sup>18</sup>.

## 1.2 PODZIAŁ ZBIORNIKÓW TRZUSTKOWYCH

W przeszłości wszystkie zbiorniki płynowe powstałe w przebiegu OZT nazywane były „torbielami rzekomymi”. Wraz z pogłębieniem wiedzy na temat patofizjologii choroby zaczęto różnicować zbiorniki płynowe powstające podczas OZT<sup>19</sup>. Z powodu znacznej niejednorodności w nomenklaturze „zbiorników” płynowych, utrudniających wymianę doświadczeń oraz co ważniejsze porównywanie wyników badań diagnostycznych i terapeutycznych, w 1992 w Atlancie (USA) odbyła się międzynarodowa konferencja efektem której było stworzenie oryginalnej klasyfikacji<sup>7</sup>. Poprzez wprowadzenie wspólnej terminologii i zdefiniowanie stopni ciężkości choroby podjęto próbę wyposażenia lekarzy w zunifikowaną klasyfikację choroby. Niestety Klasyfikacja z Atlanty nie uzyskała powszechnej akceptacji i nie była szeroko stosowana<sup>7</sup>. Rozwój wiedzy pankreatologicznej wymusił modyfikacje prowadzące do obecnie obowiązującej klasyfikacji z 2012<sup>6,7</sup>.

Zgodnie z aktualną klasyfikacją (Atlanta 2012) zbiorniki płynowe powstałe w trakcie ostrego zapalenia trzustki należy podzielić na cztery podstawowe grupy: 1) ostry okołotrzustkowy zbiornik płynowy (ang. acute peripancreatic fluid collection), 2) torbiel rzekomą (ang. pancreatic pseudocyst), 3) ostry zbiornik martwiczy (ang. acute necrotic collection) oraz 4) otorbioną (ograniczoną) martwicę trzustki (ang. walled-off necrosis)<sup>6,7</sup>. Termin „ograniczona” martwica trzustki użyty w tytule rozprawy należy traktować jako synonim „otorbionej” martwicy trzustki, wynikający z różnego tłumaczenia terminu angielskojęzycznego. Kryteria podziału na ww zbiorniki są następujące: postać przebytego ostrego zapalenia trzustki (obrzękowa lub martwicza) oraz czas jaki upłynął od początku choroby (orientacyjna granica to 4 tygodnie)<sup>6,7</sup>. Szczegółową charakterystykę zbiorników przedstawiono w Tabeli 2.

**Tabela 2. Podział i charakterystyka trzustkowych zbiorników płynowych na podstawie zrewidowanej klasyfikacji z Atlanty (2012)<sup>6,7</sup>**

|  | <b>Ostry okołotrzustkowy zbiornik płynowy</b> | <b>Torbiel rzekoma</b>  | <b>Ostry zbiornik martwiczy</b>    | <b>Otorbiona (ograniczona) martwica trzustki</b> |
|--|---|-------------------------|------------------------------------|--|
| <b>Postać ostrego zapalenia trzustki</b> | Śródmiąższowa obrzękowa                       | Śródmiąższowa obrzękowa | Martwiczna                         | Martwiczna                                       |
| <b>Czas od początku choroby</b>          | Do 4 tygodnia                                 | Po 4 tygodniach         | Do 4 tygodnia                      | Po 4 tygodniach                                  |
| <b>Zawartość zbiornika</b>               | Jednorodna (homogenna)                        | Jednorodna (homogenna)  | Niejednorodna (heterogenna)        | Niejednorodna (heterogenna)                      |
|  | Płynna  | Płynna                  | Płynna i lita                      | Płynna i lita                                    |
| <b>Ściana zbiornika</b>                  | Brak lub trudna do zidentyfikowana            | Dobrze wykształcona     | Brak lub trudna do zidentyfikowana | Dobrze wykształcona                              |

W przebiegu ostrego martwiczego zapalenia trzustki nierzadko obserwuje się pojawienie się zbiorników płynowych. W ciągu pierwszych tygodni wszystkie zbiorniki nazywane są ostrymi zbiornikami martwiczymi, niezależnie czy znajdują się w obrębie trzustki czy poza nią<sup>6</sup>. Przestrzenie te nie posiadają wyraźnej ściany i wypełnione są zarówno litymi martwiczymi tkankami jak i płynem<sup>6</sup>. Po upływie około 4 tygodni w przetrwałych ww zbiornikach można zaobserwować wyraźną ścianę, a zawartość zazwyczaj wykazuje cechy większego upłynnienia litych mas martwicznych<sup>6</sup>. Rana i wsp. wykazali posługując się endoskopową ultrasonografią (EUS), że po upływie 6 miesięcy u ponad połowy pacjentów nie stwierdza się już elementów litych w otorbionej martwicy trzustki<sup>20</sup>.

Zarówno wczesne jak i późne zbiorniki martwicze mogą wykazywać cechy infekcji. Zakażoną martwicę rozpoznaje się po stwierdzeniu (1) pęcherzyków gazu w tkankach martwicznych w badaniu CECT lub (2) obecności bakterii i/lub grzybów podczas barwienia metodą Grama materiału pobranego podczas biopsji cienkoigłowej lub (3) dodatniego posiewu treści ze zbiornika martwiczego<sup>6</sup>.

### 1.3 LECZENIE OSTREGO ZAPALENIA TRZUSTKI I JEJ POWIKŁAŃ

Mimo znacznego poszerzenia wiedzy na temat patofizjologii OZT<sup>4</sup>, nie dysponujemy skutecznymi środkami prewencyjnymi lub nawet ograniczającymi powstawanie martwicy trzustki. Poglądy na leczenie chorych z ostrym zapaleniem trzustki, zwłaszcza martwiczym, uległy w ostatnich dekadach znaczącej zmianie. Początkowe agresywne leczenie chirurgiczne OZT ustąpiło miejsca leczeniu zachowawczemu i/lub małoinwazyjnemu.

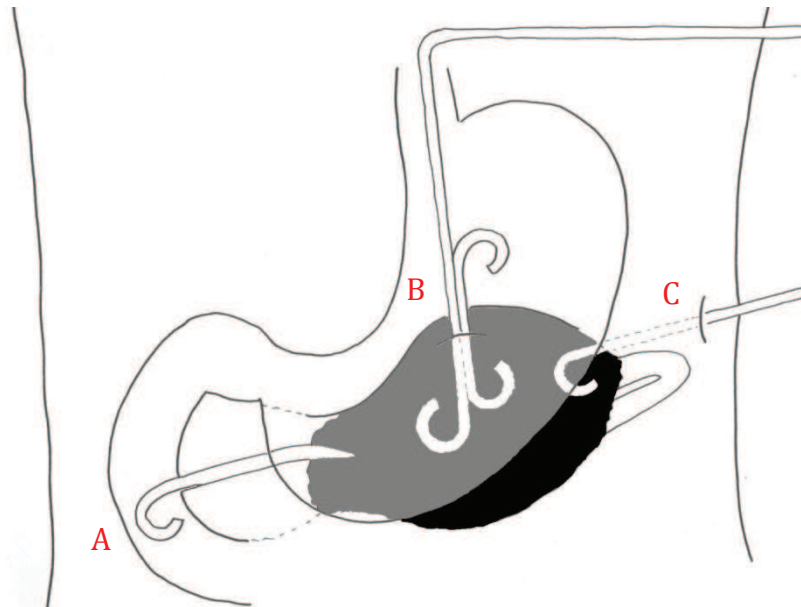
U każdego chorego od początku choroby – niezależnie czy zapalenie trzustki przyjmuje postać obrzękową czy martwiczą - wdraża się intensywne leczenie zachowawcze mające na celu zwalczanie zespołu uogólnionej reakcji zapalnej (SIRS) i podtrzymywanie ważnych dla życia narządów i układów. Leczenie polega na adekwatnym do danej sytuacji wyrównywaniu zaburzeń wodno-elektrolitowych, metabolicznych i kwasowo-zasadowych, skutecznym leczeniu przeciwbólowym oraz optymalnym odżywieniu<sup>9</sup>. Obecnie nie zaleca się antybiotykoterapii ani probiotyków w profilaktyce powikłań infekcyjnych OZT<sup>21</sup>. Pacjenci z ciężką postacią choroby (tj. z niewydolnością narządową) wymagają na ogół przejściowego leczenia w oddziałach intensywnej opieki medycznej.

Leczenie trzustkowych pozapalnych zbiorników płynowych rozpoczyna się zazwyczaj po 4-6 tygodniach od początku rzutu choroby, dając tym samym czas do potencjalnej resorpcji zbiorników i upłynnienia jej zawartości. Opóźnienie leczenia interwencyjnego zmniejsza śmiertelność chorych z martwiczym zapaleniem trzustki<sup>14</sup>. Dodatkowo martwica z biegiem czasu ulega upłynnieniu, ułatwiając i skracając późniejsze leczenie<sup>20,22</sup>. Po wytworzeniu się stabilnej ściany zbiornika i obecności istotnych objawów (Rycina 3) można zastosować następujące sposoby leczenia drenażu<sup>9,23</sup>:

→ Drenaż / debridement endoskopowy przezścienny (żołądek lub dwunastnica) wytworzony pod kontrolą „wzroku” (widoczna impresja zbiornika) lub EUS<sup>24,25</sup>



- Drenaż / debridement endoskopowy przezbrodawkowy (przez brodawkę dwunastniczą większą)
- Drenaż / debridement przezskórny (przezotrzewnowy) założony pod kontrolą ultrasonografii lub tomografii komputerowej
- Drenaż / debridement przezskórny (pozaotrzewnowy) założony pod kontrolą ultrasonografii lub tomografii komputerowej
- Nekrosectomia chirurgiczna (otwarta lub małoinwazyjna)<sup>26-28</sup>



**Rycina 3. Schemat drenażu otorbionej martwicy trzustki. A - drenaż przezbrodawkowy; B - drenaż przezścienny (przezżołądkowy); C - drenaż przezskórny**

W 2013 American College of Gastroenterology oraz International Association of Pancreatology (IAP) wraz American Pancreatic Association (APA) opublikowały dwa bardzo istotne dokumenty – wytyczne dotyczące ostrego zapalenia trzustki<sup>21,29</sup>. Najważniejsze podsumowanie zaleceń terapeutycznych IAP/APA odnośnie leczenia ostrego martwiczego zapalenia trzustki przedstawiono w tabeli 3<sup>21</sup>.

**Tabela 3. Podsumowania wytycznych dotyczących leczenia martwiczego ostrego zapalenia trzustki wg IAP/APA z 2013<sup>21</sup>**

|  |
|--|
| <p>Wskazania do interwencji (radiologicznej, endoskopowej czy chirurgicznej):</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. podejrzenie (np. nieustępująca gorączka, wzrastające parametry stanu zapalnego, widoczny gaz w badaniach obrazowych) lub stwierdzenie zakażenia martwicy trzustki</li><li>2. W jałowej martwicy trzustki:<ol style="list-style-type: none"><li>a. Utrudniony pasaż z żołądka, jelit lub dróg żółciowych z powodu ucisku otorbionej martwicy trzustki (po 4-8 tygodniach od początku OZT)</li><li>b. Przewlekłe objawy (np. ból, pogarszający się stan zdrowia) (po 8 tygodniach od początku OZT)</li><li>c. Objawowy zespół rozfragmentowania przewodu trzustkowego</li></ol></li></ol> |
| <p>Dla chorych z podejrzeniem lub rozpoznaniem zakażonej martwicy trzustki interwencja (radiologiczna, endoskopowa czy chirurgiczna) powinna być opóźniona, o ile jest to możliwe, do przynajmniej 4-go tygodnia aby doszło do otorbienia zbiornika</p>  |
| <p>Dla chorych z podejrzeniem lub rozpoznaniem zakażonej martwicy trzustki, optymalna strategia postępowania obejmuje początkowo drenaż przezskórny (zewnętrzny) lub endoskopowy przezścienny, z następczą (o ile jest konieczna) endoskopową lub chirurgiczną nekrosectomią</p>   |
| <p>Profilaktyka antybiotykowa (dożylna) nie jest rekomendowana jako zabezpieczenie przed powikłaniami infekcyjnymi OZT</p>   |
| <p>Profilaktyka probiotykowa nie jest rekomendowana jako zabezpieczenie przed powikłaniami infekcyjnymi OZT</p>  |

#### 1.4 BIOCHEMICZNA ANALIZA PŁYNU Z TRZUSTKOWEJ „TORBIELI RZEKOMEJ”

Wyniki leczenia chorych z martwiczym ostrym zapaleniem trzustki nadal są niezadowolające, dlatego też, tak ważne jest prowadzenie w dalszym ciągu badań podstawowych w celu poznania procesów toczących się w martwicy oraz mechanizmów sprzyjających leczeniu i pogarszających rokowanie. Choć postęp w leczeniu OZT jest widoczny i niepodważalny, należy pamiętać, iż istnieje grupa chorych u których, mimo intensywnego i wielodyscyplinarnego leczenia, choroba zakończy się zgonem.

W przeszłości, każdy zbiornik który powstawał w przebiegu zapalenia trzustki określany był mianem „torbieli rzekomej”. W 1984 roku Bradley i wsp. wykazali, iż ciśnienie panujące wewnątrz torbieli rzekomej, mierzone śródoperacyjnie, wynosiło średnio  $38.9 \pm 2.5$  cm H<sub>2</sub>O (zakres: 23 - 51 cm H<sub>2</sub>O) i stanowiło jedynie 1/100 teoretycznej wartości ciśnienia potrzebnego do rozerwania ściany zbiornika<sup>30</sup>. W dyskusji autorzy postulowali, iż rozerwanie ściany torbieli rzekomej może wystąpić gdy ściana jest bardzo cienka albo gdy dochodzi do jej uszkodzenia – nadtrawienia – przez zawartość zbiornika<sup>30</sup>. Dla porównania średnie ciśnienie panujące wewnątrz przewodu trzustkowego wynosi odpowiednio u zdrowych osób  $14.5 \pm 5.3$  cm H<sub>2</sub>O ( $10.7 \pm 3.9$  mmHg, przelicznik 1 mmHg = 1.35 cm H<sub>2</sub>O), u chorych z zapaleniem trzustki (ostrym lub przewlekłym)  $20.9 \pm 10.7$  cm H<sub>2</sub>O ( $15.4 \pm 7.9$  mmHg), natomiast u chorych z przewlekłym zapaleniem trzustki 36 cm H<sub>2</sub>O (zakres 23 – 57 cm H<sub>2</sub>O)<sup>30,31</sup>. Lason i wsp. wykazali, że płyn z „torbieli rzekomej” jest mieszaniną białek osocza oraz soku trzustkowego z wysoką aktywnością proteolityczną zarówno dla białek o wysokiej jak i niskiej masie cząsteczkowej<sup>32,33</sup>. Kimura i wsp. w opisie 2 przypadków stwierdzili, iż w płynie ze zbiornika pozapalnego jest wysoka aktywność  $\alpha$ -amylazy<sup>34</sup>. Duvnjak i wsp. z kolei wykazali, że wysoka aktywność  $\alpha$ -amylazy jest następstwem obecności połączeń między zbiornikiem, a przewodami trzustkowymi<sup>35</sup>. Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach elektrolitów (jonów sodu i potasu) między surowicą a płynem z torbieli rzekomej<sup>35</sup>. Kimura i wsp. w swoim opracowaniu stwierdzili w płynie z torbieli rzekomej – w porównaniu z płynem ze zbiornika

nowotworowego - niską aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH), antygenu rakowo-embryonalnego (CEA) oraz białka całkowitego<sup>34</sup>. W 2005 Mönkemüller i wsp. przeprowadzili biochemiczną analizę zawartości różnych pozapalnych zbiorników płynowych zdefiniowanych wg oryginalnej klasyfikacji z Atlanty z 1992. W porównaniu z jałowymi, zakażone przewlekłe torbiele rzekome wykazywały większe średnie stężenia białka (2730 vs 510 mg/dl;  $P = 0.03$ ), LDH (6162 vs 160 U/l;  $P = 0.08$ ), albuminy (1200 vs 350 mg/dl;  $P = 0.02$ ) i niższe glukozy (38.5 vs 80 mg/dl;  $P = 0.006$ )<sup>36</sup>. Wśród chorych z ostrymi zbiornikami płynowymi z martwicą obserwowano podobne wyniki, jednakże nie uzyskano istotności statystycznej - wyższe poziomy białka (2100 vs 752 mg/dl;  $P = 0.2$ ), LDH (1334 vs 116 U/l;  $P = 0.3$ ), albuminy (600 vs 400 mg/dl;  $P = 0.4$ ) oraz niższe glukozy (36 vs 69.5 mg/dl;  $P = 0.7$ ) były rejestrowane w zakażonych zbiornikach z martwicą<sup>36</sup>. Nie zaobserwowano różnic w poziomach aktywności amylazy, lipazy i ciężarze właściwym między jałowym a zakażonym zbiornikiem płynowym, niezależnie od rodzaju zbiornika<sup>36</sup>.

## 1.5 ENZYMY

### 1.5.1 TRYPSYNA

Trypsyna należy do endopeptydaz produkowanych przez trzustkę. Jako aktywna forma powstaje z trypsynogenu pod wpływem działania enterokinazy (enzymu zlokalizowanego na enterocytach dwunastnicy) lub samej trypsyny (działanie autokatalityczne)<sup>37</sup>. Enzym ten, po spełnieniu swojego zadania (trawienie spożytych białek), po dotarciu do jelita cienkiego ulega szybkiej inaktywacji w wyniku samostrawienia<sup>37</sup>. Trypsynie nadaje się kluczowe znaczenie w patogenezie zapalenia trzustki ze względu na jej szczególną właściwość tj zdolność do aktywacji wielu enzymów i tym samym zapoczątkowania kaskady zdarzeń prowadzących do samostrawienia narządu (paradygmat trypsyny)<sup>38</sup>. Fizjologicznie, w normalnej sytuacji samostrawienie jest powstrzymane w wyniku istnienia kilku mechanizmów zabezpieczających:

- 1) obecności trzustkowego wydzielniczego inhibitora trypsyny wewnątrz komórek gruczołowych (zdolność inaktywacji do 20% aktywnej trypsyny);
- 2) syntezy enzymów w postaci nieaktywnych zymogenów;
- 3) segregacji enzymów w otoczone błoną kompartmenty;
- 4) obecności enterokinazy jedynie w dwunastnicy<sup>39</sup>.

Badania podstawowe wykazały, iż wewnątrzkomórkowa aktywacja trypsyny może (choć nie zawsze jest konieczna) wywołać ostre zapalenie trzustki<sup>38</sup>. W trakcie ostrego zapalenia trzustki stwierdza się istotne zmniejszenie sekrecji trypsyny do dwunastnicy – zwłaszcza u pacjentów z martwiczym rodzajem zapalenia<sup>40</sup>. Równocześnie synteza samych enzymów proteolitycznych (trypsyny) nie wydaje się być zakłócona<sup>40</sup>. Stężenie trypsyny (oznaczonej metodą radioimmunologiczną) w surowicy krwi jest wyższe u pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki niż stężenie enzymu w zdrowej grupie kontrolnej, odpowiednio 970-6500 vs. 273  $\mu\text{g/l}$ <sup>41</sup>. U pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki stężenie trypsyny w surowicy mieści się w zakresie od 0 do 1090  $\mu\text{g/l}$  z czego w połowie przypadków (14/27) poziomy enzymu znajdują się w granicach wartości oznaczonych dla zdrowej grupy kontrolnej (średnia 273  $\mu\text{g/l}$ , rozpiętość 95% 117-637  $\mu\text{g/l}$ )<sup>42</sup>.

### 1.5.2 AMYLAZA

$\alpha$ -Amylaza to enzym hydrolizujący wiązanie 1,4- $\alpha$ -glikozydowe skrobi rozkładając ją do maltozy, maltotriozy i  $\alpha$ -dekstryn<sup>43</sup>. Enzym ten należy do metaloprotein, dlatego też do prawidłowego funkcjonowania potrzebuje metalu - wapnia<sup>43</sup>. Optymalna wartość pH do działania wynosi 6,9 -7,0<sup>43</sup>. Masa cząsteczkowa enzymu waha się od 54 do 62 kDa<sup>43</sup>. Enzym ten podlega filtracji kłębuszkowej w nerkach przez co można go wykryć nie tylko w osoczu, ale również i w moczu<sup>43</sup>. W porównaniu do surowicy, aktywność amylazy w moczu osiąga wyższe wartości oraz utrzymuje się przez dłuższy czas<sup>43</sup>. Amylaza obecna jest w wielu narządach<sup>43,44</sup>. Jednak największą aktywność tego enzymu obserwuje się w tkankach pochodzących ze ślinianki przyusznej, podżuchwowej oraz trzustki<sup>44</sup>. Aktywność w innych tkankach (jelito czcze, kręte, dwunastnica, jelito grube, płuca, jajowód, tarczycy) jest do 1000 x niższe niż w śliniankach czy trzustce, dlatego też ich znaczenie kliniczne jest ograniczone<sup>44</sup>. Ślinianki wydzielają głównie izoenzym S  $\alpha$ -amylazy (określaną też jako ptialina), natomiast trzustka typ P<sup>44</sup>. Aktywność  $\alpha$ -amylazy we krwi w warunkach fizjologicznych jest zasadniczo stała i niska, natomiast istotnie wzrasta u pacjentów z zapaleniem trzustki lub ślinianek<sup>43</sup>. Wykazano, iż poziom aktywności amylazy nie koreluje z ciężkością ostrego zapalenia trzustki, jednak im wyższy wzrost enzymu tym większe prawdopodobieństwo ostrego zapalenia trzustki<sup>43</sup>. Podwyższone wartości amylazy można zaobserwować również w: niewydolności nerek, niedrożności jelita cienkiego, zatorze tętnicy krezkowej, ciąży pozamacicznej, guzach jajnika lub płuca, makroamylazemii<sup>43</sup>. Niska aktywność  $\alpha$ -amylazy (izoenzymu P) w surowicy jest wysoce specyficzna dla niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki<sup>43</sup>. Amylaza jest stabilnym enzymem – pełna aktywność utrzymuje się przez 4 dni w temperaturze pokojowej, do 2 tygodni w temperaturze do -4°C, do 1 roku w temperaturze -25°C, do 5 lat w temperaturze -75°C<sup>43</sup>.

### 1.5.3 DEHYDROGENAZA MLECZANOWA

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) to enzym oksydoredukcyjny, katalizujący przemianę mleczanu do pirogronianu i odwrotnie<sup>43</sup>. Masa cząsteczkowa enzymu wynosi 134 kDa<sup>43</sup>. Składa się z czterech łańcuchów polipeptydowych wywodzących się z 2 grup: typ M „mięśniowy” oraz typ H „sercowy” (Tabela 4)<sup>43</sup>. Enzym ten obecny jest we wielu komórkach i niezmiennie zawsze związany jest z cytoplazmą komórkową<sup>43</sup>. Aktywność LDH w tkankach jest od 1500 do 5000 razy wyższa niż ta stwierdzana w warunkach fizjologicznych w surowicy krwi<sup>43</sup>. Śmierć komórek na drodze nekrozy prowadzi do rozpadu organeli wewnątrzkomórkowych i uwolnienia zawartości komórki do przestrzeni pozakomórkowej (w tym również do krwi)<sup>45</sup>. Fakt ten jest wykorzystywany w diagnostyce martwicy komórkowej<sup>45</sup>. Mimo iż wzrost LDH obserwuje się u pacjentów z zawałem serca, zapaleniem wątroby, nowotworach czy w hemolizie, obecnie oznaczanie tego enzymu utrzymało swoje zastosowanie kliniczne jedynie w hematologii i onkologii<sup>43,46</sup>. LDH jest enzymem niestabilnym na zmiany temperatur (zwłaszcza ujemnych)<sup>43</sup>. Aktywność izoenzymów LDH 4 i 5 maleje jeśli surowica jest przechowywana w temperaturze -20°C<sup>43</sup>. Dopuszczalne jest przechowywanie surowicy 24 godziny w temperaturze pokojowej<sup>47</sup>. Przechowywanie surowicy w tych samych warunkach przez 3 dni powoduje obniżenie całkowitego poziomu LDH o 20%<sup>47</sup>.

**Tabela 4. Charakterystyka izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej.**

| Izoenzym LDH | Skład polipeptydów                  | Główne źródła tkankowe                                  |
|--------------|-------------------------------------|---|
| LDH 1        | HHHH; H <sub>4</sub>                | serce, nerki, erytrocyty                                |
| LDH 2        | HHHM; H <sub>3</sub> M              | serce, nerki, erytrocyty                                |
| LDH 3        | HHMM; H <sub>2</sub> M <sub>2</sub> | śledziona, płuca, węzły chłonne, leukocyty, płytki krwi |
| LDH 4        | HMMM; HM <sub>3</sub>               | wątroba, mięśnie szkieletowe                            |
| LDH 5        | MMMM; M <sub>4</sub>                | wątroba, mięśnie szkieletowe                            |

#### 1.5.4 DEHYDROGENAZA JABŁCZANOWA

Dehydrogenaza jabłczanowa (MDH) to szeroko rozpowszechniony w przyrodzie enzym występujący w organizmach roślin, zwierząt i ludzi<sup>48</sup>. Występuje we wszystkich tkankach. Znaczne ilości enzymu obecne są w mięśniu sercowym, wątrobie, mięśniach szkieletowych, mózgu i nerkach. W komórce zlokalizowany jest w mitochondrium oraz w cytoplazmie. Uczestniczy w NAD/NADH zależnej odwracalnej przemianie jabłczanu do szczawiooctanu<sup>49</sup>. Reakcja ta jest etapem cyklu kwasu cytrynowego (cyklu Krebsa) oraz elementem mostka jabłczanowo-asparaginianowego transportującego wodory z NADH do wnętrza mitochondrium<sup>49</sup>. Zasadniczo podwyższoną aktywność tego enzymu w surowicy stwierdza się w sytuacjach uszkodzenia komórek<sup>50</sup>. Wzrost aktywności MDH stwierdza się w ostrym polekowym uszkodzeniu wątroby (acetaminofen), a także w trakcie przewlekłego jej uszkodzenia (w marskości wątroby)<sup>50</sup>.



## 1.6 AMINOKWASY

Aminokwasy stanowią podstawowy element strukturalny każdego peptydu oraz białka, jak również substrat do wytwarzania hormonów (np. trójiodotyroniny, tyroksyny, adrenalina), związków biologicznie czynnych (np. tlenek azotu, histamina), neurotransmiterów (np. dopamina, noradrenalina, serotonina), glukozy, puryny, pirymidyny oraz energii<sup>51</sup>. Spośród 300 aminokwasów występujących w przyrodzie 20 stanowi monomeryczne jednostki białek (Tabela 5)<sup>51</sup>. Niemiej jednak, w niektórych białkach stwierdza się dodatkowe aminokwasy (np. hydroksyprolina, hydroksylizyna), będące wynikiem potranslacyjnej modyfikacji<sup>51</sup>. Główne źródło aminokwasów dla człowieka stanowią białka spożywane z pokarmem. Białko w przewodzie pokarmowym ulega kilkietapowemu procesowi trawienia. Enzymy proteolityczne żołądka (pepsyna), soku trzustkowego (trypsyna, chymotrypsyna, karboksypeptydazy), a następnie aminopeptydazy i karboksypeptydazy jelitowe prowadzą do uwolnienia aminokwasów, które to następnie podlegają procesom wchłonięcia<sup>51</sup>. Poziom aminokwasów w surowicy jest pochodną: a) wchłaniania z przewodu pokarmowego (wynik trawienia białek), b) uwolnienia (degradacji) z tkanek w wyniku proteolizy (np. w proteasomach, lizosomach), c) syntezy oraz d) wykorzystywania przez tkanki docelowe. Głównym produktem końcowym rozpadu aminokwasów jest mocznik<sup>51</sup>.

**Tabela 5. Podział aminokwasów<sup>51</sup>**

| <b>Aminokwasy egzogenne</b><br>(aminokwasy, których organizm nie może syntetyzować) | <b>Aminokwasy endogenne</b><br>(aminokwasy, które organizm może syntetyzować) |
|---|---|
| Arginina (Arg, R)**   | Alanina (Ala, A)  |
| Histydyna (His, H) **   | Arginina (Arg, R)*  |
| Feniloalanina (Phe, F)  | Asparagina (Asn, N)   |
| Izoleucyna (Ile, I)   | Asparaginan, kwas asparaginowy (Asp, D)                                       |
| Leucyna (Leu, L)  | Cysteina (Cys, C)   |
| Lizyna (Lys, K)   | Glicyna (Gly, G)  |
| Metionina (Met, M)  | Glutaminian, kwas glutaminowy (Glu, E)  |
| Treonina (Thr, T)   | Glutamina (Gln, Q)  |
| Tryptofan (Try, W)  | Prolina (Pro, P)  |
| Walina (Val, V)   | Seryna (Ser, S)   |
|   | Tyrozyna (Tyr, Y)   |

Aminokwasy warunkowo (względnie) egzogenne: \*- u dorosłych; \*\* - u niemowląt

W surowicy pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki (PZT) stwierdzono podwyższone stężenie glutaminianu, natomiast obniżenie stężenia glutaminy, histydyny, tyrozyny, proliny, tryptofanu i treoniny<sup>52</sup>. Zaobserwowano również trend w kierunku niższych stężeń dla: lizyny, alaniny, metioniny oraz waliny<sup>52</sup>. Całkowita suma aminokwasów surowicy była nieznacznie niższa niż w surowicy grupy kontrolnej, składającej się ze zdrowych osób<sup>52</sup>. Obniżony poziom niektórych aminokwasów (zwłaszcza egzogennych oraz zawierających pierścień aromatyczny) w surowicy pacjentów z PZT wynika najpewniej z niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki<sup>52</sup>.

U pacjentów we wczesnej fazie OZT (1-3 doba choroby) w surowicy stwierdzono obniżenie L-argininy oraz L-cytruliny<sup>53</sup>. L-arginina stanowi substrat dla syntazy tlenku azotu (NOS ang. nitric oxide synthase) wytwarzającej tlenek azotu (NO) oraz L-cytrulinę<sup>53</sup>. W eksperymentalnie wywoływanym OZT u szczurów stwierdzono znaczny wzrost iNOS (indukowalnej NOS)<sup>54</sup>. Nagłe zużycie znacznej ilości argininy przez iNOS może spowodować deficyt dostępności substratu dla eNOS (endotelialna/śródbłonkowa NOS – bierze udział w relaksacji naczyń) i nNOS (neurogenna NOS – bierze udział w rozkurczu zwieracza Oddiego)<sup>54</sup>. Sandstrom i wsp. (2008) zbadali stężenia aminokwasów w surowicy w pierwszych 5 dobach OZT oraz po 6 tygodniach od choroby i zauważyli, iż jedynie stężenie glutaminianu oraz fenyloalaniny było wyższe przy przyjęciu niż po 6 tygodniach obserwacji<sup>55</sup>. Pozostałe zbadane aminokwasy (z wyjątkiem tauryny, asparaginianu i tryptofanu) wykazywały niższe stężenie w pierwszej dobie badania<sup>55</sup>.

Niedożywienie białkowo-energetyczne, wynikające ze zmniejszenia przyjmowanego pokarmu lub/i nasilonych reakcji katabolicznych, powoduje u osób w podeszłym wieku uogólnione obniżenie stężenia wszystkich aminokwasów w surowicy<sup>56</sup>.

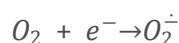
## 1.7 WOLNE KWASY TŁUSZCZOWE

Wolne kwasy tłuszczowe (FFA, ang. free fatty acids) oraz glicerol są produktami enzymatycznego rozpadu triglicerydów. W zależności od obecności lub braku w cząsteczce wiązania podwójnego, kwasy te dzielimy odpowiednio na nienasycone i nasycone. Enzymy uczestniczące w rozkładzie triacylogliceroli należą do grupy enzymów hydrolitycznych i określane są mianem lipaz. FFA działają jak detergenty przez co mają zdolność do niszczenia błon komórkowych<sup>57</sup>. Zauważono iż, stopień martwicy komórkowej koreluje z czasem i stężeniem oddziaływujących na nie kwasów tłuszczowych<sup>57</sup>. Niszczenie komórek przez FFA może być zahamowane przez albuminę, która posiada zdolności wiążące FFA<sup>57</sup>. Schmidt i Lankisch (1978) w swoim badaniu na szczurach wywoływali martwicę trzustki poprzez iniekcję do przewodu trzustkowego lub w mięsz trzustki kwasu oleinowego (jednonienasycony FFA) lub oleju oliwkowego (mieszanina różnych kwasów tłuszczowych)<sup>58</sup>. Martwicy ani stanu zapalnego nie spowodowała podawana w tym samym eksperymencie parafina (substancja niezawierająca FFA oraz nie posiadająca aktywności powierzchniowej), wykluczając tym samym, iż powstanie martwicy trzustki było wynikiem mechanicznego rozdarcia tkanek, powstającego w trakcie iniekcji badanej substancji<sup>58</sup>. W martwicy tkanki tłuszczowej związanej z eksperymentalnie wywołanym OZT u szczurów, obserwuje się szybką hydrolizę triglicerydów, skutkującą wysokim stężeniem FFA wewnątrz martwicy<sup>59,60</sup>. FFA uwolnione z jednej komórki, poprzez oddziaływanie na sąsiednie komórki, powodują lawinowe szerzenie się martwicy<sup>58</sup>.

## 1.8 PRODUKTY REAKTYWNYCH FORM TLENU

W warunkach fizjologicznych jak i patologicznych tlen (do 5 % ilości wdychanej) ulega niecałkowitej redukcji z wytworzeniem reaktywnych form tlenu (RFT)<sup>61,62</sup>. Substancje te mogą być neutralnymi cząsteczkami, jonami lub wolnymi rodnikami tlenowymi. Spośród wymienionych poniżej (Tabela 6) rodnik hydroksylowy należy do najbardziej aktywnych RFT, reagujących z większością biocząsteczek<sup>61</sup>. Etapy redukcji tlenu przedstawiono na Rycinie 4.

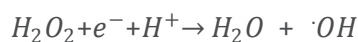
1. Powstanie anionorodnika ponadtlenkowego



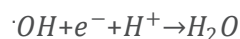
2. Powstanie nadtlenku wodoru



3. Powstanie wody i rodnika hydroksylowego



4. Powstanie wody



5. Całkowita redukcja tlenu (podsumowanie)



**Rycina 4. Etapy redukcji tlenu do cząsteczki wody.**

Zdecydowana większość RFT w komórce wytwarzana jest przez mitochondrialny łańcuch oddechowy. Zachwianie równowagi między nadmierną produkcją RFT, a zdolnościami antyoksydacyjnymi organizmu nazywane jest „stresem oksydacyjnym”<sup>63</sup>. Prowadzi on między innymi do utleniania biocząsteczek (białek, lipidów, węglowodanów, kwasów nukleinowych) powodując zmianę ich struktury (np. rozerwanie łańcucha, tworzenia wiązań krzyżowych, pojawienie się zmienionych reszt aminokwasowych) i tym samym funkcji<sup>63</sup>.

Zmodyfikowane oksydacyjnie białcząsteczki odgrywają rolę zarówno w procesie starzenia się jak i patogenezie wielu chorób<sup>64</sup>. W warunkach fizjologicznych pełnią funkcję regulatorów i mediatorów wielu procesów metabolicznych takich jak np. aktywacja genów, różnicowanie komórek, apoptoza czy nieswoista odpowiedź zapalna<sup>65</sup>. Powstawanie i kumulowanie się utlenionych produktów białkowych stwierdzono w chorobach neurodegeneracyjnych (choroba Parkinsona, Alzheimera), miażdżycy, cukrzycy, nieswoistych zapaleniach jelit, otyłości, u osób z chorobą nowotworową i u palaczy tytoniu<sup>64,66,67</sup>. Reaktywne formy tlenu odgrywają również rolę w ostrym zapaleniu trzustki poprzez m.in. destabilizację lizosomów oraz wakuoli zymogenu<sup>4</sup>.

**Tabela 6. Reaktywne formy tlenu<sup>61</sup>**

| Nazwa                      | Wzór              |
|----------------------------|-------------------|
| Anionorodnik ponadtlenkowy | $O_2^{\bullet -}$ |
| Rodnik hydroksylowy        | $OH^{\bullet}$    |
| Rodnik wodoronadtlenkowy   | $HO_2^{\bullet}$  |
| Rodnik nadtlenkowy         | $ROO^{\bullet}$   |
| Rodnik alkoksylowy         | $RO^{\bullet}$    |
| Nadtlenek wodoru           | $H_2O_2$          |
| Kwas podchlorawy           | $HOCl$            |
| Kwas podbromawy            | $HOBr$            |

Badając wpływ RFT na poszczególne związki w trakcie stresu oksydacyjnego, dostępnych jest obecnie wiele użytecznych biomarkerów (Tabela 7)<sup>61</sup>

**Tabela 7. Biomarkery tkankowe stresu oksydacyjnego – modyfikacja tabelki wg źródła<sup>61</sup>**

| <b>Proces</b>       | <b>Marker</b>   |
|---------------------|---|
| Uszkodzenie białek  | Grupy karbonylowe białek  |
| Uszkodzenie lipidów | Izoprostany<br>Dialdehyd malonowy (MDA)<br>Przeciwciała przeciwko utlenionej postaci LDL (Ab oxLDL) |
| Uszkodzenie DNA     | 8-hydroksy-2'-deoksyguanozyna (8-OHdG)  |

### *1.8.1 MODYFIKACJA BIAŁEK*

Grupa karbonylowa to grupa funkcyjna składająca się z atomu węgla (C) połączonego podwójnym wiązaniem z atomem tlen (O) [C=O]. Do podstawowych związków karbonylowych należą aldehydy i ketony.

Ocena stopnia uszkodzeń oksydacyjnych białek jest możliwa poprzez określenie stężeń związków powstających na skutek działania RFT tj: wodoronadtlenów białek, alkoholi czy grup karbonylowych<sup>64</sup>. Wodoronadtlenki białek są nietrwałe, ulegają rozpadowi pod wpływem światła, podwyższonej temperatury, związków redukujących i jonów metali - dlatego też nie są najlepszymi markerami stresu oksydacyjnego<sup>64</sup>. Mimo, iż alkohole są stosunkowo trwałymi związkami, to również nie należą do najlepszych wskaźników stresu oksydacyjnego, ponieważ wiele z nich jest obecnych w prawidłowych białkach, a niektóre podlegają dalszym reakcjom chemicznym<sup>64</sup>. Utlenianie reszt aminokwasowych do związków o charakterze aldehydów lub ketonów skutkuje powstaniem stosunkowo trwałej grupy karbonylowej możliwej do jakościowego i ilościowego oznaczania<sup>64</sup>.

### *1.8.2 MODYFIKACJA LIPIDÓW*

Izoprostany (IsoP) to grupa związków powstających w wyniku nieenzymatycznej wolnorodnikowej peroksydacji (utleniania) wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (głównie kwasu arachidonowego)<sup>68</sup>. Powstają *in vivo* i *in vitro* pod wpływem działania reaktywnych form tlenu, a swoją budową przypominają prostaglandyny<sup>68</sup>. Związki te są nie tylko markerami stresu oksydacyjnego, ale również wykazują różnorodną aktywność biologiczną: powodują skurcz lub rozkurcz naczyń krwionośnych, skurcz mięśni gładkich naczyń chłonnych, oskrzeli, jelit, macicy, wykazują działanie mitogenne, antyagregacyjne w stosunku do płytek krwi czy też przeciwzapalne – poprzez znoszenie adhezji monocytów do śródbłonna<sup>68</sup>.

Dostępne jest kilka metod oznaczania ilościowego IsoP. Te stabilne chemicznie związki można wykryć metodami chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas oraz metodami immunoenzymatycznymi<sup>68,69</sup>.

### *1.8.3 MODYFIKACJA KWASÓW NUKLEINOWYCH*

Spośród ponad 20 dotychczas zidentyfikowanych oksydacyjnych modyfikacji zasad DNA najlepiej poznaną jest 8-oksy-2'-deoksyguanozyna, znana również i opisywana jako forma tautomeryczna 8-hydrokso-2'-deoksyguanozyna (8-OH-dG)<sup>70</sup>. Związek ten może tworzyć stabilne pary zasad z adeniną i prawdopodobnie z guaniną (zamiast cytozyną), powodując podczas procesu replikacji DNA błędne wprowadzenie nukleotydu zawierającego tyminę i tym samym uszkodzić (zmutować) DNA<sup>70</sup>. Szacuje się, iż w ciągu doby w każdej komórce powstaje  $10^5$  oksydacyjnych uszkodzeń DNA. Komórki posiadają sprawne i skuteczne mechanizmy naprawy DNA, jednakże pewna część uszkodzeń może doprowadzić do transformacji nowotworowej.



W analizie oksydoredukcyjnych uszkodzeń DNA stosuje się m. in. wysokosprawną chromatografię cieczową lub chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas oraz metody immunodetekcji (ELISA)<sup>70</sup>.

## 1.9 PŁYTKOWY CZYNNIK WZROSTU

Płytkowy czynnik wzrostu (PDGF, ang. platelet-derived growth factor) - zidentyfikowany w latach 70tych XX wieku – jest białkiem utworzonym z 2 polipeptydów tworzących hetero- lub homodimer<sup>71</sup>. Wyodrębniono 4 rodzaje łańcuchów peptydowych (A, B, C, D) budujących 5 aktywnych izoform tego czynnika (AA, BB, AB, CC, DD) i regulujących odpowiedź komórkową przez 2 receptory posiadające właściwości kinazy tyrozynowej (PDGFR-alfa i PDGFR-beta)<sup>71,72</sup>. Mimo, iż PDGF jest w głównej mierze syntetyzowany i uwalniany przez trombocyty, może być również produkowany przez inne rodzaje komórek takie jak np.: fibroblasty, komórki mięśni gładkich, aktywowane makrofagi, monocyty, komórki nabłonka dróg oddechowych, komórki glejowe, astrocyty i komórki nowotworowe<sup>73</sup>. PDGF działa pierwotnie jako parakryny czynnik wzrostu, jednakże może również oddziaływać w pętlach autokryny – co stwierdzono głównie w nowotworach<sup>71</sup>. Podczas rozwoju zarodkowego PDGF jest czynnikiem mitogennym i chemotaktycznym, uczestniczącym we wzroście, różnicowaniu i migracji różnych komórek<sup>71,73</sup>. W dorosłym organizmie zaangażowany jest w regenerację nabłonka i procesy naprawy tkanek poprzez pobudzenie syntezy kolagenu I i II oraz glikozaminoglikanów<sup>73</sup>. Odgrywa on również istotną rolę w rozwoju naczyń krwionośnych<sup>73</sup>. Odpowiedzialny jest również za fagocytozę produktów martwicy, rozkład wewnątrzpęcherzykowej fibryny oraz resorpcję płynu obrzękowego ze światła pęcherzyków płucnych i tkanki śródmiąższowej<sup>73,74</sup>. Peptyd PDGF-B posiada budowę zbliżoną do onkogenu (c-sis)<sup>71</sup>. Odkrycie to wykazało, że istnieje związek pomiędzy transformacją nowotworową, a normalnym rozwojem komórki<sup>71</sup>. Schorzenia w patofizjologii których uczestniczy PDGF można ogólnie podzielić na trzy grupy: nowotwory,

choroby naczyniowe (miażdżyca, nadciśnienie płucne, retinopatia) oraz choroby związane z włóknieniem (zwłóknienie płuc, wątroby, nerek, serca, sklerodermia)<sup>71</sup>.

## 1.10 TRANSFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTU BETA

Transformujące czynniki wzrostu (TGF ang. transforming growth factors) zostały wykryte w 1978 i nazwane „sarcoma growth factors”<sup>75</sup>. TGF- $\beta$  to plejotropowa cytokina w budowie której można wyróżnić 3 izoformy (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) kodowane przez różne geny<sup>75</sup>. Ekspresję TGF- $\beta$ 1 stwierdzono w komórkach śródbłonna, hemopoetycznych oraz tkanki łącznej, TGF- $\beta$ 2 – w komórkach nabłonka oraz nerwowych, TGF- $\beta$ 3 – w komórkach mezenchymalnych<sup>75</sup>. Cytokina ta uwalniana jest z komórki w nieaktywnej (latentnej) formie<sup>76</sup>. Aktywacja – odłączenie białka LAP (ang. latency associated protein) – następuje pod wpływem różnych czynników, takich jak wahania temperatury i pH, promieniowanie jonizujące, trombospondyna czy plazmina<sup>77</sup>. W transdukcji sygnału zaangażowane są 3 typy błonowych receptorów – charakteryzujących się aktywnością kinaz serynowo-treoninowych<sup>77</sup>. In vitro cytokina ta wpływa na proliferację, różnicowanie, apoptozę oraz syntezę i degradację składników macierzy pozakomórkowej<sup>75,77</sup>. Badania na modelach zwierzęcych udowodniły, iż TGF- $\beta$  uczestniczy w patogenezie chorób autoimmunologicznych – systemowe podanie cytokiny tłumilo objawy choroby z autoagresji, natomiast przeciwciała anti-TGF- $\beta$  powodowały progresję choroby<sup>75</sup>. Uważa się, że TGF- $\beta$  – zwłaszcza izoforma 1 – wykazuje silny związek z procesem włóknienia zarówno w stanach fizjologii (gojenie rany) jak i patologii (włóknienie płuc, wątroby, sklerodermia)<sup>75,76</sup>. Cytokina ta stymuluje powstawania kolagenu (blizny), jak i zmniejsza produkcję enzymów (metaloproteinaz) degradujących macierz pozakomórkową<sup>75,76</sup>. Statystycznie istotny wzrost TGF- $\beta$ 1 zaobserwowano w surowicy pacjentów z przewlekłym zapaleniem trzustki (patologii której cechą charakterystyczną jest m.in. włóknienie)<sup>78</sup>. W ww badaniu stwierdzono równolegle podwyższone stężenie innych markerów włóknienia pozakomórkowego – lamininy

i kwasu hialuronowego<sup>78</sup>. Ponadto zaburzenia szlaku przewodzenia sygnału TGF- $\beta$  stwierdzono w wielu chorobach nowotworowych (np. białaczkach, raku jelita grubego, płuc)<sup>75</sup>. Niewrażliwość na TGF- $\beta$  (poprzez mutację genu czynnika wzrostowego lub receptora) przyczynia się do niekontrolowanej proliferacji komórkowej i transformacji nowotworowej<sup>75</sup>. Wzrastający poziom TGF- $\beta$  powoduje immunosupresję, promuje angiogenezę oraz sprzyja powstawaniu przerzutów<sup>75</sup>.

### 1.11 PODSUMOWANIE WPROWADZENIA

Ostre martwicze zapalenie trzustki stanowi poważny problem kliniczny zarówno dla chorego jak i prowadzącego lekarza. Pomimo poszerzenia i pogłębienia wiedzy wiele pytań o etiopatogenezę tej patologii pozostaje bez odpowiedzi. Dotychczasowe narzędzia służące do przewidywania przebiegu choroby czy oceniające ryzyko zgonu są w dalszym ciągu niewystarczające. W trakcie ostatnich dwóch dekad zdefiniowano na nowo, a następnie zrewidowano podstawowe pojęcia związane z ostrym zapaleniem trzustki - wprowadzono m. in. pojęcie otorbionej martwicy trzustki. W dostępnym piśmiennictwie nie przedstawiono do tej pory analizy biochemicznej tak zdefiniowanego zbiornika trzustkowego. Mając w pamięci fakt złego rokowania chorych z zakażoną martwicą trzustki i niewydolnością wielonarządową, oraz mając możliwość pobrania płynu martwiczego w trakcie terapeutycznych zabiegów endoskopowych otorbionej martwicy trzustki, postanowiłem dokonać analizy biochemicznej płynu martwiczego, a w szczególności ocenić elementy wyszczególnione we wprowadzeniu.

## 2. CEL PRACY

Zasadniczym celem rozprawy doktorskiej była biochemiczna analiza krwi oraz płynu z otorbionej martwicy trzustki u chorych po przebytych ostrym rzucie zapalenia trzustki.

A w szczególności:

- Poszukiwanie różnic i zależności pomiędzy wybranymi parametrami laboratoryjnymi krwi i/lub surowicy u chorych z jałową i zakażoną otorbioną martwicą trzustki
- Poszukiwanie różnic i zależności pomiędzy wybranymi parametrami laboratoryjnymi krwi i/lub surowicy oraz płynu ze zbiornika trzustkowego chorych z jałową i zakażoną otorbioną martwicą trzustki
- Poszukiwanie różnic i zależności pomiędzy wybranymi parametrami laboratoryjnymi płynu ze zbiornika trzustkowego u chorych z jałową i zakażoną otorbioną martwicą trzustki

## 3. MATERIAŁ I METODYKA

### 3.1 GRUPA BADANA

Do badania zakwalifikowano zgodnie z poniższymi kryteriami 37 chorych leczonych w Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Badanie zostało pozytywnie zaopiniowane przez Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym oraz przeprowadzone zgodnie z Deklaracją Helsińską Światowego Stowarzyszenia Lekarzy. Wszyscy chorzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Oznaczenia biochemiczne (analityczne) zostały wykonane w Katedrze i Zakładzie Biochemii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed), Katedrze i Zakładzie Biochemii Farmaceutycznej GUMed oraz w Uniwersyteckim Centrum Medycyny Laboratoryjnej przy Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku.

### *3.1.1 KRYTERIA WŁĄCZENIA:*

- Chorzy z otorbioną martwicą trzustki potwierdzoną na podstawie obrazu klinicznego (ostre martwicze zapalenia trzustki w wywiadzie) oraz badań radiologicznych (CECT, EUS, MRI) zakwalifikowani do endoterapii
  - Chorzy z podejrzeniem lub potwierdzoną zakażoną otorbioną martwicą trzustki
  - Pacjenci z objawową otorbioną martwicą trzustki
- Osoby dorosłe ( $\geq 18$  lat) obojga płci
- Wyrażenie pisemnej zgody na badanie

### *3.1.2 KRYTERIA WYKLUCZAJĄCE:*

- Pacjenci z ostrym zbiornikiem martwicznym
- Pacjenci z bezobjawową otorbioną martwicą trzustki
- Charakter nowotworowy zbiornika płynowego trzustki
- Osoby poniżej 18 roku życia
- Kobiety w ciąży lub karmiące piersią
- Brak pisemnej zgody na badanie

### 3.2 PROCEDURA ENDOSKOPOWA

Wszystkie procedury endoskopowe zostały przeprowadzone liniowym endoskopem ultrasonograficznym (Pentax EG 3870UTK/Hitachi Avius) przez jednego endoskopistę.

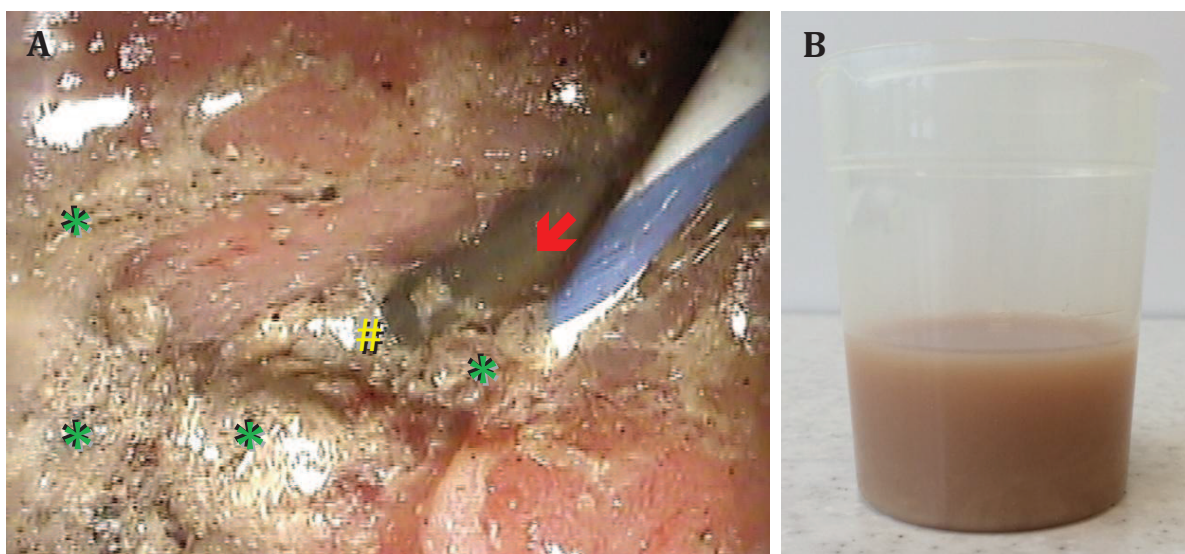
W dniu planowanego zabiegu wykonano podstawowe badania laboratoryjne w Uniwersyteckim Centrum Medycyny Laboratoryjnej. Pobrano ponadto krew do oznaczeń w Katedrze i Zakładzie Biochemii GUMed. Każdy chory przed rozpoczęciem procedury endoskopowej otrzymał dożylny antybiotyk – ceftriakson, natomiast u chorych z zakażoną martwicą trzustki kontynuowano dotychczasową antybiotykoterapię.

Po podaniu leków przeciwbólowych i sedatywnych (petydyna lub fentanyl, midazolam lub diazepam) pod kontrolą obrazu ultrasonograficznego, po wyborze optymalnego miejsca, wykonano gastro- lub duodenocystostomię. Wytworzoną cystostomię za pomocą fistulotomu 7 Fr (Huibregtse Triple Lumen Needle Knife HPC-3, Cook Medical, Bloomington, Unites States of America) lub cystostomu Giovanniniego (Cystotome CST-10, Cook Medical, Bloomington, Unites States of America) poszerzono następnie mechanicznie za pomocą cewnika (Soehendra Biliary Dilation Catheters SBDC-8.5, SBDC-10, Cook Medical, Bloomington, Unites States of America) lub balonu wysokopróżniowego o średnicy 8 mm (Dilation Balloon, Balloon Length 60mm/Diameter 8mm, G-Flex, Nivelles, Belgium). Przez stomię wprowadzono zasadniczo jedną lub dwie endoprotezy 7Fr “double pigtail” (Biliary Stent Double Pigtail, MarFlow AG, Adliswil/Zurich, Switzerland) oraz dren nosowy 8 Fr (NBDC, Ace Medical Devices, India).

Chorzy zakwalifikowani do niniejszego opracowania (przebieg ich choroby oraz efekty stosowanego leczenia) znajdują się w toku dalszej obserwacji klinicznej.

### 3.3 IDENTYFIKACJA, POBIERANIE I PRZECHOWYWANIE PŁYNU MARTWICZEGO

Wypływający ciemny (od jasnobrązowego do czarnego koloru), cuchnący zwłaszcza, gdy jest zakażony, mętny, z widocznymi elementami martwiczymi płyn został zidentyfikowany jako treść martwicza (Zdjęcie 1).



**Zdjęcie 1. Wygląd płynu martwiczego z otorbionej martwicy trzustki.**

**A) Zabieg wytworzenia gastrocystostomii (#) do drenażu otorbionej martwicy trzustki. Na zdjęciu widoczne w okolicy wprowadzanego układu drenującego (🔴) wypływające masy martwicze (\*).**

**B) Usunięty płyn z otorbionej martwicy trzustki.**

Podczas pierwszej procedury drenażowej, przed podaniem kontrastu, cewnikiem wprowadzonym przez stomię pobrano płyn martwiczny i niezwłocznie rozdzielono go na poszczególne próbki. Pobrano 5 probówek 2ml typu Eppendorf i zamrożono w ciekłym azocie (-196°C). Pozostały płyn martwiczny w 2-3 probówkach po 14 ml każda w temperaturze pokojowej został dostarczony w ciągu 30 minut do Katedry i Zakładu Biochemii GUMed, gdzie płyn natychmiast odwirowano (20000 x g przez 20 minut) i rozdzielono na dwie frakcje: supernatant i osad, a następnie zamrożono w - 80°C. Równoległe płyn został



dostarczony drogą wewnętrzną do laboratoriów Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego celem rutynowych badań [mikrobiologicznych, cytologicznych, biochemicznych – badanie ogólne, antygen rakowo-płodowy (CEA, ang. carcinoembryonic antigen), antygen nowotworowy 19-9 (CA 19-9, ang. cancer antigen 19-9), amylaza].

### 3.4 METODY OZNACZEŃ WYBRANYCH PARAMETRÓW BIOCHEMICZNYCH

#### 3.4.1 *DEHYDROGENAZA MLECZANOWA I JABŁCZANOWA*

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej mierzono spektrofotometrycznie oznaczając spadek stężenia NADH w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM pirogronian, 175  $\mu$ M NADH i płyn martwicy w objętości powodującej spadek absorbancji ( $\Delta E$  340 nm) o około 0.02 do 0.1 w ciągu minuty.

Aktywność dehydrogenazy jabłczanowej mierzono spektrofotometrycznie oznaczając spadek stężenia NADH w mieszaninie reakcyjnej zawierającej 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM szczawiooctan, 175  $\mu$ M NADH i płyn martwicy w objętości powodującej spadek absorbancji ( $\Delta E$  340 nm) o około 0.02 do 0.1 w ciągu minuty.

Oznaczenia wykonano z wykorzystaniem spektrofotometru Beckman DU 68 (Beckman Instruments, Fullerton, Calif., USA). Oznaczone enzymów wykonano nie później niż 2 godziny od pobrania materiału od pacjenta.

#### 3.4.2 *WOLNE KWASY TŁUSZCZOWE*

Stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy oraz w płynie martwicznym zostało zmierzone enzymatyczno-kolorymetryczną metodą zgodną z protokołem dostarczonym przez producenta Wako Chemicals GMBH (Germany) ([http://www.wako-chemicals.de/DWD/111327/upload/media\\_132969.pdf](http://www.wako-chemicals.de/DWD/111327/upload/media_132969.pdf))

### 3.4.3 GRUPY KARBONYLOWE

Oznaczanie grup karbonylowych zostało przeprowadzone za pomocą zmodyfikowanej metody Levina. Opiera się ona na reakcji 2,4-dinitrofenylohydrazyny (DNPH) z grupami karbonylowymi białek<sup>62</sup>. Powstające produkty mają charakterystyczne żółte zabarwienie<sup>62</sup>. Daje to możliwość oznaczenia kolorymetrycznego grup karbonylowych<sup>62</sup>.

0,1ml roztworu 20mM DNPH w 2M kwasie solnym (HCl) został dodany do 0,1 ml próbki surowicy lub płynu<sup>67</sup>. Próbę kontrolną stanowiła surowica lub płyn (0,1 ml) z 2M roztworem HCl (0,1 ml)<sup>67</sup>. Po jednej godzinie inkubacji w 25°C powiązanej z ciągłym mieszaniem, wytrącono białka poprzez dodanie 0,5 ml 20% kwasu trichlorooctowego (TCA)<sup>67</sup>. Po odwirowaniu przez 10 minut (3000 x g), supernatant został usunięty, a wytrącony osad przepłukano 3-krotnie roztworem etanolu/octanu etylu (1:1)<sup>67</sup>. Ostatecznie, wytrącone białko zostało rozpuszczone w 1ml 6-molowego guanidyny w 60°C<sup>67</sup>. W tak przygotowanych próbach oznaczono absorbancję (względem próby kontrolnej) przy długości fali 360 nm<sup>67</sup>. Zawartość grup karbonylowych została obliczona na podstawie molarnego współczynnika absorpcji – 22,000<sup>67</sup>.

### 3.4.4 UTLENIONE POCHODNE GUANINY

Stężenie utlenionych pochodnych guaniny (8-hydrokso-2'-deoksyguanozyny z DNA, 8-hydroksoguanozyny z RNA, 8-hydroksoguaninę z DNA lub RNA) w surowicy oraz w płynie martwiczym zostało oznaczone za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) zgodną z protokołem dostarczonym przez firmę Cayman Chemical Company (United States) (<https://www.caymanchem.com/pdfs/589320.pdf>)

### 3.4.5 IZOPROSTANY

Stężenie 8-izoprostanu F<sub>2A</sub> w surowicy oraz w płynie martwicznym zostało oznaczone za pomocą testu immunoenzymatycznego (EIA ang. Enzyme Immunoassay) zgodną z protokołem dostarczonym przez firmę Cayman Chemical Company (United States) (<https://www.caymanchem.com/pdfs/516351.pdf>)

### 3.4.6 AMINOKWASY

Stężenie poszczególnych aminokwasów w surowicy i płynie martwicznym zostało oznaczone za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej ze spektrometrem mas (ang. high-performance liquid chromatography / mass spectrometry).

Z badanego płynu (0,4ml) wytrącono białko za pomocą 10% TCA<sup>52</sup>. Po odwirowaniu w 4°C, 12000 x g przez 5 minut, supernatant został zebrany i usunięto z niego pozostały TCA za pomocą eteru dietylowego<sup>52</sup>. Następnie uzyskany materiał został rozpuszczony w 0,1 ml 10mM kwasie nonafluoropentanowym i wodzie<sup>52</sup>. Do rozdzielania chromatograficznego użyto następujących kolumn: 3µm Hypersil BDS 150 mm x 2,0 mm<sup>52</sup>. Detector mas z jonizacją typu electrspray (Thermo-Finnigan LCQ Advantage, Waltham, MA, USA) został ustawiony w trybie MS2 celem detekcji aminokwasów z energią kolizji nastawioną na 25%<sup>52</sup>. Identyfikacja poszczególnych aminokwasów została oparta na podstawie masy molekularnej, wzoru fragmentacji oraz chromatograficznego czasu retencji<sup>52</sup>.

### 3.4.7 BIAŁKO CAŁKOWITE

Białko całkowite w płynie martwicznym zostało oznaczone metodą Lowry'ego, po uprzednim strąceniu go za pomocą 0.6 molowego kwasu nadchlorowego (HClO<sub>4</sub>) i rozpuszczeniu osadu wodorotlenkiem sodu (NaOH). Metoda ta wykorzystuje się dwie odrębne reakcje: reakcje aminokwasów aromatycznych z odczynnikami Folina-Ciocalteu (kompleksu kwasów fosfomolibdenowego i fosfowolframowego) oraz reakcję jonów miedzi (II) z wiązaniami

peptydowymi (reakcja biuretowa). Do 500  $\mu$ l badanego płynu martwiczego dodano 500  $\mu$ l odczynnika miedziowego (3 ml roztworu siarczanu miedzi (II) -  $\text{CuSO}_4$ , 3 ml 0,8 M wodorotlenku sodu - NaOH, 6ml 5% detergentu dodecylosiarczanu sodu - SDS). Po odczekaniu 10 minut w temperaturze pokojowej dodano 250  $\mu$ l odczynnika Folina-Ciocalteu'a i dokładnie wymieszano. Po 30 minutach oznaczono absorbancję przy długości fali  $\lambda=750\text{nm}$ . Zmiana barwy powstałego roztworu na niebieską jest proporcjonalna do ilości powstałych kompleksów miedziowo-białkowych.

#### *3.4.7.1 ELEKTROFOREZA BIAŁEK*

Elektroforeza białek – próbki surowicy oraz płynu martwiczego zawierającego po 10  $\mu$ g białka zostały rozdzielone na żelu poliakrylamidowym w obecności detergentu dodecylosiarczanu sodu i 2-merkaptoetanolu (10% SDS-PAGE). 2-merkaptoetanol powoduje rozpad białek oligomerycznych na składowe polipeptydy, natomiast dodecylosiarczan sodu opłascza wszystkie polipeptydy nadając im ładunek ujemny. Szybkość migracji w polu elektrycznym poszczególnych białek zależy więc jedynie od masy cząsteczkowej. Poszczególne białka zatrzymane na żelu uwidaczniane są za pomocą błękitu kumassi (ang. Coomassie Brilliant Blue, trifenylometan).

#### *3.4.8 PŁYTKOWY CZYNNIK WZROSTU BB*

Stężenie czynnika wzrostu w surowicy oraz w płynie martwicznym zostało oznaczone za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA zgodną z protokołem dostarczonym przez firmę Ray Biotech, Inc. (United States) (<http://www.raybiotech.com/files/manual/ELISA/ELH-PDGFBB.pdf>)

### *3.4.9 TRANSFORMUJĄCY CZYNNIK WZROSTU BETA 1*

Stężenie cytokiny zostało oznaczone w surowicy i w płynie martwicznym za pomocą testu ELISA zgodną z protokołem dostarczonym przez firmę R&D System (United Kingdom) (<http://www.rndsystems.com/pdf/DB100B.pdf>)

### *3.4.10 PODSTAWOWE BADANIA LABORATORYJNE*

Standardowe badania laboratoryjne krwi/surowicy zostały oznaczone w Uniwersyteckim Centrum Medycyny Laboratoryjnej przy Uniwersyteckim Centrum Klinicznym w Gdańsku. Stężenie trypsyny zostało oznaczone metodą radioimmunologiczną w laboratorium Labor Limbach w Heidelbergu (za pośrednictwem Laboratorium Bruss).

## **3.5 ANALIZA STATYSTYCZNA**

Analiza statystyczna została wykonana z wykorzystaniem pakietu Statistica - wersja 10 i 12 (Stat Soft. Inc) na licencji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Danych demograficzne zostały przedstawione za pomocą elementów statystyk opisowych. Wszystkie wyniki zostały przedstawione jako: średnia arytmetyczna wraz z błędem standardowym średniej (SEM ang. Standard Error of the Mean) oraz zakresem wyników (wartość minimalna – wartość maksymalna). W zależności od rozkładu wyników, różnice statystyczne zostały obliczone za pomocą testów parametrycznych (t-Studenta) lub nieparametrycznych (U Mann-Whitneya, Wilcoxon, ANOVA Friedmana). Korelacje pomiędzy wybranymi parametrami ocenione zostały na podstawie testów korelacji r Pearsona (test parametryczny) lub R Spearmana (test nieparametryczny). Za poziom istotności przyjęto  $p < 0.05$ .

## 4. WYNIKI

### 4.1 CHARAKTERYSTYKA GRUPY BADANEJ

Do grupy badawczej zakwalifikowano 37 chorych o podstawowych danych antropomorficznych podsumowanych w tabeli 8. Grupę badawczą stanowiły pacjentki (1/3) i pacjenci (2/3) w wieku od 20 do 85 lat.

**Tabela 8. Podstawowe dane antropomorficzne pacjentów**

|  | <b>Mężczyźni</b> | <b>Kobiety</b> |
|--|------------------|----------------|
| <b>Liczba osób</b>   | 25               | 12             |
| <b>(%)</b>   | (67.6 %)         | (32.4 %)       |
| <b>Średnia wieku (lata) ± SEM</b>                                  | 47.8 ± 2.8       | 56.5 ± 5.3     |
| <b>(min. - max.)</b>   | (20 - 79)        | (32 - 85)      |
| <b>Średnia wskaźnika masy ciała [BMI] (kg/m<sup>2</sup>) ± SEM</b> | 25 ± 1.3         | 26.5 ± 1.9     |
| <b>(min. - max.)</b>   | (16.4 - 37.3)    | (18.7 - 39.4)  |

Min. - wartość najmniejsza; Max. - wartość najwyższa; SEM - błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean); BMI - ang. body mass index

Tłło nowotworowe stwierdzanych zbiorników płynowych zostało wykluczone na podstawie obrazu klinicznego i radiologicznego (CT, MRI i/lub EUS) oraz badań dodatkowych płynu zbiornika tj: cytologicznych (w żadnym nie stwierdzono komórek nowotworowych), CEA (70.7 ng/ml ± 17.9) oraz CA 19.9 (18134 U/ml ± 12681.4). Tłło autoimmunologiczne choroby zostało wykluczone na podstawie obrazu klinicznego oraz niskich wartości IgG4 w surowicy pacjentów (1.09 G/l ± 0.2).

Charakterystykę grupy badawczej przedstawiono w Tabeli 9. U większości chorych (28 z 37 - ok. 76%) stwierdzono typ mieszany (tj. mięsisty i pozatrzustkowy) otorbionej martwicy trzustki. Wymiary zbiorników martwiczych mieściły się w granicach 6.2 – 25 cm (średnio 14.3 cm).

Spośród 37 chorych u 8 (21.6%) wskazaniem do rozpoczęcia endoterapii było zakażenie otorbionej martwicy trzustki. Patogenami odpowiedzialnymi za infekcję były: *Escherichia coli* (3-krotnie), *Enterococcus* (2-krotnie) oraz pojedyncze przypadki *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Candida*. U 4 osób w płynie martwicznym - jako mikroorganizm odpowiedzialny za zakażenie - stwierdzono pojedynczy patogen. W pozostałych przypadkach wyhodowano 2 lub 3 różne mikroorganizmy.

U pozostałych chorych wskazaniem do rozpoczęcia endoterapii WOPN były poniższe problemy kliniczne (Tabela 9). Ponad połowa pacjentów przed endoterapią podawała niemożliwe do opanowania bóle brzucha oraz postępującą utratę masy ciała. U 6 chorych (16.2%) obserwowano cechy utrudnionego pasażu przez górny odcinek przewodu pokarmowego. Żółtaczkę mechaniczną stwierdzono u co dziesiątego pacjenta (10.4%). Cukrzyca lub stany przedcukrzycowe (nieprawidłowa glikemia na czczo oraz upośledzona tolerancja glukozy) była obecna w wywiadzie u 15 z 37 chorych (40.5 %). Wyrównanie gospodarki cukrowej ocenione zostało na podstawie hemoglobiny glikowanej (HbA1C), która mieściła się w zakresie od 4.5 do 7.6 % (Tabela 10).



**Tabela 9. Charakterystyka chorych z otorbioną martwicą trzustki**

|   | <b>n</b>                 | <b>%</b> |
|---|--------------------------|----------|
| <b>Etiologia ostrego zapalenia trzustki</b>                           |                          |          |
| Etanol  | 14                       | 37.8 %   |
| Żółciopochodna  | 9                        | 24.4 %   |
| Inna (idiopatyczna, po ECPW i inne)                                   | 14                       | 37.8 %   |
| <b>Typ otorbionej martwicy trzustki</b>                               |                          |          |
| Izolowana martwica mięszu trzustki                                    | 7                        | 18.9 %   |
| Izolowana martwica tkanek pozatrzustkowych                            | 2                        | 5.4 %    |
| Mieszany typ (martwica mięszu trzustki oraz tkanek okołotrzustkowych) | 28                       | 75.7 %   |
| <b>Zakażona otorbioną martwicą trzustki</b>                           |                          |          |
|   | 8                        | 21.6 %   |
| pojedynczy rodzaj mikroorganizmu stwierdzony u                        | 4                        | 10.8 %   |
| <b>Jałowa otorbiona martwica trzustki</b>                             |                          |          |
|   | 29                       | 78.4 %   |
| <b>Wymiar zbiornika (cm)</b>  |                          |          |
| wartość średnia ± SEM (min. – max.)                                   | 14.3 ± 0.8<br>(6.2 – 25) |          |
| <b>Objawy kliniczne i dane z wywiadu:</b>                             |                          |          |
| Silne bóle brzucha  | 24                       | 64.9 %   |
| Cechy utrudnionego pasażu przewodu pokarmowego                        | 6                        | 16.2 %   |
| Żółtaczką   | 4                        | 10.8 %   |
| Utrata masy ciała   | 19                       | 51.4 %   |
| Cukrzyca lub stany przedcukrzycowe                                    | 15                       | 40.5 %   |
| <b>Chorzy palący papierosy (obecnie i/lub w wywiadzie)</b>            |                          |          |
|   | 23                       | 62.2 %   |
| <b>Chorzy nigdy niepalący</b>   |                          |          |
|   | 14                       | 37.8 %   |

Min. – wartość najmniejsza; Max. – wartość najwyższa; SEM – błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean);

## 4.2 ANALIZA PODSTAWOWYCH BADAŃ LABORATORYJNYCH

Charakterystykę chorych z otorbioną martwicą trzustki w pierwszym etapie rozpocząłem od analizy podstawowych badań laboratoryjnych krwi (Tabela 10). Chorzy z zakażoną otorbioną martwicą trzustki, w porównaniu z osobami z jałową martwicą, charakteryzują się statystycznie niższymi wartościami hemoglobiny (10.7 vs. 12.7 g/dl;  $p < 0.01$ ) i limfocytów (1.3 vs. 1.8 G/l;  $p < 0.05$ ) oraz wyższymi poziomami leukocytów (11.9 vs. 7.6 G/l;  $p < 0.05$ ), neutrocytów (9.7 vs. 4.9 G/l;  $p < 0.05$ ), wskaźnika neutrofilowo-limfocytarnego (9.5 vs. 3.1;  $p < 0.01$ ), odczynu Biernackiego (OB) (68.3 vs. 33 mm/h;  $p < 0.05$ ), białka C-reaktywnego (CRP) (162.9 vs. 27.7 mg/l,  $p < 0.05$ ). Zauważyłem również niespodziewaną istotną różnicę średnich poziomów aminotranferazy alaninowej – niższą u pacjentów z zakażoną martwicą trzustki (11.6 vs. 36.5 U/l;  $p < 0.05$ ), jednak o wartościach mieszczących się w granicach referencyjnych. U pacjentów z zakażoną martwicą trzustki obserwuje się ponadto istotnie statystycznie niższe stężenia w surowicy cholesterolu całkowitego (126.3 vs. 177 mg/dl;  $p < 0.05$ ) oraz albuminy (22.5 vs. 33.9 g/l;  $p < 0.01$ ). Stwierdzono również dodatnią statystycznie istotną korelację między stężeniem albuminy i sumy aminokwasów w surowicy ( $r = 0.48$ ;  $p < 0.05$ ) – Rycina 9.

**Tabela 10. Wybrane parametry laboratoryjne z krwi lub surowicy chorych z otorbioną martwicą trzustki.**

| Parametr                                       | Chorzy<br>z jałową<br>WOPN     | Chorzy<br>z zakażoną<br>WOPN   | Wartość<br>p |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------|
|  | Średnia ± SEM<br>(Min. – Max.) | Średnia ± SEM<br>(Min. – Max.) |              |
| <b>Hemoglobina<br/>(g/dl)</b>                  | 12.7 ± 0.3<br>(9.4 – 15.8)     | 10.7 ± 0.6<br>(8 – 14)         | <0.01        |
| <b>Leukocyty<br/>(G/l)</b>                     | 7.6 ± 0.4<br>(4.3 – 12.5)      | 11.9 ± 1.7<br>(6.3 – 19.2)     | <0.05        |
| <b>Granulocyty obojętnochłonne<br/>(G/l)</b>   | 4.9 ± 0.4<br>(2.3 – 10.1)      | 9.7 ± 1.7<br>(3.4 – 17.3)      | <0.05        |
| <b>Limfocyty<br/>(G/l)</b>                     | 1.8 ± 0.1<br>(0.8 – 2.7)       | 1.3 ± 0.2<br>(0.8 – 2.5)       | <0.05        |
| <b>Wskaźnik neutrofilowo-limfocytny</b>        | 3.1 ± 0.5<br>(1.4 – 12.6)      | 9.5 ± 2.4<br>(1.6 – 21.6)      | <0.01        |
| <b>Płytki krwi<br/>(G/l)</b>                   | 325.9 ± 43<br>(114 - 1019)     | 425.1 ± 94.1<br>(204 - 970)    | NS           |
| <b>Odczyn Biernackiego<br/>(mm/h)</b>          | 33 ± 5.6<br>(6 – 91)           | 68.3 ± 10<br>(49 – 83)         | <0.05        |
| <b>Białko C-reaktywne<br/>(mg/l)</b>           | 27.7 ± 10.1<br>(0.9 – 206.2)   | 162.9 ± 40.9<br>(32.2 – 347.1) | <0.01        |
| <b>Lipaza<br/>(U/l)</b>                        | 111.5 ± 41.9<br>(12 - 769)     | 107.6 ± 47.9<br>(4 - 391)      | NS           |
| <b>Bilirubina<br/>(mg/dl)</b>                  | 2.5 ± 1.2<br>(0.2 – 23.6)      | 0.8 ± 0.1<br>(0.3 – 1.4)       | NS           |
| <b>Aminotransferaza Alaninowa<br/>(U/l)</b>    | 36.5 ± 10.9<br>(5 – 247)       | 11.6 ± 1.7<br>(5 – 21)         | <0.05        |
| <b>Aminotransferaza Asparaginowa<br/>(U/l)</b> | 34.2 ± 9.8<br>(9 - 227)        | 19.4 ± 3.4<br>(12 - 42)        | NS           |

|   |                             |                            |       |
|---|-----------------------------|----------------------------|-------|
| <b>Gamma-glutamylotransferaza<br/>(U/l)</b> | 164 ± 63.9<br>(12 - 1098)   | 184.6 ± 66.5<br>(23 - 556) | NS    |
| <b>Fosfataza alkaliczna<br/>(U/l)</b>       | 167.1 ± 48.8<br>(51 - 1007) | 165.1 ± 66.5<br>(68 - 384) | NS    |
| <b>Azot mocznika<br/>(mg/dl)</b>            | 12.8 ± 0.9<br>(3.4 - 18.8)  | 11.4 ± 1.8<br>(6.2 - 19.3) | NS    |
| <b>Triacyloglicerydy<br/>(mg/dl)</b>        | 126.7 ± 7.7<br>(71 - 193)   | 135.3 ± 20.5<br>(81 - 210) | NS    |
| <b>Cholesterol całkowity<br/>(mg/dl)</b>    | 177 ± 12.9<br>(105 - 358)   | 126.3 ± 11.4<br>(83 - 168) | <0.05 |
| <b>Albumina<br/>(g/l)</b>                   | 33.9 ± 1.6<br>(15 - 47)     | 22.5 ± 0.8<br>(19 - 26)    | <0.01 |
| <b>Kreatynina<br/>(mg/dl)</b>               | 0.8 ± 0.03<br>(0.5 - 1.1)   | 0.6 ± 0.1<br>(0.5 - 1)     | NS    |
| <b>Hemoglobina A1c<br/>(%)</b>              | 5.7 ± 0.2<br>(4.5 - 7.5)    | 6.4 ± 0.3<br>(5.5 - 7.6)   | NS    |
| <b>Immunoglobina G4<br/>(G/l)</b>           | 1.1 ± 0.2<br>(0.17 - 4.15)  | 1.2 ± 0.5<br>(0.03 - 3.2)  | NS    |

WOPN - ang. walled-off pancreatic necrosis, otorbiona martwica trzustki; Min. - wartość najmniejsza; Max. - wartość najwyższa; SEM - błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean); NS - brak istotności statystycznej

### 4.3 ANALIZA WYBRANYCH PARAMETRÓW W SUROWICY I PŁYNIE MARTWICZYM

Następnym etapem analizy było oznaczenie wybranych parametrów w płynie martwicznym i porównanie ich z wartościami z surowicy (Tabela 11).

Stężenia glukozy jest statystycznie niższe w płynie martwicznym niż w surowicy (72.3 vs. 110.3 mg/dl;  $p < 0.01$ ), jednakże bez istotnych różnic zarówno w surowicy jak i płynie martwicznym pomiędzy jałową a zakażoną WOPN.

W przeciwieństwie do glukozy, poziomy: amylazy i wolnych kwasów tłuszczowych w płynie martwicznym są statystycznie wyższe niż w surowicy. Nie stwierdzono istotnych różnic dla amylazy i FFA w surowicy jak i płynie martwicznym pomiędzy jałową a zakażoną WOPN. Średnie stężenie trypsyny w płynie z jałowej martwicy trzustki było wyższe niż w płynie z zakażonej martwicy trzustki jednak różnice nie osiągnęły istotności statystycznej (Tabela 11).

Płyn martwiczny nie różni się statystycznie od surowicy pod względem zawartości sodu, potasu, wapnia. Nie stwierdzono ponadto istotnych różnic ww elektrolitów w płynie martwicznym pomiędzy pacjentami z jałową i zakażoną WOPN. Jednakże w surowicy pacjentów z zakażoną martwicą obserwuje się statystycznie niższe stężenia potasu (3.9 vs. 4.3 mmol/l;  $p < 0.05$ ) i wapnia całkowitego (8.4 vs. 9.2 mg/dl;  $p < 0.01$ ).

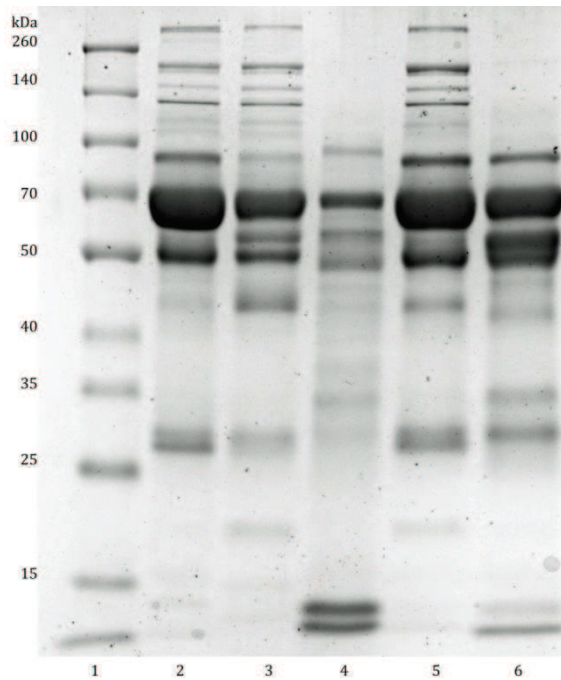
Średnie stężenia białka całkowitego jak i albuminy są statystycznie niższe w płynie martwicznym niż wyniki w surowicy. Ponadto w analizie podgrupowej obserwuje się niższe stężenia białka całkowitego i albuminy zarówno w surowicy jak i płynie martwicznym pacjentów z zakażoną WOPN (Tabela 11).

W elektroforezie białek surowicy i płynu martwiczego zaobserwowano, iż (po pierwsze) płyn martwiczny wykazuje duże podobieństwo do surowicy (Rycina 6). Po drugie, płyn wykazuje cechy znacznej proteolizy – zwłaszcza białek o wysokiej masie cząsteczkowej (Rycina 6 – ścieżka 4 i 6).

**Tabela 11. Wybrane parametry surowicy i płynu martwiczego pacjentów z otorbioną martwicą trzustki**

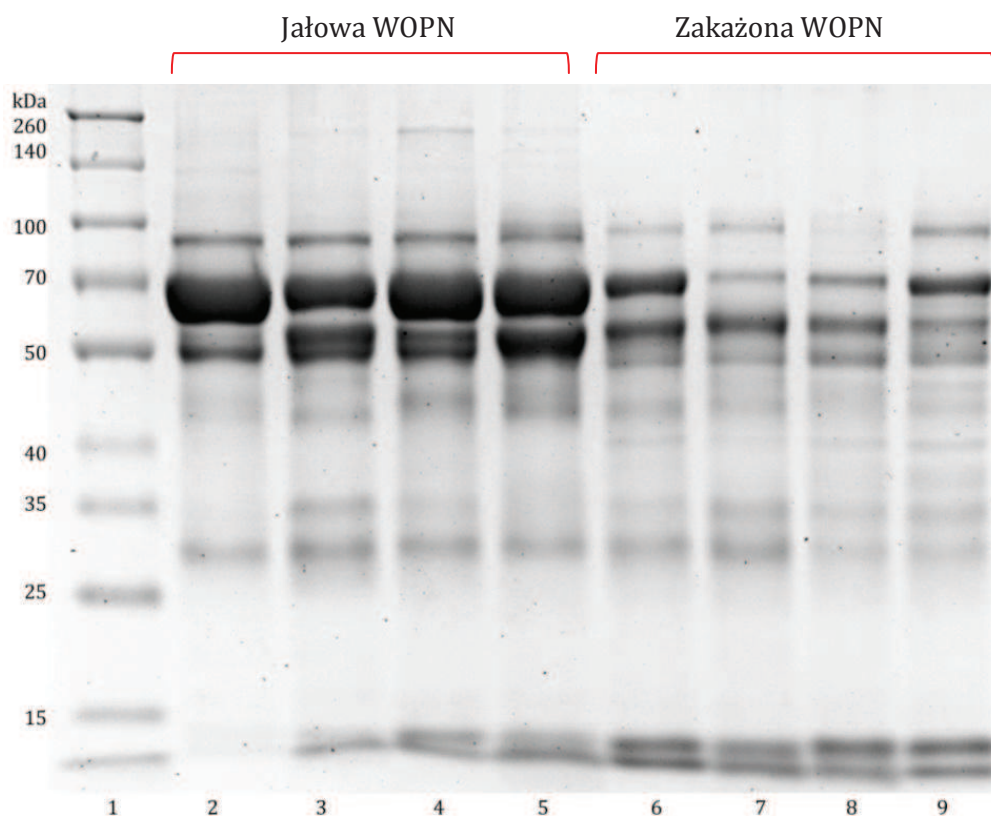
| Parametr                      | Surowica pacjentów z jałową WOPN<br>Średnia ± SEM<br>(Min. – Max.) | Surowica pacjentów z zakażoną WOPN<br>Średnia ± SEM<br>(Min. – Max.) | Wartość p<br>(różnica między jałową a zakażoną martwicą) | Płyn martwiczny pacjentów z jałową WOPN<br>Średnia ± SEM<br>(Min. – Max.) | Płyn martwiczny pacjentów z zakażoną WOPN<br>Średnia ± SEM<br>(Min. – Max.) | Wartość p<br>(różnica między jałową a zakażoną martwicą) |
|-------------------------------|--|--|--|---|---|--|
| <b>Białko całkowite</b>       |  |  |  |   |   |  |
| [g/l]                         | 71.6 ± 1.3<br>(58 – 81)  | 62.5 ± 2.5<br>(49 – 72)  | <0.01  | 33.8 ± 2.2<br>(29 – 40)   | 16.5 ± 2.9<br>(8 – 20)  | <0.05  |
| <b>Albumina</b>               |  |  |  |   |   |  |
| [g/l]                         | 33.9 ± 1.6<br>(15 – 47)  | 22.5 ± 0.8<br>(19 – 26)  | <0.01  | 8.5 ± 1.7<br>(0.3 – 23)   | 4.4 ± 1.5<br>(1.1 – 11)   | NS   |
| <b>Wolne kwasy tłuszczowe</b> |  |  |  |   |   |  |
| [mmol/l]                      | 0.4 ± 0.07<br>(0.2 – 1.2)  | 0.5 ± 0.08<br>(0.3 – 0.9)  | NS   | 2 ± 0.4<br>(0.4 – 5.5)  | 2.7 ± 1.1<br>(0.2 – 7.4)  | NS   |
| <b>Ciężar właściwy</b>        | nb   | nb   | -  | 1.01 ± 0.002<br>(1.0 – 1.0)   | 1.02 ± 0.004<br>(1.0 – 1.03)  | <0.05  |
| <b>pH</b>                     | nb   | nb   | -  | 7.4 ± 0.03<br>(7.1 – 7.7)   | 7 ± 0.1<br>(6.6 – 7.3)  | <0.01  |
| <b>Sód (Na)</b>               |  |  |  |   |   |  |
| [mmol/l]                      | 138.4 ± 0.7<br>(133 – 144)   | 136.5 ± 1.3<br>(132 – 143)   | NS   | 140.5 ± 1<br>(138 – 143)  | 140.5 ± 1.2<br>(138 – 143)  | NS   |
| <b>Potas (K)</b>              |  |  |  |   |   |  |
| [mmol/l]                      | 4.3 ± 0.07<br>(3.8 – 5)  | 3.9 ± 0.3<br>(2.5 – 5.7)   | <0.05  | 3.8 ± 0.1<br>(3.5 – 3.9)  | 4.2 ± 0.6<br>(3.1 – 5.7)  | NS   |
| <b>Wapń (Ca)</b>              |  |  |  |   |   |  |
| [mg/dl]                       | 9.2 ± 0.1<br>(8.2 – 9.8)   | 8.4 ± 0.3<br>(7.1 – 9.2)   | <0.01  | 8.1 ± 1<br>(5.4 – 9.6)  | 6.2 ± 0.8<br>(4.3 – 8)  | NS   |
| <b>Glukoza</b>                |  |  |  |   |   |  |
| [mg/dl]                       | 104.9 ± 4.5<br>(78 – 157)  | 116.1 ± 17.8<br>(71 – 223)   | NS   | 67.8 ± 7.3<br>(38 – 159)  | 62.7 ± 21.4<br>(5 – 128)  | NS   |
| <b>Amylaza</b>                |  |  |  |   |   |  |
| [U/l]                         | 161.7 ± 43.8<br>(35 – 823)   | 151.1 ± 39.7<br>(34 – 320)   | NS   | 30307.2 ± 8656<br>(97 – 172649)   | 22756.3 ± 5084.8<br>(8596 – 49359)  | NS   |
| <b>Trypsyna</b>               |  |  |  |   |   |  |
| [mg/l]                        | nb   | nb   | -  | 41.6 ± 11.4<br>(3.4 – 155)  | 31.7 ± 9.7<br>(2.4 – 73.2)  | NS   |

WOPN – ang. walled-off pancreatic necrosis, otorbiona martwica trzustki; Min. – wartość najmniejsza; Max. – wartość największa; SEM – błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean); nb – nie badano; NS – brak istotności statystycznej



**Rycina 6. Elektroforeza białek surowicy i płynu martwiczego. Ścieżka: (1) standard mas cząsteczkowych; (2) surowica zdrowej osoby; (3) surowica pacjenta z zakażoną otorbioną martwicą trzustki; (4) zakażony płyn martwiczny (pacjent ze ścieżki 3); (5) surowica pacjenta z jałową otorbioną martwicą trzustki; (6) jałowy płyn martwiczny (pacjent ze ścieżki 5).**

Po trzecie, w zakażonym płynie martwicznym obserwuje się bardziej nasiloną proteolizę niż w płynie jałowym (Rycina 7 – ścieżki 2-5 vs. 6-9) .



**Rycina 7. Elektroforeza białek płynu z otorbionej martwicy trzustki. Ścieżki: (1) standard masy cząsteczkowej; (2-5) jałowy płyn martwicy; (6-9) zakażony płyn martwicy**

Proteoliza w płynie martwicznym została ostatecznie potwierdzona oznaczając aminokwasy w surowicy i płynie martwicznym (Rycina 8). W przeciwieństwie do płynu martwicznego, stężenia aminokwasów w surowicy pacjentów z zakażoną WOPN były zasadniczo niższe niż w surowicy pacjentów z jałową WOPN (Tabela 12). Co więcej, suma wszystkich oznaczonych aminokwasów w surowicy (wartość średnia) była statystycznie ( $p < 0.01$ ) niższa u pacjentów z zakażoną martwicą w stosunku do pacjentów z jałową martwicą (Rycina 8). Z kolei stężenia aminokwasów w płynie martwicznym rozkładały się odwrotnie – obserwowano wyższe stężenia aminokwasów w zakażonym WOPN (Tabela 12). Również i tu różnica sum wszystkich oznaczonych aminokwasów w płynie martwicznym uzyskała istotność statystyczną ( $p < 0.05$ ) (Rycina 8).

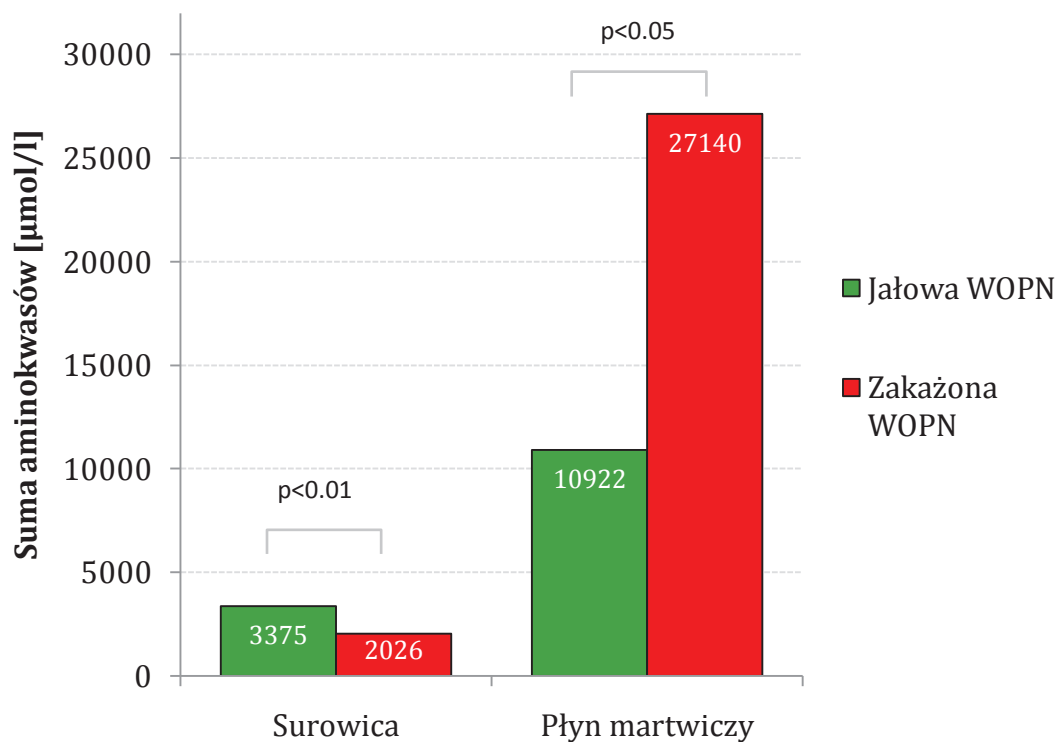


**Tabela 12. Stężenie poszczególnych aminokwasów w surowicy i płynie martwicznym u pacjentów z otorbioną martwicą trzustki.**

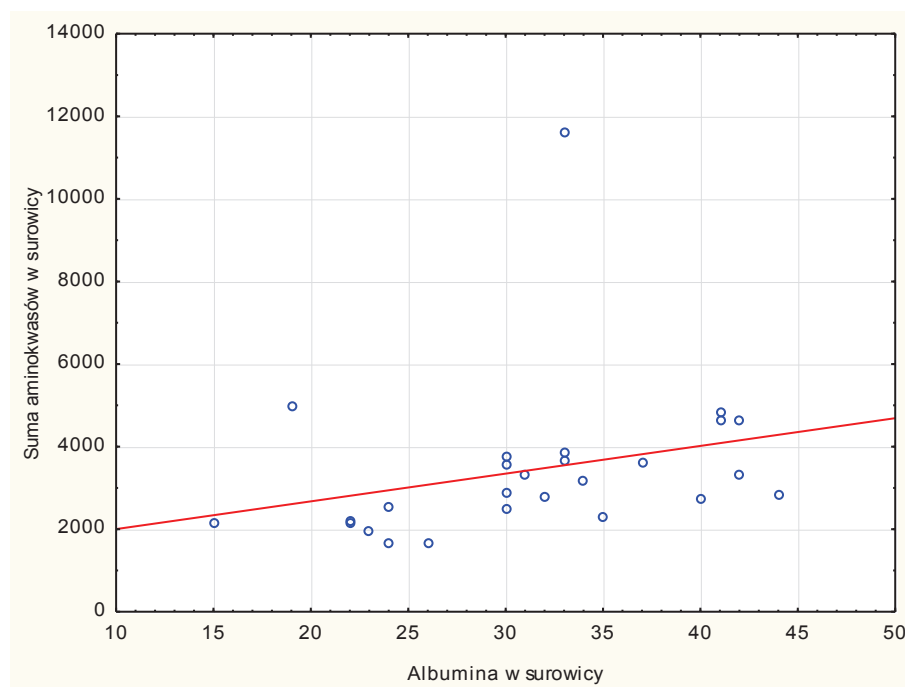
| Aminokwasy<br>( $\mu\text{mol/l}$ ) | Surowica pacjentów z<br>jąłową WOPN  |                                    | Surowica pacjentów z<br>zakazaną WOPN |                                    | wartość p                             | Płyn martwiczny<br>pacjentów z jąłową<br>WOPN |                                    | Płyn martwiczny<br>pacjentów z zakazaną<br>WOPN |  | wartość p |
|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|---|------------------------------------|---|--|-----------|
|                                     | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. - Max.)   | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. - Max.) | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. - Max.)    | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. - Max.) |                                       | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. - Max.)            | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. - Max.) |   |  |           |
| <b>Alanina</b>                      | 213.4 $\pm$ 39.1<br>(43.8 - 577.6)   | 62.1 $\pm$ 11.8<br>(27.6 - 106.4)  | <0.01                                 |                                    | 630.4 $\pm$ 281.9<br>(30.8 - 3427.3)  | 1590.9 $\pm$ 472.7<br>(306.8 - 3373.5)        | <0.05                              |   |  |           |
| <b>Arginina</b>                     | 106.8 $\pm$ 7.1<br>(67.4 - 158.8)    | 83.6 $\pm$ 15<br>(49.2 - 151.8)    | NS                                    |                                    | 538.2 $\pm$ 222.5<br>(77.1 - 2794)    | 1330.2 $\pm$ 681.7<br>(142.2 - 4542.9)        | NS                                 |   |  |           |
| <b>Asparagina</b>                   | 73.5 $\pm$ 6.3<br>(49 - 120)         | 42.6 $\pm$ 4.6<br>(24.3 - 54.9)    | <0.01                                 |                                    | 246.4 $\pm$ 89.9<br>(38.5 - 1104)     | 537.5 $\pm$ 167.6<br>(61.5 - 1157.4)          | NS                                 |   |  |           |
| <b>Kwas asparaginowy</b>            | 24.3 $\pm$ 5.7<br>(7.4 - 82.1)       | 11.5 $\pm$ 2.6<br>(4.7 - 21.4)     | NS                                    |                                    | 328.8 $\pm$ 184.7<br>(8.5 - 2291.9)   | 625.3 $\pm$ 206.6<br>(68.4 - 1369.9)          | <0.05                              |   |  |           |
| <b>Cystyna</b>                      | 34.9 $\pm$ 2.2<br>(22.5 - 51.7)      | 31.8 $\pm$ 4.8<br>(12 - 43.5)      | NS                                    |                                    | 142.5 $\pm$ 31.5<br>(56.6 - 410.6)    | 217.8 $\pm$ 42.2<br>(66.7 - 372.8)            | NS                                 |   |  |           |
| <b>Kwas glutaminowy</b>             | 145.9 $\pm$ 10.5<br>(95.2 - 200.9)   | 88.8 $\pm$ 17<br>(51.5 - 170.5)    | <0.01                                 |                                    | 681.6 $\pm$ 284.2<br>(109.8 - 3200.1) | 1490.6 $\pm$ 490.7<br>(372.5 - 3628.3)        | <0.05                              |   |  |           |
| <b>Glutamina</b>                    | 814.6 $\pm$ 42.4<br>(518.6 - 1043.4) | 485.2 $\pm$ 29.3<br>(374.7 - 577)  | <0.01                                 |                                    | 919.7 $\pm$ 74.7<br>(488.4 - 1440.9)  | 1321.9 $\pm$ 200.5<br>(643.5 - 1924.2)        | NS                                 |   |  |           |
| <b>Glicyna</b>                      | 302.4 $\pm$ 45.2<br>(150.2 - 641.4)  | 115.1 $\pm$ 19<br>(42.6 - 170.2)   | <0.01                                 |                                    | 999.7 $\pm$ 404<br>(85 - 4780.8)      | 1960.4 $\pm$ 569.9<br>(683.5 - 3766.3)        | <0.05                              |   |  |           |
| <b>Histydyna</b>                    | 84.4 $\pm$ 6<br>(52.9 - 127.2)       | 44.3 $\pm$ 2.7<br>(36.7 - 52.2)    | <0.01                                 |                                    | 265.1 $\pm$ 101.5<br>(70.4 - 1271.1)  | 596.9 $\pm$ 156.1<br>(144.3 - 1157.9)         | <0.05                              |   |  |           |
| <b>Izoleucyna i leucyna</b>         | 148.4 $\pm$ 14.9<br>(68.3 - 232)     | 115.9 $\pm$ 17.7<br>(52.1 - 176.2) | NS                                    |                                    | 776.6 $\pm$ 274.5<br>(128.2 - 3113.8) | 2677.3 $\pm$ 664.4<br>(460.9 - 5061.6)        | <0.05                              |   |  |           |
| <b>Lizyna</b>                       | 188.6 $\pm$ 20.3<br>(89.5 - 299)     | 93.1 $\pm$ 16.5<br>(47.6 - 154.2)  | <0.01                                 |                                    | 783.3 $\pm$ 342.3<br>(77.0 - 4199.8)  | 2190.5 $\pm$ 664.4<br>(269.5 - 4398.4)        | <0.05                              |   |  |           |
| <b>Metionina</b>                    | 28.2 $\pm$ 1.7<br>(18.3 - 40.7)      | 18.1 $\pm$ 2.6<br>(9.7 - 23.9)     | <0.01                                 |                                    | 132.5 $\pm$ 64.4<br>(12.9 - 807.7)    | 521.4 $\pm$ 170.2<br>(51.4 - 1096)            | <0.05                              |   |  |           |
| <b>Fenylalanina</b>                 | 78.1 $\pm$ 4<br>(61.8 - 114.7)       | 80.6 $\pm$ 12.4<br>(48.2 - 119.2)  | NS                                    |                                    | 534.1 $\pm$ 217.9<br>(104.5 - 2474.1) | 1772 $\pm$ 502.6<br>(280.5 - 3799.2)          | <0.05                              |   |  |           |
| <b>Prolina</b>                      | 216.8 $\pm$ 32.1<br>(111.8 - 566.1)  | 128.3 $\pm$ 9.8<br>(103.5 - 169.1) | <0.01                                 |                                    | 599.5 $\pm$ 145.7<br>(157.2 - 1653.1) | 1246.6 $\pm$ 370.4<br>(372.2 - 2742)          | <0.05                              |   |  |           |

|                         |                                 |                                   |       |  |  |       |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------|--|--|-------|
| <b>Hydroksyprolina</b>  | 12.5 ± 0.9<br>(6.7 - 18.7)      | 6.9 ± 1.2<br>(3.4 - 11.8)         | <0.01 | 27.8 ± 2.3<br>(15.8 - 40.8)            | 23.1 ± 3.6<br>(12.9 - 37.1)            | NS    |
| <b>Seryna</b>           | 138.3 ± 24.5<br>(19.4 - 354.3)  | 62.7 ± 12.6<br>(24.1 - 111.8)     | NS    | 505.6 ± 245.3<br>(27.6 - 2926.5)       | 790.8 ± 367.1<br>(77.2 - 2507.7)       | NS    |
| <b>Treonina</b>         | 69.6 ± 6.6<br>(41.8 - 111.2)    | 66.2 ± 15<br>(29.6 - 118.1)       | NS    | 542 ± 233.5<br>(72.4 - 2707.8)         | 1733.1 ± 512.2<br>(216.7 - 3546.2)     | <0.05 |
| <b>Tryptofan</b>        | 96.2 ± 8.2<br>(42.6 - 163.5)    | 57.7 ± 4.5<br>(43.4 - 71.7)       | <0.01 | 190.9 ± 76.4<br>(30.3 - 977.2)         | 633.2 ± 196.2<br>(99.6 - 1406.3)       | <0.05 |
| <b>Tyrozyzna</b>        | 95.5 ± 5<br>(61.9 - 121.9)      | 69.4 ± 5.6<br>(49.8 - 86.8)       | <0.01 | 439.1 ± 181.3<br>(65.4 - 2149)         | 1409 ± 485.3<br>(207.6 - 3521.7)       | <0.05 |
| <b>Walina</b>           | 332.2 ± 48.1<br>(124 - 742.5)   | 225.5 ± 41.3<br>(101.3 - 402.5)   | NS    | 866.4 ± 282.7<br>(209.5 - 3575.9)      | 1805.8 ± 459.2<br>(357.4 - 3213.5)     | NS    |
| <b>Suma aminokwasów</b> | 3375 ± 230.5<br>(2136.2 - 4965) | 2026.3 ± 142<br>(1638.8 - 2550.8) | <0.01 | 10921.5 ± 3911.5<br>(2091.2 - 42795.2) | 27140.1 ± 7296.7<br>(5404.6 - 50621.2) | <0.05 |

WOPN – ang. walled-off pancreatic necrosis, otorbiona martwica trzustki; Min. – wartość najmniejsza; Max. – wartość największa; SEM – błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean); NS – brak istotności statystycznej;



Rycina 8. Suma aminokwasów w surowicy i płynie martwicznym w pacjentów otorbioną martwica trzustki



Rycina 9. Wykres zależności między stężeniem albuminy w surowicy [g/l] a sumą aminokwasów w surowicy [µmol/l] - (r=0.48; p<0.05).

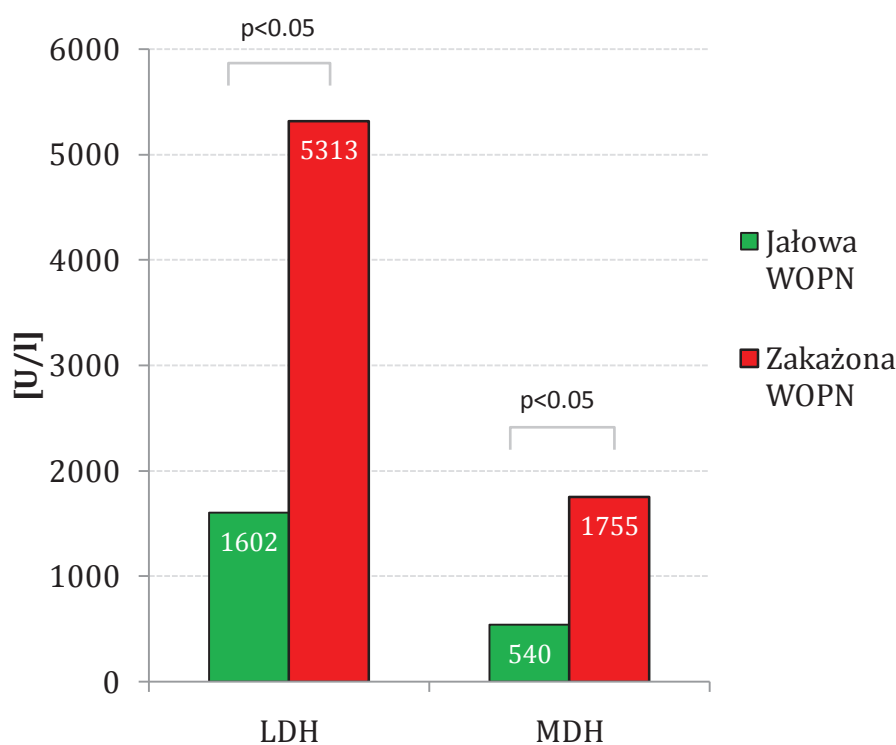
W kolejnym etapie analizy (na wybranej losowo podgrupie n=14) ocenilem katabolizm puryn – podstawowych elementów kwasów nukleinowych (Tabela 13). Stężenia hipokszantyny i ksantyny były niższe w surowicy niż w płynie martwicznym. Istotność statystyczną różnic uzyskano jedynie dla ksantyny (0.3 vs. 3.1  $\mu\text{mol/l}$ ,  $p < 0.05$ ). Stężenie kwasu moczowego było porównywalne w surowicy i płynie martwicznym. Nie dokonywano analizy wyników w podgrupach „zakazona/jałowa WOPN” z powodu małej liczebności dokonanych oznaczeń.

**Tabela 13. Wybrane elementy degradacji puryn w surowicy i płynie martwiczego pacjentów z otorbioną martwicą trzustki (n=14).**

| Parametr ( $\mu\text{mol/l}$ ) | Surowica                           | Płyn martwiczny                    | Wartość p |
|--------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------|
|                                | chorych z WOPN                     | chorych z WOPN                     |           |
|                                | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. – Max.) | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. – Max.) |           |
| Hipokszantyna                  | 5.5 $\pm$ 0.7<br>(2.6 – 10.7)      | 11.2 $\pm$ 6.3<br>(0.2 – 88.6)     | NS        |
| Kszantyna                      | 0.3 $\pm$ 0.08<br>(0# – 0.8)       | 3.1 $\pm$ 1.4<br>(0# – 19.1)       | <0.05     |
| Kwas moczowy                   | 109.1 $\pm$ 7.3<br>(49.3 – 140.6)  | 110.8 $\pm$ 10.2<br>(28.8 – 159.5) | NS        |

WOPN – ang. walled-off pancreatic necrosis, otorbiona martwica trzustki; Min. – wartość najmniejsza; Max. – wartość najwyższa; SEM – błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean); NS – brak istotności statystycznej; # - wartość nieoznaczalna.

W płynie z otorbionej martwicy trzustki oznaczono również aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i jabłczanowej (MDH) – uznanych markerów uszkodzenia i martwicy komórek. Zaobserwowano, iż aktywność LDH w płynie martwicznym jest od 7 do 25 razy wyższe niż wartości referencyjne obserwowane w surowicy (125-220 U/l). Stwierdzono ponadto zgodną tendencję do wyższych aktywności zarówno LDH jak i MDH w płynie z zakażonej WOPN – różnice te osiągnęły istotność statystyczną (Rycina 10). Zauważono również istotną statystycznie dodatnią korelację między parametrami stanu zapalnego (CRP i OB) a wartościami LDH i MDH w płynie martwicznym (Tabela 14).



Rycina 10. Aktywność LDH i MDH w płynie martwicznym u pacjentów z jałową i zakażoną otorbioną martwicą trzustki.

**Tabela 14. Wzajemne zależności pomiędzy wybranymi parametrami stanu zapalnego a aktywnością dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i jabłczanowej (MDH)**

| <b>Współczynniki korelacji</b> | <b>LDH<br/>(U/l)</b> | <b>MDH<br/>(U/l)</b> |
|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| Leukocyty (WBC)                | 0.05<br>NS           | 0.09<br>NS           |
| Białko C-reaktywne (CRP)       | 0.47<br>p<0.05       | 0.57<br>p<0.05       |
| Odczyn Biernackiego (OB)       | 0.46<br>p<0.05       | 0.59<br>p<0.05       |

NS – bez istotności statystycznej

W kolejnym etapie charakterystyki oznaczono w surowicy i w płynie martwicznym cytokiny biorące udział między innymi we włóknieniu – PDGF-BB i TGF $\beta$ 1. Uogólniając, zaobserwowano niższe stężenia obu cytokin w płynie martwicznym niż w surowicy (Tabela 15). Dla TGF $\beta$  uzyskane różnice osiągnęły istotność statystyczną (21.5 vs 34.6 ng/ml; p<0.05). Nie dokonywano analizy wyników w podgrupach „zakazona/jałowa WOPN” z powodu małej liczebności dokonanych oznaczeń dla PDGF w płynie martwicznym (n=7).

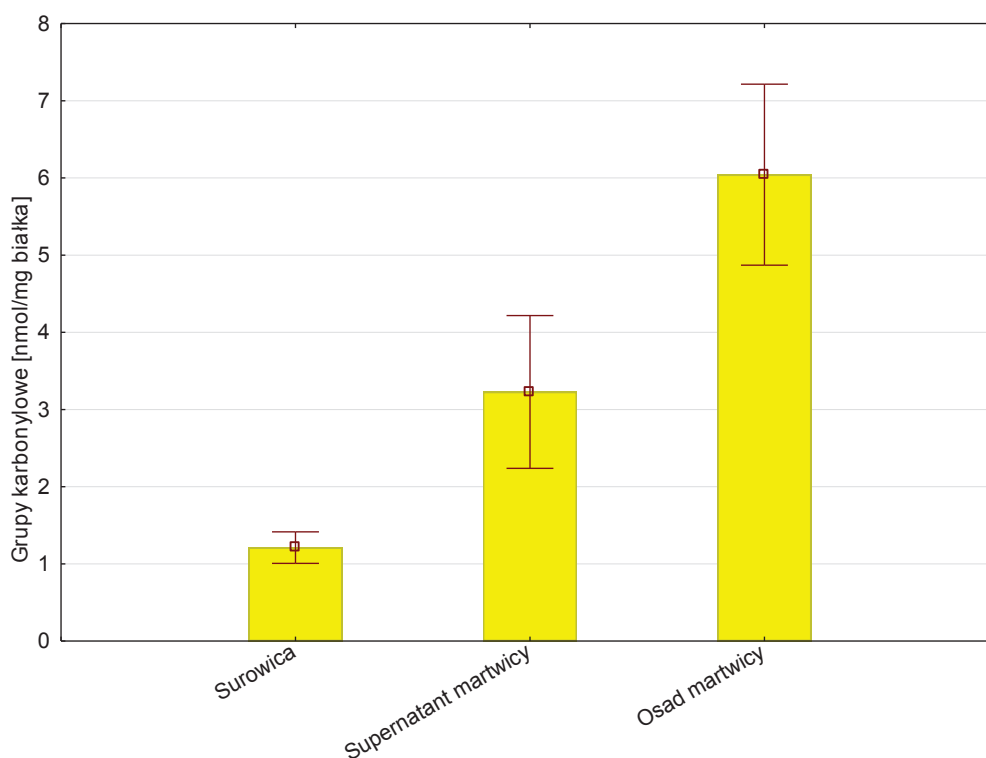
**Tabela 15. Wybrane parametry laboratoryjne z surowicy i płynu martwiczego pacjentów z otorbioną martwicą trzustki (n=28; n'=7(PGDG w płynie)).**

| <b>Parametr</b>  | <b>Surowica</b>                    | <b>Płyn martwiczny</b>             | <b>Wartość<br/>p</b> |
|--|------------------------------------|------------------------------------|----------------------|
|  | <b>chorych z WOPN</b>              | <b>chorych z WOPN</b>              |                      |
|  | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. – Max.) | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. – Max.) |                      |
| Płytkowy czynnik wzrostu (PDGF)<br>[ng/ml]                       | 1.6 $\pm$ 0.4<br>(0.17 – 7.45)     | 0.9 $\pm$ 0.5<br>(0.007 – 3.89)    | NS                   |
| Transformujący czynnik wzrostu $\beta$ (TGF $\beta$ )<br>[ng/ml] | 34.6 $\pm$ 5.3<br>(10.9 – 96.5)    | 21.5 $\pm$ 4.9<br>(0.4 – 86.1)     | <0.05                |

WOPN – ang. walled-off pancreatic necrosis, otorbiona martwica trzustki; Min. – wartość najmniejsza; Max. – wartość największa; SEM – błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean); NS – brak istotności statystycznej

Ostatnim elementem badania było oznaczenie w surowicy i płynie martwiczym produktów działania reaktywnych form tlenu (Tabela 16 i Rycina 11 i 12).

Stężenia grup karbonylowych w supernatancie oraz osadzie - uzyskanym po uprzednim odwirowaniu zawartości otorbionej martwicy trzustki - wynosiły odpowiednio średnio  $3.2 \pm 1$  nmol/mg białka i  $6 \pm 1.2$  nmol/mg białka i były wyższe od wartości oznaczonej w surowicy tych samych pacjentów ( $1.2 \pm 3.3$  nmol/mg białka). Istotność statystyczną ( $p < 0.05$ ) zaobserwowano dla różnicy między surowicą a osadem martwiczym ( $p < 0.001$ ) oraz surowicą a supernatantem martwicy ( $p < 0.05$ ). Produkty uszkodzenia kwasów nukleinowych przez reaktywne formy tlenu oceniono określając stężenie utlenionych pochodnych guaniny [8-hydroksy-2'-deoksyguanozyny (DNA), 8-hydroksyguanozyny (RNA) i 8-hydroksyguaniny (DNA lub RNA)]. Stężenie tych pochodnych w surowicy pacjentów z WOPN było istotnie niższe ( $p < 0.001$ ) niż w odwirowanym płynie martwiczym – odpowiednio 5.6 ng/ml vs. 28.2 ng/ml.



**Rycina 11. Oznaczenie grup karbonylowych w surowicy i martwicy (osadzie i supernatancie) u pacjentów z otorbioną martwicą trzustki (n=15)**

Wpływ reaktywnych form tlenu na tłuszcze określono oznaczając stężenie izoprostanu – produktu nieenzymatycznej peroksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, głównie kwasu arachidonowego. Stężenie izoprostanu było statystycznie wyższe ( $p < 0.001$ ) w płynie martwicznym niż w surowicy pacjentów z WOPN.

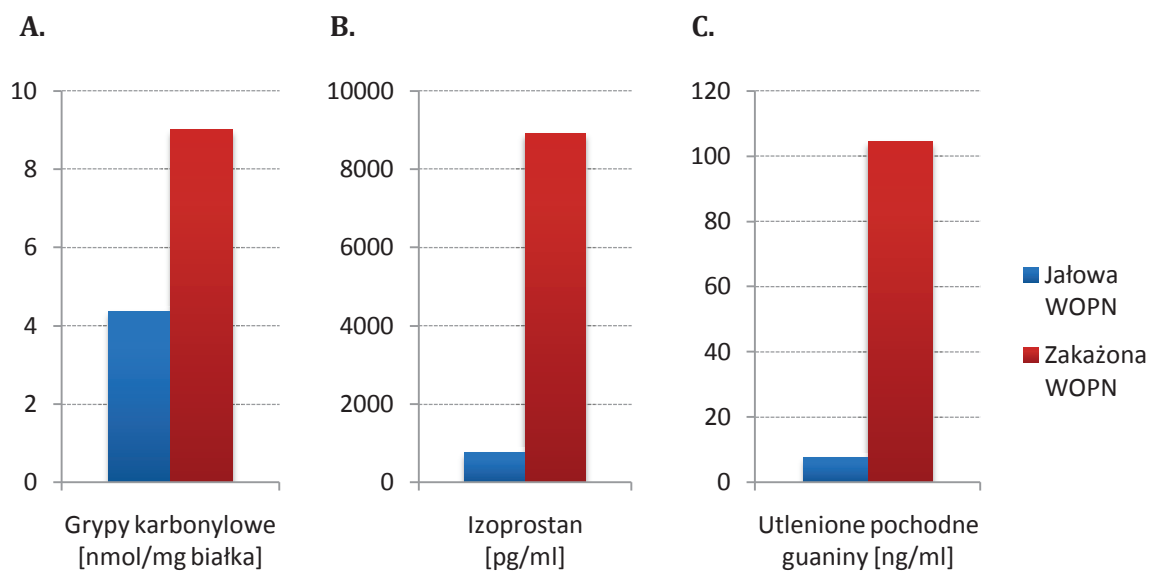
**Tabela 16. Wybrane produkty reaktywnych form tlenu w surowicy i płynie martwicznym pacjentów z otorbioną martwicą trzustki.**

| Parametr                              | Surowica                           | Płyn martwiczny                       | Wartość p |
|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-----------|
|                                       | chorych z WOPN                     | chorych z WOPN                        |           |
|                                       | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. – Max.) | Średnia $\pm$ SEM<br>(Min. – Max.)    |           |
| Grupy karbonylowe<br>[nmol/mg białka] | 1.2 $\pm$ 0.2<br>(0.7 – 3.3)       | 3.2 $\pm$ 1<br>(0.6 – 11.7)           | <0.05     |
| Utlenione pochodne guaniny<br>[ng/ml] | 5.7 $\pm$ 0.4<br>(2.2 – 12.8)      | 28.2 $\pm$ 16.5<br>(5.6 – 465.5)      | <0.001    |
| Izoprostany<br>[pg/ml]                | 28.7 $\pm$ 7.4<br>(8.4 – 134.6)    | 3146.9 $\pm$ 2226.8<br>(37.4 – 38170) | <0.001    |

WOPN – ang. walled-off pancreatic necrosis, otorbiona martwica trzustki; Min. – wartość najmniejsza; Max. – wartość najwyższa; SEM – błąd standardowy średniej (ang. standard error of the mean);

Dokonana analiza wyników w podgrupach „zakażona/jąłowa WOPN” wykazała, iż w osadzie zakażonego płynu martwicznego i w samym zakażonym płynie martwicznym obserwuje się wyższe poziomy wszystkich oznaczonych produktów reaktywnych form tlenu (tj. grup karbonylowych, utlenionych pochodnych guaniny, izoprostanu) niż w jąłowej WOPN (Rycina 12).





**Rycina 12. Produkty działania reaktywnych form tlenu w jałowej i zakażonej WOPN. A. Grupy karbonylowe w osadzie płynu z WOPN; B. Stężenie izoprostanu w płynie z WOPN; C. Stężenie utlenionych pochodnych guaniny w płynie z WOPN. W zakażonej otorbionej martwicy trzustki stwierdza się wyższy poziom produktów działania reaktywnych form tlenu niż w jałowym zbiorniku płynowym.**

## 5. DYSKUSJA

Głównym celem rozprawy doktorskiej było zbadanie pod względem biochemicznym płynu ze ściśle zdefiniowanej (wg Klasyfikacji z Atlanty 2012<sup>6</sup>) pozapalnej przestrzeni płynowej jakim jest otorbiona martwica trzustki (ang. walled-off pancreatic necrosis). Najważniejszym bodźcem do przeprowadzenia badania był brak dostatecznej wiedzy z zakresu badań podstawowych o składzie i patofizjologii tak zdefiniowanego zbiornika płynowego. Wcześniejsze nieliczne badania zazwyczaj nie różnicowały poszczególnych zbiorników pozapalnych powstających w trakcie zapalenia trzustki, a każdą przestrzeń płynową nazywano torbielą rzekomą. Ten chaos nozologiczny utrudnia, a czasem uniemożliwia porównywanie i interpretację wyników badań prowadzonych przez różnych autorów, z różnych ośrodków badawczych. Dodatkowo poszerzenie wiedzy z patofizjologii otorbionej martwicy trzustki może przyczynić się do optymalizacji terapii, która w dalszym ciągu wzbudza wiele kontrowersji<sup>4</sup>. Przebieg choroby jest w dalszym ciągu nieprzewidywalny. W piśmiennictwie można znaleźć szereg pojedynczych wskaźników oraz złożonych skal prognostycznych, które w większym lub mniejszym stopniu są w stanie przewidzieć ciężkość choroby<sup>4,79</sup>. Do pojedynczych wskaźników prognostycznych należą m.in.: wiek, wskaźnika masy ciała (BMI), hematokryt, azot mocznika, kreatynina, białko C reaktywne, natomiast złożone narzędzia prognostyczne to np.: skala Ransona, Glasgow (Imrie), APACHE-II, BISAP, Panc 3 (Załącznik)<sup>4,79</sup>. Tak duża ilość i różnorodność samodzielnych i zgrupowanych czynników prognostycznych świadczy, iż żaden z systemów nie jest idealny.

Lasson i wsp. w 1989 przebadali pod względem biochemicznym płyn z tzw. trzustkowych torbieli rzekomych i zauważyli, iż jest on mieszaniną białek osocza i soku trzustkowego, posiadającą wysoką aktywność proteolityczną<sup>33</sup>. Wykonana w trakcie przeprowadzonych badań elektroforeza białek płynu martwiczego wykazała, podobnie jak wyżej cytowana praca, iż płyn z otorbionej martwicy trzustki posiada cechy wspólne z obrazem elektroforetycznym białek surowicy badanych chorych (Rycina 6). Dodatkowo w płynie martwicznym obserwuje się cechy

proteolizy (zwłaszcza w obrębie białek o wysokiej masie cząsteczkowej), bardziej nasilonej w podgrupie pacjentów z zakażoną WOPN (Rycina 7). Dla potwierdzenia toczącego się procesu rozpadu białek wykazanego elektroforetycznie, oznaczono stężenie białka całkowitego i aminokwasów w płynie martwicznym – zgodnie z przewidywaniami stwierdzono obniżenie białka całkowitego i wzrost stężenia aminokwasów (produktów degradacji białek) (Tabela 11-12, Rycina 8). Zaskakującym wynikiem, choć nieistotnym statystycznie, jest wyższe stężenie trypsyny w jałowym WOPN niż w zakażonej martwicy (Tabela 11). W pierwszym odruchu wydawać się może, iż wynik jest sprzeczny z obserwacją – silniejszej proteolizy w zakażonej martwicy trzustki. Trypsyna jest uznanym kluczowym enzymem w patogenezie zapalenia trzustki. Należy jednak pamiętać, że trypsyna - podobnie jak inne białka - może ulec rozkładowi przez proteazy. W niniejszym opracowaniu trypsyna jest wyrażona ilościowo (mg/l), a nie funkcjonalnie (jako aktywność), dlatego też wynik należałoby interpretować tak samo jak wynik białka całkowitego i albuminy. Źródła proteaz w zakażonej martwicy trzustki należy szukać w bakteriach, choć nie można wykluczyć działania samej trypsyny – posiada ona właściwości autoaktywacyjne i autolityczne<sup>80,81</sup>.

Zakażona martwica trzustki wykazywała statystycznie wyższe stężenia aminokwasów niż płyn z jałowej martwicy, natomiast w surowicy zaobserwowano odmienny rozkład – stężenia aminokwasów były statystycznie niższe w zakażonej niż w jałowej WOPN (Rycina 8, Tabela 12). Jednym z możliwych powodów niższego stężenia aminokwasów w surowicy chorych z zakażoną martwicą może być trwający nasilony stan zapalny. Ujemna korelacja pomiędzy CRP a sumą aminokwasów w surowicy ( $r=-0.55$ ;  $p<0.05$ ) wydaje się potwierdzać powyższą tezę. Suliman i wsp. analizując pacjentów z przewlekłą chorobą nerek zauważyli niższe stężenia aminokwasów u pacjentów z toczącym się zapaleniem lub/i niedożywieniem<sup>82</sup>. Obecność zarówno zapalenia jak i niedożywienia wiązała się z niższymi stężeniami aminokwasów niż samo niedożywienie<sup>82</sup>. Autorzy ci również zaobserwowali istotną statystycznie ujemną korelację między stężeniem CRP i aminokwasów ( $r$  w granicach od  $-0.16$  do  $-0.4$ )<sup>82</sup>. Pomimo, że w niniejszym badaniu grupy pacjentów z jałową i zakażoną WOPN

nie różniły się statystycznie pod względem średniego wskaźnika masy ciała (BMI), który wynosił odpowiednio:  $25.6 \pm 1.6$  vs  $26.5 \pm 2.2$  kg/m<sup>2</sup>, stężenia albuminy w surowicy pacjentów z zakażoną WOPN były statystycznie niższe niż u pacjentów z jałową martwicą (Tabela 10). Albumina - poza utartą masę ciała i redukcją BMI - jest uznanym wskaźnikiem laboratoryjnym niedożywienia<sup>83</sup>. Hipoalbuminemia jest związana ze wzrostem śmiertelności, liczby powikłań i czasu hospitalizacji<sup>83</sup>. W obecnym opracowaniu stwierdziłem dodatnią statystycznie istotną korelację między stężeniem albuminy i sumy aminokwasów w surowicy ( $r=0.48$ ;  $p<0.05$ ) - Rycina 9.

Nie można więc wykluczyć, iż niższe stężenia obserwowanych aminokwasów w surowicy są wynikiem zarówno niedożywienia, wynikającego z ograniczenia przyjmowanych pokarmów w wyniku pogorszenia apetytu z powodu trwającej infekcji, oraz samego zakażenia otorbionej martwicy trzustki.

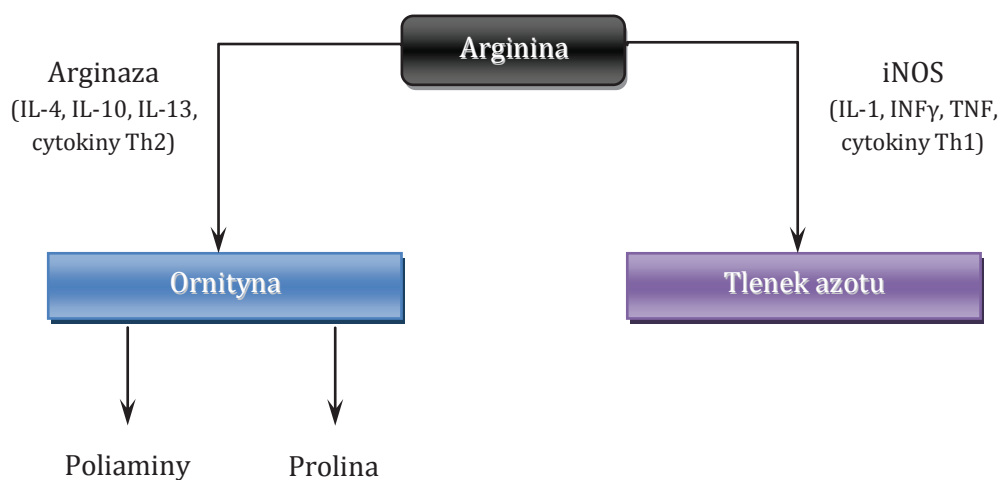
Średnie stężenie białka całkowitego w płynie martwicznym jest statystycznie niższe niż w surowicy i wynoszą odpowiednio  $26.1 \pm 3.5$  g/l oraz  $69.3 \pm 1.2$  g/l ( $p<0.01$ ). Co ważniejsze stężenie białka całkowitego w zakażonej martwicy były statystycznie niższe niż w jałowym WOPN ( $p<0.05$ ) (Tabela 11). Mönkemüller i wsp. w 2005 przeprowadzili analizę biochemiczną zawartości pozapalnych trzustkowych zbiorników płynowych (wg klasyfikacji z Atlanty 1992) pod względem przydatności w wykrywaniu w nich infekcji bakteryjnych<sup>36</sup>. W grupie 34 pacjentów zakwalifikowanych do endoterapii (ostra torbiel rzekoma, przewlekła torbiel rzekoma, ostry zbiornik płynowy z martwicą) stwierdzono w zakażonych zbiornikach - w porównaniu z jałowymi - wyższe stężenia białka całkowitego ( $21.18$  vs.  $6.3$  g/l;  $p=0.04$ ), LDH ( $2456$  vs.  $151$  U/l;  $p=0.04$ ), albuminy ( $7.5$  vs  $3.5$  g/l;  $p=0.01$ )<sup>36</sup>. Potencjalnej przyczyny tak odmiennych wyników można doszukiwać się w metodyce badania. Mönkemüller i wsp.<sup>36</sup> dokonywali oznaczeń na automatycznych analizatorach biochemicznych (Ektachem, Kodak), które to z reguły służą do szybkiej analizy parametrów z surowicy, osocza, krwi pełnej, moczu czy płynu mózgowo-rdzeniowego<sup>84</sup>. Interpretacja wyników ww metodą z innych substratów niż

wymienione wymaga krytycznego podejścia do analizy i wyciągania wniosków. Niskie średnie stężenia białka całkowitego i albuminy w surowicy pacjentów z zakażoną w porównaniu z jałową WOPN może wynikać z zahamowania syntezy białek (albuminy) w wyniku ograniczenia spożywania pokarmów lub/i trwającego stanu zapalnego<sup>85,86</sup>. Kirsch i wsp. zauważyli, iż ograniczenie białka w diecie powoduje zmniejszenie syntezy albuminy przez wątrobę, najprawdopodobniej w wyniku ograniczenia dostępności do aminokwasów<sup>85</sup>. Moshage i wsp. wykazali, iż stan zapalny może być - innym niż niedożywienie - czynnikiem prowadzącym do hipoalbuminemii<sup>86</sup>. Przyczyny są spójne z powyższą interpretacją wyników aminokwasów w surowicy.

Obecna praca, wg mojej oceny, jest pierwszym kompleksowym opisem składu aminokwasowego zawartości otorbionej martwicy trzustki (Tabela 12). Lasson i wsp. w 1994 roku wykazali, iż płyn z tzw. torbieli rzekomych wykazuje wysoką aktywność proteolityczną zarówno dla białek o wysokiej jak i niskiej masie cząsteczkowej<sup>32</sup>. Średnie stężenia oznaczonych aminokwasów były wyższe w płynie martwicznym niż w surowicy - dla zbiorników jałowych ok. 3.2-krotnie, a dla zakażonych 13.4-krotnie (Tabela 12). Spośród wszystkich oznaczonych aminokwasów szczególną uwagę, w kontekście dalszych rozważań, zwracam na argininę.

Arginina wpływa na funkcjonowanie układu immunologicznego, jest prekursorem dla tlenu azotu (substancji rozkurczającej naczynia i źródła wolnych rodników) oraz proliny (substratu dla kolagenu), poprawia proces gojenie się ran, a także reguluje sekrecję hormonalną<sup>87,88</sup>. Uważa się, iż arginina poprzez tlenek azotu (NO) może w niektórych sytuacjach klinicznych niekorzystnie wpływać na organizm<sup>87</sup>. Zauważono, iż nadmierna produkcja NO związana jest ze wzrostem śmiertelności we wstrząsie septycznym<sup>87</sup>. Bansal i wsp. przeanalizowali mechanizmy działania argininy<sup>89</sup>. Aminokwas ten, w zespole ogólnoustrojowej odpowiedzi zapalnej (ang. Systemic Inflammatory Response syndrome, SIRS), uczestniczy w procesach immunologicznych poprzez: (1) produkcję NO przez indukowalną syntazę tlenu azotu (iNOS), której aktywność stwierdza się w makrofagach oraz (2) wykorzystywany jest jako

substrat do prawidłowego funkcjonowania limfocytów T<sup>89</sup>. W makrofagach ponadto, alternatywnie do ww procesu, pod wpływem cytokin produkowanych przez limfocyty Th2, arginina może być zużywana do produkcji ornityny (działanie arginazy) - przyczyniając się do komórkowej regeneracji i naprawy uszkodzonych tkanek (zsyntetyzowana prolina może być wykorzystana do syntezy kolagenu) oraz regulując funkcję komórkowe (poprzez produkcję poliamin) (Rycina 13)<sup>89</sup>. Arginaza oraz iNOS, nie tylko konkurują o substrat jakim jest arginina, ale również mogą hamować się wzajemnie<sup>89</sup>. iNOS generuje hydroksy-L-argininę, która jest naturalnym inhibitorem arginazy, natomiast poliaminy - powstające na drodze działania arginazy - hamują produkcję NO<sup>89</sup>. Niedobór argininy powoduje zahamowanie proliferacji limfocytów T oraz supresję białka CD3 – komórkowego receptora odpowiedzialnego za wiązanie z antygenem<sup>87</sup>.



IL- interleukina; Th – limfocyt T helper; iNOS - indukowalna syntaza tlenu azotu; INF $\gamma$  – interferon gamma; TNF – czynnik martwicy nowotworu;

### Rycina 13. Drogi wykorzystania argininy przez makrofagi<sup>89</sup>

U przebadanej przeze mnie grupie chorych, poziom argininy w surowicy pacjentów z zakażoną martwicą trzustki jest niższy niż u chorych z jałowym zbiornikiem (83.6 vs. 106.8  $\mu\text{mol/l}$ ) – obie

wartości mieszczą się w zakresie wartości referencyjne w osoczu osób zdrowych (30-125  $\mu\text{mol/l}$ <sup>55</sup>). Poziom argininy w surowicy grupy kontrolnej - pracy przeprowadzonej w tutejszej Katedrze i Klinice Gastroenterologii i Hepatologii poświęconej przewlekłemu zapaleniu trzustki (PZT) - wynosił  $67 \pm 37 \mu\text{mol/l}$  i nie różnił się statystycznie od wartości obserwowanej u pacjentów z PZT ( $61 \pm 31 \mu\text{mol/l}$ )<sup>52</sup>. Z kolei Sandstrom i wsp. oznaczali aminokwasy w OZT m. in. poziomy argininy w surowicy w pierwszej, a następnie w piątej dobie choroby oraz 6 tygodni po wyzdrowieniu i uzyskali następujące wyniki: odpowiednio  $88 \pm 7$ ,  $101 \pm 8$  i  $115 \pm 4 \mu\text{mol/l}$ <sup>55</sup>.

Wybór argininy do pogłębionej analizy wynikał z wcześniejszych doniesień. Z jednej strony arginina jako prekursor tlenu azotu, podana dootrzewnowo, może poprawiać ukrwienie trzustki w eksperymentalnym modelu ostrego zapalenia trzustki. W modelu biologicznym na szczurach, w którym OZT wywołano ceruleiną, obserwuje się ograniczenie mikrokrazenia do 37%, natomiast podanie dootrzewnowo dodatkowo L-argininy (200mg/kg masy ciała) wiązało się z poprawą ukrwienia narządu - tj. z ograniczeniem mikrokrazenia jedynie do 72% wartości kontrolnej<sup>90</sup>. Z drugiej strony L-arginina podana bezpośrednio do trzustki szczura, w większej dawce niż w poprzednim badaniu (400mg/kg), wywołuje ostre martwicze zapalenie trzustki<sup>91</sup>. Autorzy wykazali, iż tego samego efektu co L-arginina nie można uzyskać podając inne aminokwasy: D-argininę, glicynę, L-lizynę i L-alaninę<sup>91</sup>.

Stężenie wszystkich aminokwasów w otorbionej martwicy trzustki jest zasadniczo wyższe niż w surowicy - dla argininy jest odpowiednio: 5-krotnie wyższe u chorych z jałową martwicą i 15.9-krotnie dla chorych z zakażonym zbiornikiem. W kontekście powyższych danych - tak wysokie stężenia aminokwasu, wynikające z degradacji białek, może teoretycznie działać pozytywnie jak i negatywnie na trzustkę i okoliczne tkanki.

Średnie aktywności aminotransferaz (AspAT i AlAT) w surowicy krwi chorych z zakażoną martwicą trzustki wykazywały niższe wartości niż u pacjentów z jałową WOPN. Dodatkowo różnica wartości dla aminotranferazy alaninowej osiągnęła istotność statystyczną

(Tabela 10). Uzyskane wyniki można interpretować dwojako. W pierwszej kolejności przyczyny różnic należy szukać we wskazaniach do endoterapii otorbionej martwicy trzustki – jednym z nich jest utrudniony odpływ żółci. W grupie badanej 4 pacjentów wykazywało cechy żółtaczk mechanicznej – wszyscy oni należeli do podgrupy z jałową martwicą trzustki. Drugą potencjalną przyczyną niskiej aktywności aminotransferaz może być niedożywienie.

Aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) - uwolnionej z wnętrza komórki - jest uznanym wskaźnikiem komórkowej martwicy<sup>45</sup>. Płyn, który pobrałem do analizy z otorbionej martwicy trzustki, wykazywał wyższą aktywność LDH niż wartość referencyjna w surowicy (125 – 220 U/l). Ponadto enzym ten wykazywał wyższą aktywność w zakażonym płynie martwicznym niż w jałowym zbiorniku (5313 vs. 1602 U/l, Rycina 10). W cytowanej poprzednio pracy, Mönkemüller i wsp. zaobserwowali podobną tendencję LDH w pozapalnych zbiornikach płynowych<sup>36</sup>. Płyn z zakażonego trzustkowego zbiornika płynowego wykazywał wyższą aktywność LDH niż płyn jałowy, odpowiednio 2456 vs. 151 U/l ( $P=0.04$ )<sup>36</sup>. Autorzy wyznaczyli również wartość graniczną, wskazującą na zakażenie zbiornika trzustkowego – 1000 U/l, czułość 64%, specyficzność 85%<sup>36</sup>.

Historycznie analiza biochemiczna płynów ustrojowych – innych niż krew i surowica – dotyczy płynów z przestrzeni takich jak jama opłucnowa czy otrzewnowa. Główny nacisk w tych analizach jest położony na różnicowanie charakteru płynu: przesiękowego od wysiękowego. Przesięk wskazuje na chorobę systemową (np. niewydolność serca, marskość wątroby, hipalbuminemia), natomiast wysięk problem lokalny (np. stan zapalny, zakażenie, ropień, nowotwór). Zasadnicza diagnostyka zawartości jamy opłucnej opiera się o kryteria Lighta<sup>46</sup>. Spełnienie jednego z kryteriów [(1) iloraz (wskaźnik) stężenie białka w płynie/surowicy > 0.5; (2) iloraz (wskaźnik) aktywności LDH w płynie/surowicy > 0.6; (3) aktywność LDH w płynie > niż 2/3 górnej wartości referencyjnej w surowicy] wskazuje na etiologię wysiękową płynu<sup>46,92</sup>. Paramothayan i wsp. przeanalizowali retrospektywnie badania 61 chorych u których pobrano jednocześnie surowicę i płyn z opłucnej lub otrzewnej i wykazali, że zarówno poziom LDH



w płynie (wartość odcięcia 130 U/l) jak i wskaźnik: białko całkowite płyn/surowica (wartość odcięcia 0.4) wykazują taką samą czułość (90%) , specyficzność (79%) , wartość predykcyjną dodatniego wyniku (PPV) (84%) i wartość predykcyjną ujemnego wyniku (NPV) (86%) w różnicowaniu przesięku od wysięku<sup>93</sup>. Zastosowanie obu kryteriów jednocześnie zwiększa czułość i NPV do 100%, ale jednocześnie obniża specyficzność do 71% i PPV do 81%<sup>93</sup>. Lippi i wsp. oceniali prospektywnie przydatność oznaczania w płynie puchlinowym lipokaliny neutrofilowej związanej z żelatynazą (neutrophil gelatinase-associated lipocalin – NGAL) oraz LDH w diagnostyce spontanicznego zapalenia otrzewnej<sup>94</sup>. Wykazali, iż średnie stężenie LDH w zakażonym płynie z jamy otrzewnej (liczba komórek wielojądrzastych (PMN)  $\geq 250/\mu\text{l}$ ) było 3.7x wyższe niż w płynie jałowym i wynosiło odpowiednio 481 (232–1116) vs. 129 (94–184) U/l przy  $p < 0.001$ <sup>94</sup>. Przy wyznaczeniu wartości odcięcia dla LDH  $\geq 227$  U/l czułość i specyficzność parametru w wykrywaniu zakażenia wynosi odpowiednio: 81% i 87%<sup>94</sup>. Stwierdzono ponadto wysoką dodatnią korelację między z zakażeniem (PMN  $\geq 250/\mu\text{l}$ ), a poziomem LDH w płynie puchlinowym ( $r=0.859$ )<sup>94</sup>.

Wracając do analizy płynu martwiczego należy podkreślić wysokie wartości oznaczonych poziomów dehydrogenazy mleczanowej - dużo wyższe niż ww wartości progowe, kwalifikujące płyn jako płyn wysiękowy. Natomiast wskaźnik białka płynu martwiczego do surowicy wynosi  $0.27 \pm 0.05$  i  $0.34 \pm 0.09$  (NS) dla płynu martwicy jałowej i zakażonej. Analizując uzyskane dane stwierdziłem ponadto dodatnią korelację między aktywnością LDH i wskaźnikami stanu zapalnego tj. CRP i OB – odpowiednio  $r=0.47$  ( $p < 0.05$ ) i  $r=0.46$  ( $p < 0.05$ ). Mając na uwadze ograniczenia obecnej pracy wynikające z małej liczebności chorych, wydaje się, iż aktywność LDH może być wykorzystana jako szybki biochemiczny parametr wskazujący zakażenie WOPN.

W płynie z otorbionej martwicy trzustki stwierdza się wysoką aktywność  $\alpha$ -amylazy – statystycznie różna od aktywności obserwowanych w surowicy ( $26581 \pm 5435$  vs.  $145 \pm 27$  U/l;  $p < 0.01$ ). Nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy zakażoną, a jałową WOPN. Duvnjak i wsp. posługując się endoskopową wsteczną cholangiopankreatografią i przezskórną cystopankreatografią wykazali, że wysoka aktywność  $\alpha$ -amylazy w płynie z torbieli rzekomej

jest dobrym wykładnikiem obecności połączenia torbieli rzekomej z systemem przewodów trzustkowych<sup>35</sup>. W kontekście powyższego doniesienia można przypuszczać, iż otorbiona martwica trzustki miała lub nadal ma kontakt z drogami trzustkowymi. Nawiązując do wysokich wartości LDH nie można wykluczyć, iż enzym ten uwalniany jest też dodatkowo z uszkodzonych komórek gruczołowych trzustki.

Średnie stężenie wolnych kwasów tłuszczowych w płynie martwicznym jest statystycznie wyższe niż w surowicy ( $2.1 \pm 0.4$  vs.  $0.5 \pm 0.1$  mmol/l;  $p < 0.01$ ). Z kolei stężenia oznaczone w surowicy mieszczą się w górnych wartościach referencyjnych podanych przez producenta testu (Załącznik). Przyczyny relatywnie wyższych stężeń FFA w martwicy należy poszukiwać w działaniu enzymów lipolitycznych. Istnieją przypuszczenia, iż fosfolipaza A<sub>2</sub>, powodując uszkodzenie błony komórkowej, toruje drogę dla lipazy, która to hydrolizuje wewnątrzkomórkowe depozyty triacylogliceroli, stanowiące 80-90% objętości komórki tłuszczowej<sup>95-97</sup>. Wyżej wymienione enzymy, źródłem których są komórki gruczołowe trzustki, prowadzą do uwolnienia FFA, które swoim działaniem przypominają detergenty<sup>98</sup>. Efekty działań tych enzymów są widoczne w obrazie patomorfologicznym OZT jako martwica tkanki tłuszczowej<sup>99</sup>. Badania eksperymentalne na myszach wykazały, że uwolnione nienasycone kwasy tłuszczowe pogarszają przebieg choroby<sup>97</sup>. Wg Klöppel i wsp. martwica tkanki tłuszczowej stwierdzana jest zasadniczo w każdej postaci OZT – w postaci obrzękowej (łagodnej) obserwuje się małe rozproszone ogniska martwicy tkanek okołotrzustkowych, natomiast w martwiczej (ciężkiej) postaci OZT martwica komórek tłuszczowych i gruczołowych obejmuje duże części trzustki i tkanek okołotrzustkowych<sup>99</sup>. Dodatkowym czynnikiem niszczącym są same wolne kwasy tłuszczowe. Podanie w eksperymentalnych warunkach szczerom kwasu oleinowego do przewodu trzustkowego powoduje masywną martwicę trzustki<sup>58</sup>. Podobny efekt (mniej nasilony) autorzy uzyskali po podaniu do przewodu trzustkowego oliwy z oliwek (mieszaniny nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych)<sup>58</sup>. Podanie ciekłej parafiny (oleju parafinowego) nie wywoływało ani martwicy, ani reakcji zapalnej<sup>58</sup>. Storck i Björntorp w swoim badaniu z 1971 wywołali eksperymentalnie u szczurów

ostre zapalenie trzustki i przebadali w różnych odstępach czasu skład biochemiczny współobecnej martwicy tkanki tłuszczowej<sup>59</sup>. Stwierdzili, iż w porównaniu z grupą kontrolną martwica tkanki tłuszczowej charakteryzuje się większym: upłynnieniem, stężeniem wolnych kwasów tłuszczowych, wapnia i fosforanu oraz mniejszą zawartością triacylogliceroli<sup>59</sup>. Zaobserwowali ponadto, iż z czasem zwiększa się upłynnienie martwicy (procentowa ilość wody w 1. i 16. dobie eksperymentu stanowi odpowiednio 40.9 % i 72.4 % całej masy badanej próbki), zmniejsza się ilość triacylogliceroli (procentowa ilość w 1. i 16. dobie to 34 % i 9 % suchej masy badanej próbki) i wolnych kwasów tłuszczowych (procentowa ilość w 1. i 16. dobie to 1487 i 801  $\mu\text{moli/g}$  suchej masy badanej próbki)<sup>59</sup>. U chorych leczonych operacyjnie z powodu martwiczego zapalenia trzustki Panek i wsp. oznaczyli w tkankach martwiczych poszczególne kwasy tłuszczowe i stwierdzili, że najwięcej jest: jednonienasyconego kwasu oleinowego (C 18:1) (52.6 %), nasyconego kwasu palmitynowego (C 16:0) (23.8 %) oraz nienasyconego kwasu linolowego (C 18:2) (7.1 %)<sup>95</sup>.

Średnie stężenie glukozy w płynie martwicznym jest niższe niż w surowicy ( $72.3 \pm 9.2$  vs.  $110.3 \pm 6.2$  mg/dl;  $p < 0.01$ ). Ponadto stężenie glukozy w zakażonej martwicy trzustki wykazywało tendencję do niższych wartości niż w jałowej, jednakże różnice te nie osiągnęły znamienności statystycznej. Mönkemüller i wsp.<sup>36</sup> w swoim badaniu zauważyli podobny trend tj. niższe stężenia glukozy w płynie z zakażonego zbiornika trzustkowego niż w zbiorniku jałowym, jednakże nie porównywano ich wartości ze stężeniami glukozy w surowicy. Analogiczne wyniki stwierdzane są w jałowym i zakażonym płynie z otrzewnej – u pacjentów z jałowym płynem (PMN  $< 250/\mu\text{l}$ ) średnie stężenie glukozy w płynie jest statystycznie ( $p = 0.002$ ) wyższe niż w zakażonym (PMN  $\geq 250/\mu\text{l}$ ) i wynosi odpowiednio 7.1 mmol/l ( $\approx 128$  mg/dl) i 5.9 mmol/l ( $\approx 103$  mg/dl)<sup>94</sup>.

Stężenia elektrolitów takich jak sód, potas czy wapń w surowicy pacjentów z WOPN mieściły się w granicach wartości referencyjnych. Zaobserwowano tendencję do niższych wartości wapnia całkowitego zarówno w surowicy jak i płynie martwicznym u chorych

z zakażoną WOPN. Mimo, iż różnica średnich wartości wapnia całkowitego w surowicy wykazywała istotność statystyczną ( $p < 0.01$ ) to po skorygowaniu wyników względem poziomu albuminy średnie wartości wapnia w surowicy były podobne i wynosiły 9.8 mg/dl, niezależnie czy surowica była pobrana od pacjentów z zakażoną czy z jałową WOPN. Duvnjak i wsp. w badaniu z 1991 nie znaleźli istotnych statystycznie różnic stężeń sodu oraz potasu pomiędzy surowicą, a płynem z torbieli rzekomej<sup>35</sup>. Ponadto średnie wartości podanych w pracy elektrolitów mieszczą się w zakresie wartości referencyjnych dla surowicy<sup>35</sup>. Jedną z przyczyn niższych stężeń wapnia całkowitego w płynie martwicznym można wiązać z tworzeniem się martwicy Balserowskiej<sup>100</sup>. Charakteryzuje się ona enzymatyczną destrukcją tkanki tłuszczowej prowadzącą do uwolnienia wolnych kwasów tłuszczowych, wiązaniem jonów wapnia oraz magnezu i wiązaniu ich w nierozpuszczalne mydła (ang. fat saponification).

W etiopatogenezie ostrego zapalenia trzustki uwzględnia się działanie wolnych rodników<sup>101,102</sup>. Podawanie w warunkach eksperymentalnych antyoksydantów (np.: dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza, pochodne stilbenu: resweratrol, dietylstilbestrol) ogranicza w istotny sposób zmiany obserwowane w wywołanym OZT<sup>101,103</sup>. Schanaider i wsp. w swoim badaniu na modelu niedokrwienno-reperfuzyjnym choroby wykazali, iż poziom oznaczanych grup karbonylowych w osoczu szczurów początkowo wzrasta w pierwszej dobie, a następnie zmniejsza się w 72 godzinie eksperymentu<sup>104</sup>. Z kolei Kiziler i wsp. wykorzystując biologiczny model na szczurze poalkoholowego OZT, zauważyli, że w porównaniu z grupą kontrolną, poziomy grup karbonylowych białek w surowicy i supernatancie homogenatu z tkanek trzustki są statystycznie wyższe zarówno w pierwszej jak i trzeciej dobie badania<sup>105</sup>.

Według mojej wiedzy, dane dotyczące poziomu grup karbonylowych białek w surowicy, a także w supernatancie i osadzie płynu z otorbionej martwicy trzustki są pierwszym takim doniesieniem literaturowym. Wykazałem istotnie wyższe wartości grup karbonylowych w płynie martwicznym niż w surowicy (Rycina 11, Tabela 16). Dodatkowo stwierdziłem statystycznie wyższe stężenia związków będących efektem oddziaływania RFT na lipidy i kwasy

nukleinowe – odpowiednio izoprostanu i utlenionych pochodnych guaniny. Potwierdza to udział wolnych rodników tlenowych w zapaleniu trzustki, a także wskazywać może na udział tychże substancji w formowaniu się pozapalnych zbiorników płynowych – w szczególności otorbionej martwicy trzustki.

Cytokiny oznaczone w surowicy i płynie martwicznym tj PDGF i TGF  $\beta$  zostały wybrane celowo ze względu na ich udział w procesach naprawczych, syntezie macierzy pozakomórkowej i włóknieniu<sup>106</sup>. Otorbiona martwica trzustki to przestrzeń płynowa powstająca w czasie, otoczona przez ścianę utworzoną z tkanki włóknistej i komórek stanu zapalnego<sup>6</sup>. Wynik oznaczeń ww cytokin okazał się zaskakujący. Zarówno PDGF jaki i TGF $\beta$  wykazywały niższe stężenia w płynie martwicznym niż w surowicy. U pacjentów z PZT stwierdza się – w porównaniu z grupą kontrolną - wyższe stężenia obu cytokin w surowicy: odpowiednio PDGF-BB (12 vs. 6.2 ng/ml;  $p < 0.05$ ) oraz TGF- $\beta$ 1 (57 vs. 39 ng/ml;  $p < 0.05$ )<sup>107</sup>. Z kolei w surowicy pacjentów z lekką postacią OZT stężenie PDGF-BB jest niższe, a TGF- $\beta$ 1 podobne do grupy kontrolnej – PDGF-BB (4.0 vs. 6.2 ng/ml;  $p < 0.05$ ) oraz TGF- $\beta$ 1 (39 vs. 39 ng/ml; NS)<sup>107</sup>. W porównaniu z grupą kontrolną poprzedniego badania<sup>107</sup> zarówno PDGF jaki i TGF- $\beta$ 1 z surowicy chorych z WOPN wykazują niższe wartości odpowiednio: PDGF-BB (1.6 vs. 6.2 ng/ml) oraz TGF- $\beta$ 1 (34.6 vs. 39 ng/ml). Potencjalne przyczyny niższych stężeń cytokin w surowicy i płynie martwicznym pacjentów z WOPN to: zmniejszona synteza lub/i zwiększona degradacja ww związków. Stojek i wsp. w dyskusji sugerują ponadto, iż niskie wartości PDGF-BB mogą (poprzez zaburzenia w angiogenezie) prowadzić do rozwoju martwicy trzustki<sup>107</sup>.

Rola badań biochemicznych płynu z otorbionej martwicy trzustki w diagnostyce różnicowej jest obecnie ograniczona w praktyce klinicznej, głównie z powodu dużego ryzyka zakażenia jałowej martwicy trzustki w trakcie pobierania materiału. Cel mojej pracy ma zasadniczo charakter poznawczy – jest nim charakterystyka biochemiczna płynu martwiczego. Płyn ten zastał uzyskany w trakcie terapeutycznych procedur endoskopowych WOPN – bez zwiększania dodatkowo ryzyka zabiegu dla chorego. Wykazałem, iż płyn martwiczny ma

charakter wysiękowy, jest mieszaniną białek osocza i soku trzustkowego, wykazuje znaczną aktywność proteolityczną, cechuje się też dużą destrukcją komórkową (zwłaszcza gdy martwica jest zakażona) oraz obecne są w nim produkty działania reaktywnych form tlenu. Otrzymane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad etiopatogenezą, przebiegiem klinicznym oraz leczeniem chorych z otorbioną martwicą trzustki.

## 6. WNIOSKI

1. Niektóre parametry laboratoryjne z krwi (stężenie hemoglobiny i CRP, OB, poziom limfocytów, leukocytów i neutrocytów) chorych z zakażoną otorbioną martwicą trzustki różnią się od parametrów pacjentów z jałowym zbiornikiem.
2. Wysokie stężenie CRP w surowicy i podwyższony poziom OB, limfocytów, leukocytów, neutrocytów u chorych z zakażoną martwicą trzustki w porównaniu do chorych z jałową otorbioną martwicą trzustki, może świadczyć nie tylko o toczącym się nasilonym procesie zapalnym, ale sugerować również o zakażeniu martwicy.
3. Oznaczone parametry biochemiczne płynu z otorbionej martwicy trzustki i surowicy krwi chorych po przebytych ostrym rzucie zapalenia trzustki wskazują, że płyny te różnią się zasadniczo swoim składem biochemicznym. Sugeruje to, że płyn z otorbionej martwicy trzustki jest płynem wysiękowym, a nie przesiękowym.
4. Płyn z zakażonej martwicy trzustki wykazuje większą aktywność proteolityczną niż płyn z martwicy niezakażonej. Zwiększona aktywność proteolityczna może być spowodowana zwiększonym uwalnianiem enzymów proteolitycznych trzustki bądź enzymów bakteryjnych.
5. Zakażona martwica trzustki cechuje się wyższą aktywnością dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i jabłczanowej (MDH), co może świadczyć o masywniejszym uszkodzeniu komórek trzustki u chorych z zakażoną martwicą trzustki.
6. Parametry stanu zapalnego (CRP i OB) wykazują dodatnią korelację z aktywnością MDH i LDH w trzustkowym płynie martwicznym.
7. Wysoki poziom grup karbonylowych, utlenionych pochodnych guaniny oraz izoprostanu w płynie z otorbionej martwicy trzustki sugeruje, iż w etiopatogenezie ostrego zapalenia trzustki i jego powikłań mogą uczestniczyć reaktywne formy tlenu.
8. Otrzymane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad poszukiwaniem markerów umożliwiających diagnostykę WOPN oraz poznanie molekularnych podstaw rozwoju WOPN.

## 7. STRESZCZENIE

Martwicze zapalenie trzustki stanowi poważny problem kliniczny. Chorzy z niewydolnością wielonarządową i zakażoną martwicą trzustki - mimo intensywnego wielospecjalistycznego leczenia obarczeni są wysoką śmiertelnością. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono publikacji dotyczących szczegółowej biochemicznej charakterystyki zawartości otorbionej martwicy trzustki. Celem pracy była analiza biochemiczna krwi i/lub surowicy oraz płynu z otorbionej martwicy trzustki u chorych po przebytych ostrym rzucie zapalenia trzustki. Do badania włączono 37 chorych hospitalizowanych w Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku i zakwalifikowanych do leczenia endoskopowego z powodu objawowej otorbionej martwicy trzustki. Spośród wszystkich chorych wyodrębniono grupę 8 osób z zakażoną otorbioną martwicą trzustki.

W pierwszym etapie badania przeanalizowano krew i surowicę chorych z jałową i zakażoną otorbioną martwicą trzustki. Na podstawie tych badań stwierdzono we krwi chorych z zakażoną otorbioną martwicą trzustki niższe stężenia hemoglobiny i limfocytów oraz wyższe poziomy leukocytów, neurocytów i OB, a w surowicy wyższe stężenia CRP. W kolejnym etapie badania porównano surowicę z płynem z otorbionej martwicy trzustki. Wykazano, że płyn ze zbiornika martwiczego cechuje się wyższym poziomem amylazy, wolnych kwasów tłuszczowych, sumą aminokwasów i ksantyny niż surowica, a niższym stężeniem białka całkowitego, albuminy, glukozy i TGF  $\beta$ . Ponadto stwierdzono, że stężenia sodu, potasu i wapnia całkowitego były podobne zarówno w płynie martwicznym jak i surowicy badanej osoby. W elektroforezie białek surowicy i płynu z otorbionej martwicy trzustki zaobserwowano, iż płyn martwiczny wykazuje duże podobieństwo do surowicy, a ponadto posiada cechy znacznej proteolizy, zwłaszcza białek o wysokiej masie cząsteczkowej. W płynie z otorbionej martwicy trzustki stwierdzono również podwyższone poziomy (względem surowicy) produktów reaktywnych form tlenu: grup karbonylowych, utlenionych pochodnych guaniny i izoprostanów.



Ostatnim etapem badania było porównanie płynu z jałowej i zakażonej otorbionej martwicy trzustki. Analiza elektroforezy białek wykazała bardziej nasiloną proteolizę w zakażonej otorbionej martwicy trzustki. Dodatkowo w zakażonym płynie martwicznym stwierdzono niższe stężenia białka całkowitego i albuminy, a wyższe stężenia aminokwasów oraz wyższe aktywności dehydrogenazy mleczanowej i jabłczanowej aniżeli w martwicy jałowej. W zakażonej otorbionej martwicy trzustki zaobserwowano również tendencję do wyższych poziomów produktów reaktywnych form tlenu (grup karbonylowych, utlenionych pochodnych guaniny oraz izoprostanów) niż w treści z jałowej martwicy.

Podsumowując wykazano, iż niektóre parametry laboratoryjne z krwi i/lub surowicy chorych z zakażoną otorbioną martwicą trzustki różnią się od parametrów pacjentów z jałowym zbiornikiem. Upłynniona zawartość otorbionej martwicy trzustki ma charakterystyki wysiękowy, wykazuje znaczną aktywność proteolityczną oraz dużą destrukcję komórkową (zwłaszcza, gdy pochodzi z zakażonej martwicy). Ponadto wysokie poziomy produktów reaktywnych form tlenu w płynie z otorbionej martwicy trzustki sugerują ich udział w etiopatogenezie ostrego zapalenia trzustki. Otrzymane wyniki stanowią podstawę do dalszych badań nad poszukiwaniem markerów ułatwiających diagnostykę oraz umożliwiających poznanie molekularnych podstaw rozwoju otorbionej martwicy trzustki.

## 8. SUMMARY

Necrotic pancreatitis remains one of the most challenging clinical problems. Multiorgan failure which often results from infected pancreatic necrosis despite intensive multidisciplinary treatment is associated with extremely high mortality. No publications have been found in the existing medical literature regarding the detailed biochemical characteristics of walled off pancreatic necrosis. The aim of this work was to investigate the biochemical properties of pancreatic necrotic material as well as the blood/serum of patients with established pancreatic necrosis complicating the course of acute pancreatitis. Thirty seven patients hospitalized in the Department of Gastroenterology and Hepatology, University Clinical Centre in Gdansk and referred for endoscopic treatment of symptomatic walledoff pancreatic necrosis (WOPN) were included in this study. 8 patients were found to have infected WOPN.

The first stage of the study included analysis of the blood and serum from patients with aseptic and infected WOPN. Patients with infected WOPN had decreased haemoglobin concentrations and lymphocyte counts as well as increased leukocyte and neutrophil counts, C-reactive protein (CRP) concentrations and ESR, compared to the patients with sterile WOPN. During the second stage of the study, the laboratory characteristics of the necrotic fluid were compared to those of the serum. Necrotic fluid was shown to have increased amylase, free fatty acid, total amino acid and xantin compared to serum; while total protein, albumin, glucose and TGF  $\beta$  levels were decreased. The concentrations of sodium, potassium and total calcium were comparable between necrotic fluid and serum. The results of protein electrophoresis were similar for serum and WOPN but with increased proteolysis in necrotic fluid especially with regard to high molecular weight protein. Moreover, necrotic fluid had increased levels of reactive oxygen species: carbonyl groups, oxidized guanine derivatives and isoprostans. In the final stage of the study, sterile necrosis was compared to infected necrosis. Protein electrophoresis demonstrated increased proteolysis in infected WOPN, as well as decreased

concentrations of total protein and albumin combined with increased amino acid, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase. Infected WOPN also had slightly increased levels of reactive oxygen species (carbonyl groups, oxidized guanine derivatives and isoprostans).

In conclusion, the study demonstrates differences in the composition of infected and sterile WOPN. The liquefied contents of necrotic fluid collections are of exudative origin and show significant proteolytic activity and cellular destruction (especially after becoming infected). The relatively increased concentrations of reactive oxygen species in WOPN fluid suggest their potential involvement in the etiopathogenesis of the disease. The results presented here are intended as a basis for further search of biomarkers facilitating the diagnosis of WOPN and providing some insight into the molecular basis of its development.

## 9. PIŚMIENNICTWO

1. Pannala R, Kidd M, Modlin IM. Acute pancreatitis: A historical perspective. *Pancreas* 2009;38:355-66.
2. Sha H, Ma Q, Jha RK. Trypsin is the culprit of multiple organ injury with severe acute pancreatitis. *Medical Hypotheses* 2009;72:180-2.
3. Wereszczyńska-Sięmiątkowska U. Ostre zapalenie trzustki. In: Antczak A, Myśliwiec M, Pruszczyk P, eds. *Wielka interna - Gastroenterologia cz 1*. Warszawa: Medical Tribune Polska; 2011:289-308.
4. Lankisch PG, Apte M, Banks PA. Acute pancreatitis. *The Lancet* 2015 Jul 4; 386 (9988):85-96.
5. Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2013;144:1252-61.
6. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, et al. Classification of acute pancreatitis - 2012: Revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut* 2013;62:102-11.
7. Sarr MG. 2012 revision of the Atlanta classification of acute pancreatitis. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej* 2013;123:118-24.
8. Balthazar EJ. Acute pancreatitis: Assessment of severity with clinical and CT evaluation. *Radiology* 2002;223:603-13.
9. Rohan Jeyarajah D, Osman HG, Patel S. Advances in management of pancreatic necrosis. *Current Problems in Surgery* 2014;51:374-408.
10. Balthazar EJ, Robinson DL, Megibow AJ, Ranson JHC. Acute pancreatitis: Value of CT in establishing prognosis. *Radiology* 1990;174:331-6.
11. Arvanitakis M, Delhaye M, De Maertelaere V, et al. Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging in the Assessment of Acute Pancreatitis. *Gastroenterology* 2004;126:715-23.
12. Acevedo-Piedra NG, Moya-Hoyo N, Rey-Riveiro M, et al. Validation of the determinant-based classification and revision of the Atlanta classification systems for acute pancreatitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2014;12:311-6.
13. Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World J Surg* 1997;21:130-5.
14. Van Santvoort HC, Bakker OJ, Bollen TL, et al. A conservative and minimally invasive approach to necrotizing pancreatitis improves outcome. *Gastroenterology* 2011;141:1254-63.
15. Büchler MW, Gloor B, Müller CA, Friess H, Seiler CA, Uhl W. Acute necrotizing pancreatitis: Treatment strategy according to the status of infection. *Annals of Surgery* 2000;232:619-22.
16. Beger HG, Rau B, Mayer J, Pralle U. Natural course of acute pancreatitis. *World Journal of Surgery* 1997;21:130-5.
17. Petrov MS, Shanbhag S, Chakraborty M, Phillips ARJ, Windsor JA. Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2010;139:813-20.
18. Bakker OJ, Van Santvoort H, Besselink MGH, et al. Extrapancreatic necrosis without pancreatic parenchymal necrosis: A separate entity in necrotising pancreatitis? *Gut* 2013;62:1475-80.
19. Bradley Iii EL. The natural and unnatural history of pancreatic fluid collections associated with acute pancreatitis. *Digestive Diseases and Sciences* 2014;59:908-10.
20. Rana SS, Bhasin DK, Reddy YR, et al. Morphological features of fluid collections on endoscopic ultrasound in acute necrotizing pancreatitis: Do they change over time? *Annals of Gastroenterology* 2014;27:258-61.

21. IAP/APA evidence-based guidelines for the management of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2013;13:e1-e15.
22. Rana SS, Bhasin DK, Sharma RK, Kathiresan J, Gupta R. Do the morphological features of walled off pancreatic necrosis on endoscopic ultrasound determine the outcome of endoscopic transmural drainage? *Endoscopic Ultrasound* 2014;3:118-22.
23. Voermans RP, Besselink MG, Fockens P. Endoscopic management of walled-off pancreatic necrosis. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences* 2015;22:20-6.
24. Jagielski M, Smoczyński M, Studniarek M, Śledziński Z, Adrych K. Complex interventional treatment of extensive consequences of necrotizing pancreatitis - Case report. *Polski Przegląd Chirurgiczny/ Polish Journal of Surgery* 2015;87:39-42.
25. Smoczynski M, Marek I, Dubowik M, et al. Endoscopic drainage/debridement of walled-off pancreatic necrosis e Single center experience of 112 cases. *Pancreatology* 2014;14:137-42.
26. Kobiela J, Hac S, Sledzinski Z. Single-port transgastric access for repeated debridement of infected pancreatic necrotic tissue. *Endoscopy* 2010;42:E354-E5.
27. Kobiela J, Hac S, Sledzinski Z. Introduction of new technique of single-port transgastric access for repeated debridement of infected pancreatic necrosis. *Polski Przegląd Chirurgiczny/ Polish Journal of Surgery* 2013;85:228-33.
28. Kokosis G, Perez A, Pappas TN. Surgical management of necrotizing pancreatitis: An overview. *World Journal of Gastroenterology* 2014;20:16106-12.
29. Tenner S, Baillie J, Dewitt J, Vege SS. American college of gastroenterology guideline: Management of acute pancreatitis. *American Journal of Gastroenterology* 2013;108:1400-15.
30. Bradley Iii EL, Vito RP. Mechanisms for rupture of pancreatic pseudocysts. A biomechanical evaluation. *Annals of Surgery* 1984;200:51-3.
31. Gregg JA, Carr-Locke DL. Endoscopic pancreatic and biliary manometry in pancreatic, biliary, and papillary disease, and after endoscopic sphincterotomy and surgical sphincteroplasty. *Gut* 1984;25:1247-54.
32. Lassen A, Genell S, Nilsson A. Proteolytic activity in pancreatic pseudocyst fluid. *Int J Pancreatol* 1994;15:201-8.
33. Lassen A, Goransson J, Ohlsson K. Pancreatic pseudocyst fluid - A mixture of plasma proteins and pancreatic juice possessing a high proteolytic activity. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 1989;49:403-12.
34. Kimura K, Yamanaka T, Sakai H, Ido K, Seki H, Yoshida Y. Biochemical and cytological analyses of cystic fluid aspirated by percutaneous puncture under ultrasonic guidance in cystic diseases of the pancreas. *Gastroenterologia Japonica* 1982;17:4-9.
35. Duvnjak M, Rotkvic I, Vucelic B, et al. The value of pancreatic pseudocyst amylase concentration in the detection of pseudocyst communication with the pancreatic duct. *American Journal of Gastroenterology* 1991;86:595-8.
36. Mönkemüller KE, Harewood GC, Curioso WH, et al. Biochemical analysis of pancreatic fluid collections predicts bacterial infection. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* 2005;20:1667-73.
37. Johnson LR. *Gastrointestinal Physiology. Eighth Edition* ed2014.
38. Ji B, Logsdon CD. Digesting new information about the role of trypsin in pancreatitis. *Gastroenterology* 2011;141:1972-5.
39. Hirota M, Ohmuraya M, Baba H. The role of trypsin, trypsin inhibitor, and trypsin receptor in the onset and aggravation of pancreatitis. *Journal of Gastroenterology* 2006;41:832-6.
40. O'Keefe SJD, Lee RB, Li J, Stevens S, Abou-Assi S, Zhou W. Trypsin secretion and turnover in patients with acute pancreatitis. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* 2005;289:G181-G7.
41. Elias E, Wood T, Redshaw M. DIAGNOSTIC IMPORTANCE OF CHANGES IN CIRCULATING CONCENTRATIONS OF IMMUNOREACTIVE TRYPSIN. *The Lancet* 1977;310:66-8.

42. Ruddell WS, Mitchell CJ, Hamilton I, Leek JP, Kelleher J. Clinical value of serum immunoreactive trypsin concentration. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981;283:1429-32.
43. Panteghini M, Bais R. Serum Enzymes. In: Burtis C, Ashwood E, Bruns D, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics Fifth Edition* 2012:565-98.
44. Whitten RO, Chandler WL, Thomas MGE, Clayson KJ, Fine JS. Survey of  $\alpha$ -amylase activity and isoamylases in autopsy tissue. *Clinical Chemistry* 1988;34:1552-5.
45. Chan FKM, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods in Molecular Biology* 2013:65-70.
46. Jialal I. Clinical utility of lactate dehydrogenase: a historical perspective. *American journal of clinical pathology* 2015;143:158-9.
47. Pincus MR, Abraham NZ, Carty RP. *Clinical Enzymology. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Twenty-Second Edition* ed: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2011:273-95.
48. Musrati RA, Kollárová M, Mernik N, Mikulášová D. Malate Dehydrogenase: Distribution, Function and Properties. *General Physiology and Biophysics* 1998;17:193-210.
49. Minárik P, Tomaásková N, Kollárová M, Antalík M. Malate Dehydrogenases - Structure and function. *General Physiology and Biophysics* 2002;21:257-65.
50. Ozer J, Ratner M, Shaw M, Bailey W, Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. *Toxicology* 2008;245:194-205.
51. Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. *Biochemia Harpera ilustrowana* 2012.
52. Adrych K, Smoczynski M, Stojek M, et al. Decreased serum essential and aromatic amino acids in patients with chronic pancreatitis. *World J Gastroenterol* 2010;16:4422-7.
53. Sandstrom P, Gasslander T, Sundqvist T, Franke J, Svanvik J. Depletion of serum L-arginine in patients with acute pancreatitis. *Pancreas* 2003;27:261-6.
54. Ayub K, Serracino-Inglott F, Williamson RCN, Mathie RT. Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischaemia and reperfusion. *British Journal of Surgery* 2001;88:1189-93.
55. Sandstrom P, Trulsson L, Gasslander T, Sundqvist T, von Döbeln U, Svanvik J. Serum amino acid profile in patients with acute pancreatitis. *Amino Acids* 2008;35:225-31.
56. Polge A, Bancel E, Bellet H, et al. Plasma amino acid concentrations in elderly patients with protein energy malnutrition. *Age and Ageing* 1997;26:457-62.
57. Mössner J, Bödeker H, Kimura W, Meyer F, Böhm S, Fischhach W. Isolated rat pancreatic acini as a model to study the potential role of lipase in the pathogenesis of acinar cell destruction. *International Journal of Pancreatology* 1992;12:285-96.
58. Schmidt H, Lankisch PG. Fat necrosis - a cause of pancreatic parenchymal necrosis? *Digestion* 1978;17:84-91.
59. Storck G, Björntorp P. Chemical composition of fat necrosis in experimental pancreatitis in the rat. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1971;6:225-30.
60. Storck G. Fat necrosis in acute pancreatitis. Morphological and chemical studies in the rat. *Acta Chirurgica Scandinavica, Supplement* 1971;417:1-36.
61. Łuszczewski A, Matyska-Piekarska E, Trefter J, Wawer I, Łacki J, Śliwińska-Stańczyk P. Reactive oxygen species - Physiological and pathological function in the human body. *Reumatologia* 2007;45:284-9.
62. Bartosz G. *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie.*: Wydawnictwo Naukowe PWN; 2013.
63. Kulbacka J, Saczko J, Chwilkowska A. Stres oksydacyjny w procesach uszkodzenia komórek. *Polski Merkuriusz Lekarski* 2009;27:44-7.
64. Ponczek MB, Wachowicz B. Interaction of reactive oxygen and nitrogen species with proteins. *Postępy Biochemii* 2005;51:140-5.
65. Gałęcka E, Mrowicka M, Malinowska K, Gałęcki P. Wolne rodniki tlenu i azotu w fizjologii. *Polski Merkuriusz Lekarski* 2008;24:446-8.
66. Popadiuk S, Landowski P, Korzon M, Renke J, Woźniak M. Carbonyl groups in plasma proteins of children with chronic colitis. *Pediatrics Współczesna* 2001;3:195-8.



67. Sledzinski T, Goyke E, Smolenski RT, Sledzinski Z, Swierczynski J. Decrease in serum protein carbonyl groups concentration and maintained hyperhomocysteinemia in patients undergoing bariatric surgery. *Obesity Surgery* 2009;19:321-6.
68. Wachowicz B, Kulifer A, Olas B. Właściwości biologiczne izoprostanów. *Kosmos Problemy nauk biologicznych* 2011;60:33-42.
69. Milne GL, Musiek ES, Morrow JD. F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* 2005;10 Suppl 1:S10-23.
70. Zaremba T, Oliński R. [Oxidative DNA damage--analysis and clinical significance]. *Postepy biochemii* 2010;56:124-38.
71. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes and Development* 2008;22:1276-312.
72. Mantur M, Koper O. Platelet- Derived growth factor - the construction, role and it's receptors. *Polski Merkuriusz Lekarski* 2008;24:173-6.
73. Czarniakowska-Bołtuć M, Zietkowski Z, Bodzenta-Łukaszyk A. Role of selected growth factors in asthma. *Alergia Astma Immunologia* 2012;17:172-9.
74. Nowak MM, Mucha K, Foronczewicz B. The role of PDGF in pathogenesis of selected disorders. *Polskie archiwum medycyny wewn¿trznej* 2005;113:603-8.
75. Krzemień S, Knapczyk P. Current review on the role of transforming growth factor beta (TGF-beta) in some pathological disorders. *Wiadomości lekarskie (Warsaw, Poland : 1960)* 2005;58:536-9.
76. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *New England Journal of Medicine* 1994;331:1286-92.
77. Stepień-Wyrobiec O, Hrycek A, Wyrobiec G. Transforming growth factor beta (TGF-beta): its structure, function, and role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Postpy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)* 2008;62:688-93.
78. Adrych K. Increase in transforming growth factor  $\beta$ -1, laminin, and hyaluronic acid serum concentrations in advanced chronic pancreatitis. *Gastroenterologia Polska* 2010;17:98-102.
79. Bell D, Keane MG, Pereira SP. Acute pancreatitis. *Medicine (United Kingdom)* 2015;43:174-81.
80. Sahin-Tóth M, Gráf L, Tóth M. Trypsinogen stabilization by mutation Arg117→His: A unifying pathomechanism for hereditary pancreatitis? *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999;264:505-8.
81. Whitcomb DC. Hereditary pancreatitis: New insights into acute and chronic pancreatitis. *Gut* 1999;45:317-22.
82. Suliman ME, Qureshi AR, Stenvinkel P, et al. Inflammation contributes to low plasma amino acid concentrations in patients with chronic kidney disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;82:342-9.
83. Cabrerizo S, Cuadras D, Gomez-Busto F, Artaza-Artabe I, Marín-Ciancas F, Malafarina V. Serum albumin and health in older people: Review and meta analysis. *Maturitas* 2015.
84. Libeer JC. Solid phase chemistry in clinical laboratory tests: A literature review. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1985;23:645-55.
85. Kirsch R, Frith L, Black E, Hoffenberg R. Regulation of albumin synthesis and catabolism by alteration of dietary protein. *Nature* 1968;217:578-9.
86. Moshage HJ, Janssen JAM, Franssen JH, Hafkenscheid JC, Yap SH. Study of the molecular mechanism of decreased liver synthesis of albumin in inflammation. *Journal of Clinical Investigation* 1987;79:1635-41.
87. Grimble RF. Immunonutrition. *Current Opinion in Gastroenterology* 2005;21:216-22.
88. Wu G. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 2009;37:1-17.
89. Bansal V, Ochoa JB. Arginine availability, arginase, and the immune response. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2003;6:223-8.

90. Dobosz M, Hać S, Mionskowska L, Dobrowolski S, Wajda Z. Microcirculatory disturbances of the pancreas in cerulein-induced acute pancreatitis in rats with reference to L-arginine, heparin, and procaine treatment. *Pharmacological Research* 1997;36:123-8.
91. Guo F, Zheng S, Gao X, Zhang Q, Liu J. A novel acute necrotizing pancreatitis model induced by l-arginine in rats. *Pancreas* 2015;44:279-86.
92. Light RW. Pleural effusions. *Medical Clinics of North America* 2011;95:1055-70.
93. Paramothayan NS, Barron J. New criteria for the differentiation between transudates and exudates. *Journal of Clinical Pathology* 2002;55:69-71.
94. Lippi G, Caleffi A, Pipitone S, et al. Assessment of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and lactate dehydrogenase in peritoneal fluids for the screening of bacterial peritonitis. *Clinica Chimica Acta* 2013;418:59-62.
95. Panek J, Sztefko K, Drozd W. Composition of free fatty acid and triglyceride fractions in human necrotic pancreatic tissue. *Medical Science Monitor* 2001;7:894-8.
96. Nevalainen TJ. Phospholipase A2 in acute pancreatitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1988;23:897-904.
97. Patel K, Trivedi RN, Durgampudi C, et al. Lipolysis of visceral adipocyte triglyceride by pancreatic lipases converts mild acute pancreatitis to severe pancreatitis independent of necrosis and inflammation. *American Journal of Pathology* 2015;185:808-19.
98. Tietz NW, Shuey DF. Lipase in serum - The elusive enzyme: An overview. *Clinical Chemistry* 1993;39:746-56.
99. Kloppel G, Maillet B. Pathology of acute and chronic pancreatitis. *Pancreas* 1993;8:659-70.
100. Stewart AF, Longo W, Kreutter D, Jacob R, Burtis WJ. Hypocalcemia associated with calcium-soap formation in a patient with a pancreatic fistula. *New England Journal of Medicine* 1986;315:496-8.
101. Sanfey H, Bulkeley GB, Cameron JL. The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Annals of Surgery* 1984;200:405-13.
102. Śledziński Z, Woźniak M, Brunelli A, et al. Experimental pancreatitis induced by synthetic prooxidant tert-butyl hydroperoxide. *Pancreas* 2000;20:146-51.
103. Ławiński M, Śledziński Z, Kubasik-Juraniec J, Spodnik JH, Woźniak M, Bogusławski W. Does resveratrol prevent free radical-induced acute pancreatitis? *Pancreas* 2005;31:43-7.
104. Schanaider A, de Carvalho TP, de Oliveira Coelho S, et al. Ischemia-reperfusion rat model of acute pancreatitis: protein carbonyl as a putative early biomarker of pancreatic injury. *Clinical and Experimental Medicine* 2014.
105. Kiziler AR, Aydemir B, Gulyasar T, Unal E, Gunes P. Relationships among iron, protein oxidation and lipid peroxidation levels in rats with alcohol-induced acute pancreatitis. *Biological Trace Element Research* 2008;124:135-43.
106. Rockey DC, Darwin Bell P, Hill JA. Fibrosis-a common pathway to organ injury and failure. *New England Journal of Medicine* 2015;372:1138-49.
107. Stojek M, Adrych K, Rojek L, et al. Decreased serum platelet derived growth factor BB levels in acute and increased in chronic pancreatitis. *World journal of gastroenterology : WJG* 2014;20:13127-32.
108. Ranson JHC. Etiological and prognostic factors in human acute pancreatitis: A review. *American Journal of Gastroenterology* 1982;77:633-8.
109. Blamey SL, Imrie CW, O'Neill J, Gilmour WH, Carter DC. Prognostic factors in acute pancreatitis. *Gut* 1984;25:1340-6.
110. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: A severity of disease classification system. *Critical Care Medicine* 1985;13:818-29.
111. Wu BU, Johannes RS, Sun X, Tabak Y, Conwell DL, Banks PA. The early prediction of mortality in acute pancreatitis: A large population-based study. *Gut* 2008;57:1698-703.
112. Brown A, James-Stevenson T, Dyson T, Grunckenmeier D. The Panc 3 score: A rapid and accurate test for predicting severity on presentation in acute pancreatitis. *Journal of Clinical Gastroenterology* 2007;41:855-8.



## 10. SPIS TABEL

Tabela 1. Śmiertelność pacjentów z ostrym zapaleniem trzustki, niewydolnością narządową i zakażoną martwicą trzustki na podstawie metaanalizy przedstawionej przez Petrov M et al.

Tabela 2. Podział i charakterystyka trzustkowych zbiorników płynowych na podstawie zrewidowanej klasyfikacji z Atlanty (2012)

Tabela 3. Podsumowania wytycznych dotyczących leczenia martwiczego ostrego zapalenia trzustki wg IAP/APA z 2013

Tabela 4. Charakterystyka izoenzymów dehydrogenazy mleczanowej.

Tabela 5. Podział aminokwasów

Tabela 6. Reaktywne formy tlenu

Tabela 7. Biomarkery tkankowe stresu oksydacyjnego – modyfikacja tabeli wg źródła<sup>61</sup>

Tabela 8. Podstawowe dane antropomorficzne pacjentów

Tabela 9. Charakterystyka chorych z otorbioną martwicą trzustki

Tabela 10. Wybrane parametry laboratoryjne z krwi lub surowicy chorych z otorbioną martwicą trzustki

Tabela 11. Wybrane parametry surowicy i płynu martwiczego pacjentów z otorbioną martwicą trzustki

Tabela 12. Stężenie poszczególnych aminokwasów w surowicy i płynie martwiczym u pacjentów z otorbioną martwicą trzustki

Tabela 13. Wybrane elementy degradacji puryn w surowicy i płynie martwiczego pacjentów z otorbioną martwicą trzustki (n=14)

Tabela 14. Wzajemne zależności pomiędzy wybranymi parametrami stanu zapalnego a dehydrogenazy mleczanowej (LDH) i jabłczanowej (MDH)

Tabela 15. Wybrane parametry laboratoryjne z surowicy i płynu martwiczego pacjentów z otorbioną martwicą trzustki (n=28; n'=7(PGDG w płynie))

Tabela 16. Wybrane produkty reaktywnych form tlenu w surowicy i płynie martwiczym pacjentów z otorbioną martwicą trzustki.

## 11. SPIS RYCIN I ZDJĘĆ

Rycina 1. Obrazy CECT chorego z ostrym martwiczym zapaleniem trzustki hospitalizowanego w Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. A – początek choroby; B - 17 dni później;

Rycina 2. Chory z ostrym martwiczym zapaleniem trzustki hospitalizowany w Klinice Gastroenterologii i Hepatologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku. Obrazy CECT: A – początek choroby; B - 10 dni później; C – 32 dni później;

Rycina 3. Schemat drenażu otorbionej martwicy trzustki. A – drenaż przezbrodawkowy; B – drenaż przezścienny (przezżołądkowy); C – drenaż przezskórny;

Rycina 4. Etapy redukcji tlenu do cząsteczki wody.

Rycina 5. Rozkład płci w grupie z jałową i zakażoną otorbioną martwicą trzustki (WOPN)

Rycina 6. Elektroforeza białek surowicy i płynu martwiczego. Ścieżka: (1) standard mas cząsteczkowych; (2) surowica zdrowej osoby; (3) surowica pacjenta z zakażoną otorbioną martwicą trzustki; (4) zakażony płyn martwiczny (pacjent ze ścieżki 3); (5) surowica pacjenta z jałową otorbioną martwicą trzustki; (6) jałowy płyn martwiczny (pacjent ze ścieżki 5).

Rycina 7. Elektroforeza białek płynu z otorbionej martwicy trzustki. Ścieżki: (1) standard masy cząsteczkowej; (2-5) jałowy płyn martwiczny; (6-9) zakażony płyn martwiczny ;

Rycina 8. Suma aminokwasów w surowicy i płynie martwicznym w pacjentów otorbioną martwicą trzustki.

Rycina 9. Wykres zależności między stężeniem albuminy w surowicy [g/l] a sumą aminokwasów w surowicy [ $\mu\text{mol/l}$ ] - ( $r=0.48$ ;  $p<0.05$ ).

Rycina 10. Stężenia LDH i MDH w płynie martwicznym u pacjentów z jałową i zakażoną otorbioną martwicą trzustki. A – dane przedstawione jako U/l; B – dane przedstawione jako nmol/min/mg białka;

Rycina 11. Oznaczenie grup karbonylowych w surowicy i martwicy (osadzie i supernatancie) u pacjentów z otorbioną martwicą trzustki ( $n=15$ ).

Rycina 12. Produkty działań reaktywnych form tlenu w jałowej i zakażonej WOPN. A. Grupy karbonylowe w osadzie płynu z WOPN; B. Stężenie izoprostanu w płynie z WOPN; C. Stężenie utlenionych pochodnych guaniny w płynie z WOPN. W każdej analizowanej grupie, w zakażonym zbiorniku martwicznym stwierdza się wyższe poziomy produktów działania reaktywnych form tlen niż w jałowym.

Rycina 13. Drogi wykorzystania argininy przez makrofagii.

Zdjęcie 1. Wygląd płynu martwiczego z otorbionej martwicy trzustki. A) Zabieg wytworzenia gastrocystostomii (#) do drenażu otorbionej martwicy trzustki. Na zdjęciu widoczne w okolicy wprowadzanego układu drenującego (⚡) wypływające masy martwicze (\*). B) Usunięty płyn z otorbionej martwicy trzustki

## 12. ZAŁĄCZNIKI

### *SKALA RANSONA<sup>108</sup>*

#### W momencie przyjęcia lub postawienia rozpoznania

Wiek >55 lat

Krwinki białe >16 x10<sup>9</sup>/l

Poziom glikemii >200 mg/dl

Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) >350 U/l

Tranasaminaza asparaginowa (AspAT) >250 U/dl

#### Po 48 godzinach

Spadek hematokrytu o >10%

Wzrost azotu mocznika (BUN) > 5 mg/dl

Poziom wapnia w surowicy <8 mg/dl

Ciśnienie parcjalne tlenu we krwi tętniczej (PaO<sub>2</sub>) <60 mmHg

Niedobór zasad >4 mEq/l

Sekwestracja płynów >6 l

Obecność ≥ 3 elementów prognostycznych świadczyć może o ciężkim ostrym zapaleniu trzustki

*ZMODYFIKOWANA SKALA GLASGOW<sup>79,109</sup>*

Podczas pierwszych 48 godzin

Ciśnienie parcjalne tlenu we krwi tętniczej (PaO<sub>2</sub>) < 8kPa (60 mmHg)

Wiek > 55 lat

Białe krwinki >15 x10<sup>9</sup>/l

Wapń w surowicy < 2mmol/l (8 mg/dl)

Mocznik w surowicy > 16 mmol/l (96 mg/dl)

Transaminaza asparaginowa (AspAT) > 200 IU/l

Dehydrogenaza mleczanowa > 600 IU/l

Albumina w surowicy < 32 g/l

Glikemia w surowicy >10 mmol/l (180 mg/dl)

Obecność ≥ 3 elementów prognostycznych świadczyć może o ciężkim ostrym zapaleniu trzustki

## SKALA APACHE-II<sup>110</sup>

Skala punktowa 12 podstawowych fizjologicznych parametrów (pkt. od 0 do 4):

- 1) Temperatura ciała
- 2) Średnie ciśnienie tętnicze
- 3) Częstość serca
- 4) Częstotliwość oddechów
- 5) Utlenowanie krwi AaDO<sub>2</sub> lub PaO<sub>2</sub> (w zależności od FiO<sub>2</sub>)
- 6) pH krwi tętniczej
- 7) Stężenie sodu w surowicy
- 8) Stężenie potasu w surowicy
- 9) Poziom kreatyniny w surowicy
- 10) Hematokryt krwi obwodowej
- 11) Liczba białych krwinek
- 12) Skala śpiączki Glasgow

AaDO<sub>2</sub> - pęcherzykowo-tętnicza różnica tlenowa, FiO<sub>2</sub> - stężenie tlenu w mieszaninie oddechowej, PaO<sub>2</sub> - ciśnienie parcjalne tlenu we krwi tętniczej

Uzyskanie  $\geq 8$  punktów świadczyć może o ciężkim ostrym zapaleniu trzustki

## SKALA BISAP<sup>111</sup>

Pacjenci uzyskują po 1 punkcie za każdy stwierdzony parametr w ciągu pierwszej doby choroby:

- Stężenie azotu mocznika w surowicy krwi > 25 mg%
- Upośledzony stan świadomości (< 15 punktów w skali Glasgow)
- Obecny SIRS
- Wiek pacjenta > 60 lat
- Obecny wysięk opłucnowy w badaniach obrazowych

Im więcej punktów tym gorsze rokowanie pacjenta z ostrym zapaleniem trzustki

### SIRS – Zespół Uogólnionej Reakcji Zapalnej (ang. Systemic Inflammatory Response Syndrome)

- Czynność serca > 90 uderzeń/min
- Temperatura ciała < 36°C lub > 38°C
- Liczba leukocytów < 4000/mm<sup>3</sup> lub > 12000/mm<sup>3</sup> lub > 10% granulocytów pałeczkowatych
- Układ oddechowy > 20 oddechów/min lub PaCO<sub>2</sub> < 32 mmHg

PaCO<sub>2</sub> – ciśnienie parcjalne dwutlenku węgla w krwi tętniczej

Aby rozpoznać SIRS należy u pacjenta stwierdzić 2 z 4 wymienionych kryteriów

### *SKALA PANC 3<sup>112</sup>*

Czynniki ryzyka ciężkiego ostrego zapalenia trzustki to:

- Hematokryt > 44 mg/dl
- Wskaźnik masy ciała (BMI) > 30 kg/m<sup>2</sup>
- Obecność płynu w opłucnej na zdjęciu RTG klatki piersiowej