

BƯỚC ĐẦU XÁC ĐỊNH HOẠT ĐỘ ENZYM TỤY NGOẠI TIẾT Ở BỆNH NHÂN VIÊM TỤY MẠN

PHẠM HOÀNG HÀ - Trường ĐH Y Hà Nội
NGUYỄN VĂN RỪ - Trường ĐH Dược Hà Nội

ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm tụy mạn là bệnh viêm đặc trưng bởi quá trình phá hủy nhu mô tụy tiến triển, không hồi phục, dẫn tới xơ hóa nhu mô gây giảm chức năng tụy nội tiết và ngoại tiết. Đánh giá chức năng tụy ngoại tiết có thể dựa vào xác định hoạt độ các enzym trong dịch tụy. Dịch tụy được tiết ra từ các tuyến nang của tụy, qua các ống tiết trong tiểu thùy, gian tiểu thùy rồi đổ vào ống tụy chính, ống tụy phụ và đổ vào tá tràng. Dịch tụy chứa các enzym tiêu hóa như trypsin, chymotrypsin, amylase và lipase [7,8,9,10]. Các enzym này có thể được định lượng trong dịch tụy, dịch tá tràng, máu và phân. Tại Việt Nam cho đến nay chưa có nghiên cứu nào xác định hoạt độ các enzym này trong dịch tụy. Nghiên cứu này nhằm mục đích xác định hoạt độ các enzyme: protease, amylase và lipase trong dịch tụy của bệnh nhân viêm tụy mạn bằng các phương pháp có thể áp dụng được tại Việt Nam.

ĐỐI TƯỢNG, NGUYÊN LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Đối tượng.

Gồm 20 bệnh nhân được chẩn đoán viêm tụy mạn, được điều trị phẫu thuật tại khoa Phẫu thuật tiêu hóa, bệnh viện Việt Đức Hà Nội từ 9/2008 đến 3/2009. Dịch tụy được lấy trong mổ, sau khi bộc lộ ống tụy chính, dùng bơm tiêm kim nhỏ chọc dò vào ống tụy, hút dịch tụy, bảo quản lạnh.

2. Nguyên vật liệu phục vụ cho nghiên cứu.

Các hóa chất và trang thiết bị để bảo quản mẫu và tiến hành xét nghiệm đo hoạt độ enzym tụy tại Phòng xét nghiệm hóa sinh - bộ môn Hoá sinh, trường Đại học Dược Hà Nội.

Phương pháp nghiên cứu:

- Phương pháp xác định hoạt độ protease [1,7,8,9]
- Phương pháp Anson cải tiến: dưới tác dụng của protease, protein bị thủy phân, giải phóng ra các acid amin, xác định lượng protein còn lại bằng cách tủa với acid tricloacetic, cho tủa này phản ứng với thuốc thử Gornall tạo phức màu tím hồng. Đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng $\lambda = 530$ nm, cuvet 1cm.

Đơn vị tính: đơn vị tính hoạt độ protease là Katal (K). Katal là lượng enzym thủy phân 1 mol cơ chất trong thời gian 1 giây, thường dùng nanokatal (nK), $1nK = 10^{-9}K$

$$\text{Hoạt độ Protease} = \frac{A \times B \times 209 \times 10^9}{236 \times 10^5 \times t \times M} \text{ nanoKatal}$$

Trong đó: A - Số lượng casein bị thủy phân (mg);
B - Độ pha loãng của dịch enzyme, 236.10^2 - Trọng lượng phân tử gam của casein (gam); 209 - Số liên

kết peptid của một phân tử casein; t - thời gian phản ứng thủy phân (giây); M - lượng mẫu thử thử (ml).

Phương pháp xác định hoạt độ amylase - Phương pháp King [1,7]: huyết thanh được ủ với cơ chất là hồ tinh bột, sau thời gian phản ứng, lượng tinh bột còn lại tác dụng với iod cho màu xanh, tiến hành song song với một ống cơ chất có cùng lượng tinh bột nhưng không có amylase, sự giảm độ đậm màu cho biết về hoạt độ amylase.

$$\text{Hoạt độ Amylase} = \frac{E_{\text{cơ chất}} - E_{\text{thử}}}{E_{\text{cơ chất}}} \times 800 \text{ đơn vị}$$

amylase/100ml huyết thanh

Trong đó:

$E_{\text{cơ chất}}$: mật độ quang của ống cơ chất.

$E_{\text{thử}}$: mật độ quang của ống thử.

- Phương pháp xác định hoạt độ lipase - Phương pháp Bondi [1]: Lipase tác dụng trên dầu ô liu giải phóng ra các acid béo. Các acid này được chuẩn độ bằng NaOH 0,1N với sự có mặt của ethanol.

Công thức tính: hoạt độ lipase tính theo đơn vị Bondi (BU) là số ml dung dịch NaOH 0,1N dùng để trung hòa hết lượng acid béo giải phóng ra khi cho lipase tác dụng với cơ chất dầu ô liu.

Hoạt độ Lipase = $V_t - V_c$ đơn vị Bondi

Trong đó: V_t : số ml dung dịch NaOH 0,1N của ống thử.

V_c : số ml dung dịch NaOH 0,1N của ống chứng.

Chỉ số tham chiếu của người bình thường là 35 - 55 BU.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Phương pháp xác định hoạt độ enzym.

Chúng tôi đã lựa chọn được 3 phương pháp hóa sinh để định lượng 3 loại enzyme của tuyến tụy ngoại tiết và áp dụng trong các xét nghiệm hóa sinh lâm sàng và nghiên cứu ở Việt Nam:

- Phương pháp Anson cải tiến: xác định hoạt độ Protease

- Phương pháp King: xác định hoạt độ Amylase

- Phương pháp Bondi: xác định hoạt độ Lipase

2. Phương pháp lấy dịch tụy.

Dịch tụy được lấy trực tiếp trong ống tụy chính của bệnh nhân viêm tụy mạn trong quá trình phẫu thuật điều trị viêm tụy mạn, được bảo quản lạnh và xử lý trong những điều kiện quy định nhằm giữ được hoạt độ các enzym ít biến đổi nhất.

3. Xác định hoạt độ enzym tụy ngoại tiết.

Hoạt độ protease, amylase và lipase trong dịch tụy của bệnh nhân viêm tụy mạn được xác định theo phương pháp cho từng loại enzym, kết quả là giá trị trung bình của 3 lần thực hiện trong cùng điều kiện.

Bảng 1: Hoạt độ protease, amylase và lipase của dịch tụy

Họ tên	Tuổi		Protease (nK/ml)	Amylase (đơn vị Amylase/100ml)	Lipase (đơn vị Bondi)
	Nam	Nữ			
Bùi Tăng H.	70		76,82	713	70
Vũ Văn B.	39		92,54	410	22
Phạm Xuân T.	35		11,79	781	15
Phạm Văn L.	45		72,02	767	40
Vương Ngọc T.	46		154,27	81,5	60
Hồ Viết D.	63		399,83	738	32
Lê Thị H.		48	166,08	270	20
Lương Xuân T.	51		156,27	797	40
Phan Thị T.		21	15,28	25	20
Nguyễn Thị N.		30	184,64	677	40
Vũ Đức H.	54		196,42	744	40
Nguyễn Thị M.		78	65,47	431	4
Đặng Đình H.	44		13,09	787	19
Bùi Duy M.	37		202,54	251	80
Đinh Văn N.	30		91,23	778	40
Lê Trọng P.	58		426,5	661	40
Nguyễn Văn K.	47		142,34	789	30
Nguyễn Văn N.	48		78,13	759	50
Vũ Thị H.		55	87,3	744	10
Đỗ Quang T.	42		69,4	693	20
Giá trị trung bình			113,1 ± 80,4	594,8 ± 252,7	39,4 ± 19,7

BÀN LUẬN

1. Lựa chọn phương pháp xác định hoạt độ enzym trong dịch tụy.

Việc xác định hoạt độ riêng của mỗi protease là trypsin, chymotrypsin, elastase đã được nghiên cứu nhiều trên thế giới. Hiện nay chủ yếu sử dụng những bộ kit có sẵn cho kết quả nhanh chóng, tương đối chính xác như kit đo hoạt độ trypsin (hãng RIAGnost, Hoechst), đo elastase theo phản ứng miễn dịch liên kết enzym ELISA (ScheBoTech, Wetenberg, Đức và Bioserv Diagnostics, Rostock, Đức), đo chymotrypsin (Boehringer, Mannheim, Đức), nhưng để đánh giá chức năng tụy ngoại tiết thì từng kết quả thu được không đủ để đánh giá và vì vậy cần có một bộ kit tổng thể hoặc cần tìm một giải pháp khác có tính toàn diện, đó là giải pháp mà chúng tôi đã dự định lựa chọn [4], [5], [6], [7]. Tìm hiểu các nghiên cứu trong nước, chúng tôi chưa thấy nghiên cứu nào xác định hoạt độ của 3 nhóm enzyme; protease, amylase, và lipase trong dịch tụy của người mà chỉ đo trong máu, phân, nước tiểu, huyết thanh... Bằng những cố gắng, thử nghiệm, tìm kiếm phương pháp thông qua xác định hoạt độ enzym của dịch tụy động vật hoặc của những chế phẩm enzym dùng để thay thế enzym tụy cho những bệnh nhân bị suy chức năng tụy ngoại tiết, trong nghiên cứu này chúng tôi đã tìm được 3 phương pháp thích hợp nhất để đo hoạt độ protease, amylase, và lipase trong dịch tụy bệnh nhân viêm tụy mạn, bước đầu các phương pháp lựa chọn là phù hợp và có thể áp dụng được trong điều kiện thực tế ở Việt Nam.

2. Lấy mẫu dịch tụy.

Việc xác định hoạt độ các enzym tụy ngay trong dịch tụy là chính xác có độ nhạy và độ đặc hiệu cao, có giá trị không giống với bất cứ xét nghiệm về hoạt độ enzym tụy trong huyết thanh, nước tiểu hoặc phân. Trên thế giới, xét nghiệm dịch tụy được thực hiện qua việc đặt ống thông tá tràng để hút dịch tụy. Việc lấy mẫu dịch tụy trong ống tụy chính chỉ thực hiện được trong khi phẫu thuật nên để có được mẫu dịch tụy là vô cùng khó khăn, không phải bất cứ lúc nào cũng có thể thực hiện được. Điều đó lí giải tại sao ở Việt Nam chưa có một nghiên cứu nào về hoạt độ các enzym tụy trong dịch tụy, càng không có một nghiên cứu, báo cáo nào nói về chức năng tụy ngoại tiết thông qua các enzym đặc hiệu của tụy này. Nghiên cứu này được thực hiện nhờ sự kết hợp giữa chuyên ngành ngoại khoa và hóa sinh.

3. Hoạt độ protease, amylase, lipase trong dịch tụy bệnh nhân viêm tụy mạn.

- Hoạt độ protease dịch tụy trung bình là 113,1 ± 80,4 nK/ml, các giá trị thay đổi rất khác nhau trong nhóm nghiên cứu, cao nhất là 426,5 nK/ml gấp 36 lần so với giá trị thấp nhất là 11,79 nK/ml.

- Hoạt độ amylase dịch tụy trung bình là 594,8 ± 252,7 đơn vị Amylase/100 ml, các giá trị cũng thay đổi rất khác nhau trong nhóm nghiên cứu, cao nhất là 797,0 đơn vị Amylase gấp 31 lần so với thấp nhất là 25,0 đơn vị Amylase.

- Hoạt độ lipase dịch tụy trung bình là 39,4 ± 19,7 đơn vị Bondi, cao nhất là 80,0 BU gấp 20 lần so với giá trị thấp nhất là 4,0 BU. Đặc biệt 10/20 bệnh nhân có hoạt độ lipase dịch tụy giảm dưới mức bình thường, chiếm 50%.

Năm 2005, J. Keller và P. Layer chỉ ra các mức độ suy chức năng tụy ngoại tiết trên một nhóm bệnh nhân viêm tụy mạn, ở những người này trung bình chức năng tụy ngoại tiết suy giảm từ 50%-80% so với người khỏe mạnh. Có 2 nghiên cứu cho thấy sự giảm tiết lipase của tụy xuất hiện sớm và nhanh hơn các enzym khác. Chính vì thế sự kém hấp thu lipid là rối loạn tiêu hóa nghiêm trọng nhất cần theo dõi ở bệnh nhân viêm tụy mạn. Điều đó được giải thích là do lượng bicarbonat giảm khiến muối mật kết tủa và khử hoạt tính của lipase. Lipase cũng được cho là mẫn cảm với sự phá hủy bởi các enzym thủy phân protein, hệ thống sản xuất enzym không có khả năng bù lại mất mát này. Mặt khác kém hấp thu các chất dinh dưỡng lại khiến khả năng của túi mật bị kim hãm mạnh mẽ và một yếu tố cũng cần xét đến là sự lên men của cacbohydrat và protein bởi các vi khuẩn của ruột kết cũng khiến các chất dinh dưỡng bị đào thải ra ngoài theo phân [3].

Chúng tôi mới chỉ tìm ra được giá trị trung bình hoạt độ protease, amylase ở nhóm bệnh nhân nghiên cứu, chưa có số liệu khác để so sánh hoạt độ các enzym này. Tuy nhiên kết quả hoạt độ lipase thu được cho thấy có 50% số bệnh nhân có giảm lipase so với chỉ số bình thường. Mặt khác trong những trường hợp giảm hoạt độ lipase thì phần lớn là giảm từ 37% - 57%, cá biệt có 2 trường hợp giảm rất nhiều chỉ còn 4 và 10 đơn vị Bondi tương đương với mức giảm là 88,6% và 71,4

%. Như vậy, trong phạm vi nghiên cứu này, chúng tôi chỉ có thể sơ bộ kết luận rằng, ở bệnh nhân viêm tụy mạn có suy giảm chức năng tụy ngoại tiết. Song để có thể đánh giá chính xác hơn cần có những nghiên cứu tiếp theo để so sánh protease (hoặc các thành phần cụ thể như trypsin, chymotrypsin, elastase) ở bệnh nhân viêm tụy mạn và ở người bình thường vì protease đặc trưng hơn để đánh giá chức năng tụy.

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã lựa chọn và mô tả được các phương pháp xác định hoạt độ protease, amylase và lipase để áp dụng trong xét nghiệm hóa sinh lâm sàng dịch tụy ngoại tiết ở Việt Nam. Mẫu dịch tụy được lấy trực tiếp từ ống tụy chính của bệnh nhân viêm tụy mạn trong quá trình phẫu thuật và kết quả bước đầu về hoạt độ protease, amylase và lipasenzym trong dịch tụy có ý nghĩa quan trọng trong việc xây dựng các thông số khoa học về enzym tụy ngoại tiết, góp phần chẩn đoán, tiên lượng và theo dõi kết quả điều trị bệnh.

SUMMARY

- Identified the process of taking blood samples and pancreatic juice, preservation, simple quantification, and safety, assurance of quality. Identified the conversion of exocrine pancreatic function in blood and pancreatic juice in chronic pancreatitis patients, compared with normal patients.

- Bases for selecting methods: Based on activity of enzyme, the characteristics of the substrate, availability of the equipment. Quantitative results: The average of protease activity in pancreatic juice was $113,1 \pm 80,4$ nK/ml, amylase activity was $594,8 \pm 252,7$ PAU/100ml lipase mean activity was $39,4 \pm 19,7$ BU, decrease in comparison with ordinary people.

- However, in order to draw the more accurate conclusion, we have to do research more to evaluate these 3 enzymes' activity in the healthy people and in the patients who have chronic pancreatic to assess pancreatic functions.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Vũ Đình Vinh, Đặng Hanh Phúc, Đỗ Đình Hồ (1974), "Kỹ thuật Y sinh hóa", Trường Đại học quân y, tr. 222-224, 328-330, 571-572.
2. Fedall S. S. , Harvey R. F. , Salmon P. R. , Brown P., and Read A. E. (1979), "Trypsin and lactoferrin levels in pure pancreatic juice in patients with pancreatic diseases", *Gut*, 20, pp. 983-986.
3. Keller J., Layer P. (2005), "Human pancreatic exocrine response to nutrients in health", *Gut*, 54 (Suppl VI), pp. 1-28.
4. Loser Chr. , Mollgaard A. và Folsh U. R. (1996), "Faecal elastase 1: a novel, highly sensitive, and specific tubeless pancreatic function test", *Gut*, 39, pp. 580-586.
5. Ruddell W. S. J. , Mitchell C. J., Hamilton I., Leek J. P., Kelleher J. (1981), "Clinical value of serum immunoreactive trypsin concentration", *British medical journal*, 283, pp. 1429-1432.
6. Satoru Naruse, Hiroshi Ishiguro, Shigeru B. H. Ko, Toshiyuki Yoshikawa, Takeshi Yamamoto, Akiko Yamamoto, Sachiko Futakuchi, Hidemi Goto, Yukiko Saito, and Susumu Takahashi (2006), "Fecal pancreatic elastase: a reproducible marker for severe exocrine pancreatic insufficiency", *Journal of Gastroenterology*, 41, pp.901-908.
7. Copeland. Robert A., (2000). Enzymes; A Practical Introduction To Structure, Mechanism & Data Analysis. Wiley-VCH. A John Willey & Sons, INC., Pub. 2nd ed.
8. Dennison Clive . (2002). A Guide To Protein Isolation. Kluwer Academic Publishers. New York, Boston, Dordrecht, Lodon, Moscow.
8. Fersht Alan, (1998), Structure and Mechanism in Protein Science, W. H. Freeman, 3rd Rev Edit.
9. Hans U. B., (1974). Methods of Enzymatic Analysis. Second English Edition Academic Press, Inc., New York San Francisco London, Vol., 4.
10. Walker John M., (1996). The Protein Protocols Hand book. 2nd ed. Humana Press Inc. Totuwa, New Jersey.