

AGENTUL CHELATOR CALCIUMDINATRIUMEDETAT INHIBĂ IN VITRO ACTIVITATEA LIPAZEI ȘI AMILAZEI PANCREATICE ÎN PANCREATITA ACUTĂ

MIRCEA DEAC¹, GABRIELA BARDAC², ROMEO-GABRIEL MIHĂILĂ³

^{1,3}Universitatea „Lucian Blaga” din Sibiu, ²Clinica Poliano Sibiu

Cuvinte cheie: Rezumat: Rezultatele bune obținute cu agent chelator în tratamentul pancreatitei acute asociate colicii calciudinatriumedetat, saturnine au ridicat problema dacă ele nu sunt cumva datorate inhibiției enzimice produse de calciudinatriumedetat. Noi am studiat in vitro efectul calciudinatriumedetat-ului asupra activității lipazei și amilazei pancreatice. Am folosit un lot de 41 de pacienți. Cazurile au inclus pancreatite acute de etiologie biliară (cele mai frecvente), alcoolică, metabolică, postoperatorie și idiopatică. Calciudinatriumedetat-ul a fost utilizat în diluție de 0,014 mg/mL de ser. Studiul a arătat scăderea statistic semnificativă a nivelelor enzimice.

Keywords: Edetate Calcium Disodium, acute pancreatitis, effect in vitro **Abstract:** The good results obtained with chelating agent in the treatment of acute pancreatitis associated with saturnin colic suggested the question if they are not due to the enzymatic inhibition made by Edetate, Calcium Disodium. We have studied in vitro the effect of Edetate Calcium Disodium, on the activity of the pancreatic lipase and amylase. We used a group of 41 patients. The cases included acute pancreatitis of biliary (the most frequent one), alcoholic, metabolic, postoperative, and idiopathic etiology. Edetate Calcium Disodium was used in the dilution of 0,014 mg/mL serum. The research pointed out the statistically significant reduction of the enzyme level.

INTRODUCERE

Tratamentul pancreatitei acute este încă subiect de controversă, deoarece puține dintre mijloacele terapeutice care au fost testate până acum s-au dovedit a fi eficiente. Noi am studiat anterior 31 de cazuri de pancreatită acută asociată cu colică saturnină (o manifestare digestivă a intoxicației cu plumb). Am constatat o evoluție favorabilă a stării pacienților când tratamentul a constat într-un agent chelator (calciudinatriumedetat) care s-a asociat terapiei clasice. Aceste rezultate favorabile ne-au condus la ideea că terapia cu agenți chelatori poate nu numai să elimine plumbul (un factor etiologic al pancreatitei), ci și să inhibe enzimele pancreatice. Unele dintre ele conțin metale în structura lor. Calciul și magneziul sunt agenți activatori ai unor enzime pancreatice.

SCOP

Prezentul articol studiază efectul in vitro al terapiei cu calciudinatriumedetat asupra lipazei și amilazei pancreatice în pancreatita acută cu o altă etiologie decât intoxicația saturnină.

MATERIAL ȘI METODĂ DE LUCRU

S-a studiat un grup de 41 de pacienți consecutivi cu pancreatită acută, în timpul spitalizării lor în Spitalul Clinic Județean de Urgență Sibiu. Diagnosticul de pancreatită acută a fost stabilit pe baza datelor clinice, imagistice (ecografie, computertomografie) și biologice. Lipaza pancreatică a fost măsurată prin metoda Neumann și Ziegehorn, cu valori normale până la 190 U/L. Amilaza pancreatică a fost determinată prin metode Smith și Roe, cu valori normale în sânge variind între 60-200 U amilazice/L. Enzimele pancreatice au fost studiate

după ce sângele a fost recoltat, la începutul spitalizării, înainte ca vreun medicament să le fi fost administrat. Enzimele au fost determinate din nou, dintr-o a doua probă serică, la o oră după ce serul a fost tratat cu calciudinatriumedetat (substanța a fost diluată la 0,014 mg/mL ser). Enzimele serice au fost de asemenea dozate în prima probă de ser, care a fost incubată timp de o oră. Semnificația statistică a rezultatelor a fost analizată cu testul t Student. Lipaza serică a fost determinată la 31 de pacienți, iar amilaza serică – la 16 pacienți.

REZULTATE

Distribuția cazurilor în funcție de vârstă, etiologie, gen și rezultatele experimentelor sunt prezentate în tabelele I, II, III și IV. Vârsta medie a grupului examinat a fost 54,8 ani. Un număr de 21 de pacienți au fost de gen feminin (51,2%), iar 20 au fost bărbați (48,8%). Din punct de vedere de etiologie, pancreatita biliară a fost cea mai frecventă (20 de pacienți), urmată de cea alcoolică (16 cazuri) și, cu un număr mai mic de pacienți, de cea idiopatică (2 cazuri), metabolică (2 cazuri) și postoperatorie (1 caz).

Valorile enzimelor pancreatice serice nu s-au modificat după o oră de incubație după prima prelevare (fără administrare de calciudinatriumedetat). După administrarea agentului chelator s-a observat o scădere statistic semnificativă a enzimelor pancreatice, comparativ cu valorile lor de la prima recoltare și cu valorile lor în serul recoltat la o oră după prima recoltare. Doar la un pacient (3,22%) valoarea lipazei nu s-a normalizat și la 2 pacienți (12,5%) concentrațiile amilazei serice nu s-au normalizat, deși au scăzut semnificativ.

¹Autor corespondent: Romeo-Gabriel Mihăilă, B-dul Corneliu Coposu, Nr. 2-4, Sibiu, România, E-mail: romeomihaila@yahoo.com, Tel: +40726 340655

Articol intrat în redacție în 10.06.2013 și acceptat spre publicare în 11.09.2013
ACTA MEDICA TRANSILVANICA Decembrie 2013;2(4):94-97

ASPECTE CLINICE

Tabelul nr. 1. Repartiția pacienților cu pancreatită acută în funcție de vârstă, gen, etiologie și valorile lipazei serice (U/L) la cele 4 determinări din timpul studiului

Numărul curent	Vârsta	Genul	Etiologia	La internare	Proba recoltată la o oră după internare	După incubația probei recoltate la o oră după prima	După tratament cu CaNa2EDTA
1	49	F	Alcoolică	828	831	826	46,6
2	60	F	Biliară	868	861	867	57,6
3	58	F	Biliară	1050	1059	1048	170,0
4	61	F	Biliară	4615	4450	4370	156,8
5	50	F	Biliară	4270	4281	4269	47,5
6	55	M	Postoperatorie	2715	2724	2715	72,0
7	41	M	Alcoolică	680	671	679	42,0
8	51	M	Alcoolică	5704	5290	4950	164,0
9	39	F	Idiopatică	264	270	264	42,0
10	54	F	Biliară	1705	1711	1704	76,0
11	41	F	Biliară	604	618	604	28,0
12	43	F	Biliară	268	260	267	47,6
13	48	F	Biliară	397	381	396	14,0
14	65	M	Biliară	644	633	643	18,0
15	60	F	Biliară	6580	6130	5730	184,0
16	57	M	Postoperatorie	800	791	799	27,0
17	48	M	Alcoolică	1190	1181	1188	84,0
18	56	F	Biliară	1724	1728	1722	62,0
19	62	M	Biliară	627	635	627	21,5
20	53	M	Alcoolică	290	298	189	84,0
21	55	M	Alcoolică	1520	1514	1519	72,0
22	58	F	Biliară	417	409	416	17,6
23	49	M	Hipertipidemică	500	509	498	40,0
24	43	M	Alcoolică	1120	1136	1119	48,0
25	39	M	Idiopatică	4480	4230	3870	262,2
26	61	M	Alcoolică	1520	1517	1519	19,8
27	51	F	Biliară	4438	4130	4020	56,0
28	68	M	Alcoolică	300	310	299	19,6
29	38	F	Biliară	476	479	474	56,0
30	60	M	Alcoolică	1050	1041	1048	84,0
31	48	F	Alcoolică	1500	1507	1499	19,8
Media				1247,6	1215,2	1176,2	53,9

Tabelul nr. 2. Repartiția pacienților cu pancreatită acută în funcție de vârstă, gen, etiologie și valorile amilazei serice (U/L) la cele 4 determinări din timpul studiului

Numărul curent	Vârsta	Genul	Etiologia	La internare	Proba recoltată la o oră după internare	După incubația probei recoltate la o oră după prima	După tratament cu CaNa2EDTA
1	49	F	Alcoolică	454	480	453	80
2	60	F	Biliară	500	509	498	200
3	58	F	Biliară	380	369	379	60
4	61	F	Biliară	4000	3742	3792	420
5	50	F	Biliară	2060	2041	2059	200
6	55	M	Postoperatorie	2350	2303	2349	80
7	55	F	Biliară	710	715	709	132
8	42	M	Alcoolică	330	339	328	30
9	58	F	Biliară	350	299	349	60
10	49	M	Alcoolică	370	361	370	60
11	52	M	Alcoolică	484	480	483	80
12	41	F	Biliară	500	509	499	200
13	39	F	Biliară	700	715	697	70
14	52	M	Alcoolică	3500	3323	3263	400
15	46	F	Biliară	500	499	499	31
16	61	M	Alcoolică	480	488	478	60
Media				1104,3	1073,3	1075,3	135,2

Legendă: Ho = ipoteză nulă; N = mărimea lotului (numărul de pacienți); L = numărul gradelor de libertate (L = N1+N2 -2); p = gradul de semnificație (a riscului); 1-p = 0,99 intervalul de încredere; (t1,t2) = intervalul de acceptare a ipotezei Ho; Tc = valoarea calculată a testului t Student, corespunzătoare tipului de Ho; $T_c = \frac{(m1-m2)}{\sqrt{(N1-1)*V1+(N1-1)*V2}} * \sqrt{L/(1/N1+1/N2)}$; m1 = valorile medii ale probelor recoltate la internare; m2 = valorile medii ale probelor recoltate la o oră după internare; m3 = valorile medii ale probelor după incubație, recoltate la o oră după prima probă; m4 = valorile medii ale probelor recoltate, după tratament cu CaNa2EDTA; V1 = dispersia standard (deviația standard pătrată) a primului lot care este comparat; V2 = dispersia standard a celui de-al doilea lot care este comparat.

ASPECTE CLINICE

Tabelul nr. 3. Lipaza serică: Testul t Student pentru compararea a două medii de la două populații cu distribuție normală, având deviație standard egală, necunoscută

Parametrul	Compararea m1 cu m2	Compararea m1 cu m3	Compararea m1 cu m4	Compararea m3 cu m4
Ho	m1=m2	m1=m3	m1=m4	m3=m4
N	31	31	31	31
L	60	60	60	60
p	0,01	0,01	0,01	0,01
(t1,t2)	(- 2,66 ;2,66)	(- 2,66 ;2,66)	(- 2,66 ;2,66)	(- 2,66 ;2,66)
Tc	0,155	0,228	5,176	5,469
Concluzie	0,155 c (-2,66 ;2,66) Ho admisă	0,228 c (-2,66 ;2,66) Ho admisă	5,176 c (-2,66 ;2,66) Ho respinsă	5,469 c (-2,66 ;2,66) Ho respinsă

Tabelul nr. 4. Amilaza serică: Testul t Student pentru compararea a două medii de la două populații cu distribuție normală, având deviație standard egală, necunoscută

Parametrul	Compararea m1 cu m2	Compararea m1 cu m3	Compararea m1 cu m4	Compararea m3 cu m4
Ho	m1=m2	m1=m3	m1=m4	m3=m4
N	16	16	16	16
L	30	30	30	30
p	0,01	0,01	0,01	0,01
(t1,t2)	(- 2,75 ;2,75)	(- 2,75 ;2,75)	(- 2,75 ;2,75)	(- 2,75 ;2,75)
Tc	0,075	0,07	3,226	3,305
Concluzie	0,075 c (-2,75 ;2,75) Ho admisă	0,07 c (-2,75 ;2,75) Ho admisă	3,226 c (-2,75 ;2,75) Ho respinsă	3,305 c (-2,75 ;2,75) Ho respinsă

*Legendă: Ho = ipoteză nulă; N = mărimea lotului (numărul de pacienți); L = numărul gradelor de libertate ($L = N1 + N2 - 2$); p = gradul de semnificație (a riscului); 1-p = 0,99 intervalul de încredere; (t1,t2) = intervalul de acceptare a ipotezei Ho; Tc = valoarea calculată a testului t Student, corespunzătoare tipului de Ho; $Tc = (m1 - m2) / \sqrt{((N1 - 1) * V1 + (N1 - 1) * V2) * \sqrt{L / (1/N1 + 1/N2)}}$; m1 = valorile medii ale probelor recoltate la o oră după internare; m2 = valorile medii ale probelor recoltate la o oră după internare; m3 = valorile medii ale probelor după incubare, recoltate la o oră după prima probă; m4 = valorile medii ale probelor recoltate, după tratament cu CaNa2EDTA; V1 = dispersia standard (deviația standard pătrată) a primului lot care este comparat; V2 = dispersia standard a celui de-al doilea lot care este comparat.*

Lipaza pancreatică este activată de calciu și de magneziu.(4,5,6,7,8,9) În pancreatita acută creșterea amilazei este o dovadă a activării enzimatică. Pe de altă parte, lipaza are un rol evident în procesul pancreatic. Lipaza produce necroză adipocitară care poate fi locală și / sau metastatică. Enzima alterează adipocitele, eveniment trigger care produce citosteatonecroză.

Mecanismele prin care calciudinatriumedetat-ul inhibă lipaza pancreatică necesită unele clarificări. Substanța formează chelați cu metale di- și trivalente. Printre mineralele și metalele care sunt chelate de aceasta se numără calciul și magneziul. Se pare că calciudinatriumedetat-ul interferează cu activarea lipazei prin intermediul calciului și magneziului.(10,11,12)

DISCUȚII ȘI CONCLUZII

Puține mijloace de tratament și-au dovedit eficiența în tratamentul pancreatitei acute. De aceea, noi metode de tratament sunt testate în prezent. Rezultatele bune care au fost obținute în tratamentul pancreatitei acute asociate cu colica saturnină folosind agenți chelatori sugerează că ele se pot datora și inhibiției enzimatică produse de calciudinatriumedetat.

Prezentul studiu, efectuat *in vitro* pe un lot de 41 de pacienți, aduce argumente pentru a confirma această ipoteză. Din punct de vedere statistic, notăm o scădere semnificativă a activității enzimelor pancreatice după tratamentul cu calciudinatriumedetat.

Este bine cunoscut faptul că unele enzime pancreatice conțin metale în structura lor (amilaza conține zinc), iar altele au calciu sau zinc drept stabilizator. Lipaza conține în centrul ei activ o triadă catalitică: acid asparaginic, histidină și serină. Acidul asparaginic ia un proton din histidină, activând-o. La rândul ei, histidina catalitică activă ia un proton de la serină, crescând nucleofilia restului serinic. Ea acționează asupra carbonilului dintr-un ester al substratului localizat în centrul activ. Rezultă un produs intermediar tetraedric din care va rezulta un complex acyl-enzimă. Prin dezacetilare, o etapă hidrolitică, rezultă un acid gras și o enzimă liberă. Domeniul N-terminal al lipazei pancreatice conține un site de legare a Ca^{2+} într-o regiune buclă.(1,2,3)

REFERINȚE

1. Dodson GG, Lawson DM, Winkler FK. Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. Faraday Discuss 1992;93:95-105.
2. Aoubala M, de la Fourniere L, Douchet I, et al. Human pancreatic lipase. Importance of the hinge region between the two domains, as revealed by monoclonal antibodies. J Biol Chem 1995; 270:3932-3937.
3. Smit RC, Southwell-Keely J, Chesher D: Should serum pancreatic lipase replace serum amylase as a biomarker of acute pancreatitis? ANZ Surg 2005;75:399-404.
4. Brown WJ, Belmonte AA, Melius P. Effects of divalent cations and sodium taurocholate on pancreatic lipase activity with gum arabic-emulsified tributylglycerol substrates. Biochim Biophys Acta 1977;486:313-321.
5. Hotz J, Goebell H, Ziegler R. Interactions of calcium, magnesium and atropine on exocrine pancreatic secretion in man. Eur J Clin Invest 1978;5:303-307.
6. Kimura H, Futami Y, Tarui S, Shinomiya T. Activation of human pancreatic lipase activity by calcium and bile salts. J Biochem 1982;1:243-251.
7. Fassati P, Ponti M, Paris P, Berti G, Tarenghi G. Kinetic colorimetric assay of lipase in serum. Clin Chem 1992;2:211-215.

8. Massicotte G, Baudry M. Brain plasticity and remodeling of AMPA receptor properties by calcium-dependent enzymes. *Genet Eng (NY)* 2004;26:239-254.
9. Santhanam K, Wagle S. Studies in vitro. Activation of high molecular weight pancreatic lipase. *Biochem Biophys Res Commun* 1971;43:1369-1380.
10. Cornes MP, Ford C, Gama R. Spurious hyperkalaemia due to EDTA contamination: common and not always easy to identify. *Ann Clin Biochem* 2008;45:601-603.
11. Cornes MP, Davidson F, Darwin L, et al. Multi-centre observational study of spurious hyperkalemia due to EDTA contamination. *ClinLab* 2010;56:597-599.
12. Ijaz A, Maqsood-ul-Hassan, Khan IM, Saed F, Tariq KM. EDTA contamination in laboratory specimens – effect of an awareness campaign. *J Coll Physicians Surg Pak* 2010;20:405-407.