

# Nieinwazyjne markery zapalne w przebiegu nieswoistych chorób zapalnych jelit

## Noninvasive markers in inflammatory bowel disease

Patrycja Szachta<sup>1</sup>, Dorota Roszak<sup>1</sup>, Mirosława Gałęcka<sup>2</sup>, Iwona Ignys<sup>1</sup>, Zbigniew Niestrata<sup>1</sup>, Wojciech Cichy<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Pediatrii, Klinika Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UM w Poznaniu

<sup>2</sup> Instytut Mikrobiologii w Poznaniu

**Address for correspondence:** Mgr inż. Patrycja Szachta

Klinika Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UM

ul. Szpitalna 27/33; 60-572 Poznań; tel: (061) 847 26 85, 849 14 32; fax: (061) 847 26 85; e-mail: patrycja\_szachta@o2.pl

### Streszczenie

Nieswoiste zapalenia jelit (NZJ) stanowią grupę chorób o nadal niejasnej etiologii. Uważa się, że rolę w ich rozwoju odgrywają czynniki infekcyjne, predyspozycje genetyczne oraz dysfunkcja immunologiczna. Zarówno diagnozowanie, jak i leczenie nieswoistych chorób zapalnych jelit wiąże się z licznymi trudnościami. Wykorzystywane procedury są zarówno inwazyjne, jak i kosztowne. Z tego względu rośnie zainteresowanie nieinwazyjnymi markerami stanu zapalnego, które mogą być pomocne w diagnozowaniu i kontroli przebiegu NZJ. W pracy przedstawiono wady i zalety rutynowo wykorzystywanych parametrów zapalnych, jak również stosunkowo nowe markery stanu zapalnego. (**Gastroenterol. Pol.**, 2009, Vol. 16, No. 5, p. 399-401)

**Słowa kluczowe:** markery zapalne, nieswoiste choroby zapalne jelit, kinaza pirogronianowa guza, kalprotektyna, laktoferryina

### Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD) is a group of diseases of unknown etiology. It is considered that infectious agents, genetic predisposition, and immunological dysfunction play roles in their development. Both the diagnosis and treatment of IBD involve many difficulties. The procedures used are both invasive and expensive. This is the reason for the growing interest in noninvasive inflammatory markers which can be helpful in diagnosing and controlling IBD. In this article the advantages and disadvantages of both routine and relatively new inflammatory markers are presented.

**Key words:** inflammatory markers, inflammatory bowel disease, tumor pyruvate kinase, calprotectin, lactoferrin

## Wprowadzenie

Nieswoiste choroby zapalne jelit (NZJ) obejmują chorobę Leśniowskiego-Crohna (*Crohn's disease* – CD), wrzodziejące zapalenie jelita grubego (*colitis ulcerosa* – CU) oraz niespecyficzne zapalenie jelit (*colitis nonspecifica* – CN). Najczęściej występującymi typami NZJ są CD i CU. Niespecyficzne zapalenia jelit są diagnozowane w około 15% przypadków (1). Jednoznacznej przyczyny wystąpienia nieswoistych chorób zapalnych jelit nadal nie ustalono. Najbardziej prawdopodobna wydaje się być hipoteza o podłożu immunologicznym, genetycznym lub mikrobiologicznym. Niewykluczone, że za powstanie zmian odpowiedzialne są interakcje przytoczonych czynników. Pojawił się pogląd, iż u osób predysponowanych genetycznie, z dysfunkcją układu immunologicznego, dochodzi do aktywacji komórek odpornościowych w odpowiedzi na florę własną gospodarza. Fakt ten może wynikać z zaburzenia odpornościowych mechanizmów regulatorowych. Dyskutowana jest również możliwość aktywacji immunologicznej, a w konsekwencji powstania stanu zapalnego w odpowiedzi na czynnik o charakterze egzogennym. U pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit obserwowana jest widoczna dysbioza w obrębie przewodu pokarmowego. Liczne badania

na omawianej populacji wykazały obecność drobnoustrojów potencjalnie chorobotwórczych, takich jak patogenne szczepy *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium paratuberculosis*, *Clostridium difficile*, czy podwyższona ilość grzybów drożdżopodobnych. Z racji rozbieżności w uzyskiwanych wynikach, nadal nie ustalono jednego czynnika infekcyjnego odpowiedzialnego za rozwój NZJ.

Nie tylko ustalenie przyczyn choroby jest powodem trudności w terapii pacjentów z NZJ. Problematyczna jest również diagnostyka, zarówno dotycząca typu NZJ, jak i stanu aktywności choroby. Częstokroć stan kliniczny pacjenta nie koreluje ze stopniem zaostrzenia zmian, ocenianym według ogólnie przyjętych kryteriów. Standardowo wykorzystywane metody diagnostyczne, takie jak techniki endoskopowe, histopatologiczne oraz radiologiczne, należą zarówno do badań inwazyjnych, jak i kosztownych. Problematyczna jest konieczność systematycznego ich wykonywania w celu obrazowania nasilenia zmian oraz niechętny stosunek pacjentów do tych badań. Istnieje pilna konieczność opracowania nowych, nieinwazyjnych i nieobciążających pacjenta metod obrazowania istnienia i aktywności zmian w jelitach. Z tego względu rosnącym zainteresowaniem cieszą się markery stanu zapalnego – substancje antygenowe, towarzyszące określonym zmianom, które ze zróżnicowaną

czułością i swoistością wskazują na istnienie danej choroby. Za najbardziej przydatne wskaźniki w NZJ uważa się związki wykrywane w kale, takie jak kalprotektyna czy laktoferryna. Duże nadzieje wiąże się z nowym testem wykrywającym zwiększone stężenie dimerowej formy kinazy pirogronianowej w kale – Tumor M2-PK (*Tumor pyruvate kinase M2-PK*). Jednak parametry laboratoryjne krwi, takie jak odczyn Biernackiego, CRP, ANCA (*antineutrophil cytoplasmic antibodies*), ASCA (*anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies*) również mają uznane miejsce w diagnostyce nieswoistych chorób zapalnych jelit. W dużej mierze jest to spowodowane zdecydowanie niższym, w porównaniu z nowoczesnymi markerami, kosztem „starych” wskaźników oraz ich szeroką dostępnością.

### Tradycyjne markery stanu zapalnego

Odczyn Biernackiego (OB) jest parametrem wykorzystywanym do potwierdzenia oraz analizy przebiegu NZJ. Mimo iż OB ma podwyższoną wartość w przypadku omawianej jednostki chorobowej, jest on wskaźnikiem o niskiej czułości i swoistości. Fakt ten spowodowany jest możliwością podwyższenia OB również w innych przypadkach (np. nowotwory, ciąża, infekcje bakteryjne). Z tego względu badanie traktowane jest raczej jako analiza uzupełniająca podczas wstępnego diagnozowania choroby. Popularne jest ponadto oznaczanie stężenia białka ostrej fazy, zwanego CRP (białko C-reaktywne). Stymuluje ono klasyczną ścieżkę aktywacji układu dopełniacza, pobudzając proces fagocytozy. Poziom markera rośnie w szybkim tempie w odpowiedzi na działanie czynnika indukującego. Jednocześnie po ustąpieniu bodźca – spada równie intensywnie. Jego wadą jest niska swoistość przy stosunkowo wysokiej czułości. Obecnie białko ostrej fazy jest parametrem standardowo wykonywanym u pacjentów z NZJ, z uwagi na możliwość wnioskowania o stanie klinicznym pacjenta.

Istotną rolę w diagnostyce odgrywają ponadto takie parametry, jak hemoglobina, płytki krwi, żelazo czy albuminy. Badanie przeprowadzone przez Kobielską-Dubiel z zespołem wykazało istotną zależność między parametrami laboratoryjnymi (OB, CRP, hemoglobina, płytki krwi, żelazo, albuminy) a aktywnością choroby u pacjentów z NZJ (2).

Powszechnie wykonywane są również oznaczenia serologiczne, takie jak przeciwciała przeciwko ziarnistościom cytoplazmy neutrofilów ANCA i przeciwko oligomannozowym elementom ściany komórkowej grzybów ASCA. Zaznaczyć należy, iż pANCA są specyficzne przede wszystkim dla CU (występują nawet u 80% chorych), natomiast mniej specyficzne dla pacjentów z CD (około 25% pacjentów). Z kolei ASCA występują zwłaszcza w przypadku choroby CD (około 80% pacjentów), w mniejszym natomiast stopniu we wrzodziejącym zapaleniu jelita grubego (5%) (3). Dzięki tym różnicom ich oznaczanie jest wysoce kierunkowo swoiste.

Jak już zaznaczono wcześniej, najwyższą czułością i swoistością charakteryzują się markery stanu zapalnego, oznaczone bezpośrednio w kale. Uważa się bowiem, iż analiza stolca pacjenta umożliwia najlepsze zobrazowanie zmian zachodzących w obrębie jelit. Markerami budzącymi największe zainteresowanie są laktoferryna, kalprotektyna oraz dimerowa forma kinazy pirogronianowej (Tumor M2-PK).

### Laktoferryna i kalprotektyna

Laktoferryna jest glikoproteina, stanowiącą element odporności typu wrodzonego. Bierze również udział w regulacji odporności nabytej, jest związkiem immunoregulatorowym, przeciwwzapalnym, o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Jej liczne funkcje, potwierdzone w wielu badaniach, obejmują ponadto działanie przeciwnowotworowe, regulację metabolizmu kości, dojrzewania limfocytów czy mielopoetyzy. Laktoferryna wytwarzana jest przez komórki nabłonka wydzielniczego, przez co obecna jest w takich wydzielinach, jak śluz, ślina czy płyn nasienny. Omawiana substancja występuje również w ziarnistościach granulocytów oraz w znacznie mniejszych ilościach w płynie żołądkowo-jelitowym, owodniowym, moczu oraz kale. W stanie zdrowia jej stężenie jest względnie stałe i raczej niskie, podczas gdy proces zapalny generuje miejscowe podwyższenie stężenia laktoferryny. Z tego względu pomiar stężenia laktoferryny w kale wydaje się być wartościowym narzędziem określania aktywności choroby u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit.

Kalprotektyna jest dwujednostkowym kompleksem białek wiążących wapń oraz cynk. Występuje w ziarnistościach neutrofilii, makrofagach i monocytach. Jest to jednocześnie substancja o aktywności przeciwdrobnoustrojowej i antyproliferacyjnej. Uważa się, że nie wszystkie właściwości kalprotektyny zostały dotychczas dokładnie poznane. Dzięki temu, że kalprotektyna spotykana jest we wszystkich komórkach ciała, stanowi doskonały marker stanu homeostazy i zmian patologicznych. W reakcji na bodziec aktywowane leukocyty uwalniają znaczne ilości kalprotektyny i następowo zwiększa się jej stężenie w płynach ciała oraz kale, stanowiąc jednocześnie obraz zmian chorobowych w otaczających tkankach i narządach. Wykazano, że wzrost poziomu kalprotektyny w kale ma miejsce w przypadku ostrych stanów zapalnych, takich jak nowotwory jelit czy nieswoiste choroby zapalne. U pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit dochodzi do rozszczelnienia bariery jelitowej, a w konsekwencji do przenikania leukocytów przez ścianę jelita. Dzięki temu możliwe jest wykrywanie kalprotektyny w kale i określanie jej stężenia. Piśmiennictwo podaje, że u chorych z NZJ w stanie zaostrzenia choroby stężenie omawianej substancji jest znacznie wyższe niż u osób zdrowych (4).

Oba omówione markery są intensywnie badane pod kątem możliwości wykorzystania jako wskaźniki stanu zapalnego. Wykazano, że oznaczenie poziomu kalprotektyny w kale jest badaniem użytecznym diagnostycznie: charakteryzuje się 95% czułością i 93% swoistością (5). Należy jednak uwzględnić obserwacje Kobielskiej-Dubiel i wsp., które potwierdziły korelację ze stopniem aktywności choroby w przypadku CU, natomiast nie wykazały powiązania z CD (6). Badanie przeprowadzone przez Scarpę i wsp. u pacjentów z chorobą Crohna po chirurgicznej resekcji fragmentu jelita wykazało, że laktoferryna jest wskaźnikiem dobrze odzwierciedlającym stan kliniczny pacjenta, również w przypadku remisji. Omawiana substancja okazała się jednocześnie być lepszym wskaźnikiem aktywności choroby, niż kalprotektyna (7). Podobne wyniki uzyskał zespół badaczy fińskich, wykazując przydatność laktoferryny w obrazowaniu klinicznego stanu choroby u pacjentów z CD. Wysunięto jednak odmienne wnioski dotyczące kalprotektyny, która okazała się być w tym przypadku równie przydatnym markerem stanu

zapalnego (8). Jednakową skuteczność diagnostyczną obu markerów w obrazowaniu nieswoistych chorób zapalnych jelit (zarówno choroby Leśniowskiego-Crohna, jak i wrzodziejącego zapalenia jelita grubego) wykazano także w badaniu Joishy i wsp. (9). Badacze wskazują na możliwość jednoczesnego oznaczania obu parametrów, a co za tym idzie – uzyskiwanie wyższej czułości i swoistości badania. Oba markery zyskują więc stopniowe uznanie jako narzędzia skutecznego obrazowania aktywności choroby u pacjentów z NZJ. Mogą się ponadto przysłużyć w wyodrębnianiu pacjentów z zespołem jelita nadwrażliwego, u których poziom wskaźników jest zdecydowanie niższy niż w przypadku NZJ (10).

### Dimerowa forma kinazy pirogronianowej guza – Tumor M2-PK

Wysoką czułością i swoistością oznaczenia charakteryzuje się pomiar aktywności dimerowej formy kinazy pirogronianowej w kale – M2-PK. Liczne badania wykazały przydatność tego markera w diagnostyce raka jelita grubego, a co za tym idzie możliwość jego wykorzystania jako nieinwazyjnego parametru skriningowego. Izoenzym zwany M2-PK jest obecny w tkankach silnie proliferujących, takich jak guzy czy komórki macierzyste. W przeciwieństwie do tkankowo specyficznych izoenzymów kinazy pirogronianowej M2-PK jest nieaktywną postacią enzymu, składającą się nie z czterech (tetrametr), lecz z dwóch podjednostek (dimer). W komórkach nowotworowych forma dimerowa występuje w znacznej przewadze.

Porównanie badań oceniających parametry diagnostyczne testu Tumor M2-PK ustaliły jego czułość i swoistość na odpowiednio: 68,8-91% oraz 71,9-100%, w ustalonym przez producenta (ScheboBiotech, Niemcy) punkcie odcięcia 4 U/ml dla raka jelita grubego. Ponieważ poziom M2-PK ulega silnemu obniżeniu po skutecznej interwencji chirurgicznej, badanie może być z powodzeniem wykorzystywane do długofalowej i nieinwazyjnej obserwacji stanu pacjenta po zabiegu. Dla celów prewencyjnych istotna jest obserwacja, że poziom dimerowej formy kinazy pirogronianowej jest podwyższony również w przypadku zmian niezłośliwych, takich jak polipy czy gruczolaki, które mają tendencję do przekształcania się w guzy. Czułość w wykrywaniu tego typu zmian oscyluje w granicach 25-61% (11). Potwierdzona przydatność omawianego markera w wykrywaniu zmian przednowotworowych i nowotworowych w jelitach skłoniła do próby określenia jego przydatności w obrazowaniu stopnia aktywności choroby u pacjentów z nieswoistymi chorobami zapalnymi jelit. Dotychczas przeprowadzono zaledwie dwie analizy badające przydatność testu Tumor M2-PK u pacjentów z NZJ. Zespół Czub i wsp. wykazał, że dimerowa forma kinazy pirogronianowej jest użytecznym narzędziem w obrazowaniu aktywności choroby u pacjentów pediatrycznych. Poziom M2-PK był statystycznie istotnie wyższy u dzieci w aktywnym stadium choroby (zarówno w przypadku CD, jak i CU), niż u pacjentów w remisji. Jednocześnie ilość dimerowej formy kinazy pirogronianowej korelowała z ocenami aktywności choroby uzyskanymi za pomocą skal PCDI oraz Truelove-Wittsa.

Wykazując przydatność markera w ocenie aktywności choroby, autorzy podkreślają jednocześnie konieczność dalszych badań, połączonych z oceną testu w odniesieniu do innych markerów (12). Podobne wyniki uzyskano w badaniu obejmującym pacjentów dorosłych (13). Poziom M2-PK był wyraźnie podwyższony u pacjentów z aktywną postacią choroby Leśniowskiego-Crohna oraz wrzodziejącego zapalenia jelita grubego. Obserwowano wyraźny jego spadek u badanych w stadium remisji. Obecność choroby potwierdzona została endoskopowo, a jej stopień oceniony został za pomocą odpowiedniej skali (indeks Harley-Bradshawa). Co istotne, w przypadku zespołu jelita nadwrażliwego poziom M2-PK nie był podwyższony. Przytoczone badania wskazują, iż test Tumor M2-PK może w istotny sposób ograniczyć ilość inwazyjnych zabiegów diagnostycznych u chorych z NZJ. Skuteczność zastosowanej terapii może być bowiem, choć z pewnym zastrzeżeniem, kontrolowana z wykorzystaniem markera. Jednocześnie konieczne są dalsze analizy, bazujące na jednoczesnej i porównawczej ocenie omówionych markerów, co może przyczynić się do zwiększenia całkowitej czułości i swoistości oznaczenia u chorych z NZJ.

### Piśmiennictwo

1. Austin G.L., Herfarth H.H., Handler R.S.: *A critical evaluation of serologic markers for inflammatory bowel disease*. Clin. Gastroenterol. Hepatol., 2007, 5, 545-547.
2. Kobielska-Dubiel N., Ignyś I., Cichy W., Kobelski M.: *Kliniczne wskaźniki w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci*. Pediatr. Współ., 2007, 9, 167-171.
3. Plevy S.: *Do serological markers and cytokines determine the indeterminate?* J. Clin. Gastroenterol., 2004, 126, 414-424.
4. Kosiarz M., Paradowski L.: *Kalprotektyna*. Gastroenterol. Pol., 2008, 15, 333-335.
5. Fagerberg U., Loof L., Myrdal U.: *Colorectal inflammation is well predicted by fecal calprotectin in children with gastrointestinal symptoms*. Acta Paediatr., 2005, 94, 1855-1854.
6. Kobielska-Dubiel N., Ignyś I., Krauss H., Cichy W., Kobelski M.: *Kalprotektyna w kale jako marker zapalny w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci*. Pediatr. Współ., 2007, 9, 172-175.
7. Scarpa M., D'Incà R., Basso D., Ruffolo C., Polese L., Bertin E., Luise A., Frego M., Plebani M., Sturmiolo G.C., D'Amico D.F., Angriman I.: *Fecal lactoferrin and calprotectin after ileocolonic resection for Crohn's disease*. Dis. Colon Rectum., 2007, 50, 861-869.
8. Sipponen T., Savilahti E., Kolho K.L., Nuutinen H., Turunen U., Färkkilä M.: *Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings*. Inflamm. Bowel Dis., 2008, 14, 40-46.
9. Joishy M., Davies I., Ahmed M., Wassel J., Davies K., Sayers A., Jenkins H.: *Fecal calprotectin and lactoferrin as noninvasive markers of pediatric inflammatory bowel disease*. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 2009, 48, 48-54.
10. Langhorst J., Elsenbruch S., Koelzer J., Rueffer A., Michalsen A., Dobos G.J.: *Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices*. Am. J. Gastroenterol., 2008, 103, 162-169.
11. Hardt P.D., Ewald N.: *Tumor M2 Pyruvate Kinase: a tumor marker and its clinical application in gastrointestinal malignancy*. Exp. Rev. Mol. Diagn., 2008, 8, 579-585.
12. Czub E., Herzig K.H., Szaflarska-Popawska A., Kiehne K., Socha P., Woś H., Kamińska B., Błaszczyński M., Cichy W., Bała G., Brodzicki J., Grzybowska-Chlebowczyk U., Walkowiak J.: *Fecal pyruvate kinase: a potential new marker for intestinal inflammation in children with inflammatory bowel disease*. Scand. J. Gastroenterol., 2007, 42, 1147-1150.
13. Chung-Faye G., Hayee B.H., Maestranzi S., Donaldson N., Forgacs I., Sherwood R.: *Fecal M2-Pyruvate Kinase (M2-PK): a novel marker of intestinal inflammation*. Inflamm. Bowel Dis., 2007, 13, 1374-1378.

Received: 2009-08-11. Revised: 2009-09-22. Accepted: 2009-10-09.

**Conflict of interest: none declared**