

# Wczesna ekspresja jelitowa u niemowląt chorych na mukowiscydozę – badanie wstępne

## Early intestinal manifestation in infants with cystic fibrosis – a pilot study

Aleksandra Lisowska, Jarosław Walkowiak

Klinika Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych I Katedry Pediatrii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Przegląd Gastroenterologiczny 2010; 5 (3): 164–167

DOI: 10.5114/pg.2010.14142

**Słowa kluczowe:** mukowiscydoza, skринing noworodków, zapalenie jelit, kalprotektyna.

**Key words:** cystic fibrosis, neonatal screening, intestinal inflammation, calprotectin.

**Adres do korespondencji:** prof. dr hab. n. med. Jarosław Walkowiak, Klinika Gastroenterologii Dziecięcej i Chorób Metabolicznych, I Katedra Pediatrii, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań, tel. +48 61 848 03 10, e-mail: jarwalk@ump.edu.pl

### Streszczenie

**Wprowadzenie:** Mukowiscydoza (*cystic fibrosis* – CF) jest chorobą zapalno-destrukcyjną o różnorodnej ekspresji klinicznej. W dotychczas przeprowadzonych badaniach wykazano występowanie procesu zapalnego jelit u chorych na CF, jednak dostępne są wyłącznie wyniki uzyskane u dzieci w wieku przedszkolnym i szkolnym oraz młodych dorosłych. Nie ma natomiast jakichkolwiek danych dotyczących momentu pojawienia się zapalenia jelit u dzieci najmłodszych. Z tego też względu w publikacji dokonano oceny występowania stanu zapalnego jelit w chwili ustalania rozpoznania u niemowląt diagnozowanych w badaniach przesiewowych noworodków.

**Materiał i metody:** Do badań włączono 10 niemowląt z CF w wieku do 3 mies. Grupę porównawczą stanowiło 20 zdrowych niemowląt. U wszystkich badanych oznaczono stężenia kalprotektyny w stolcu, a u chorych na CF oceniono stan odżywienia (standaryzowana masa ciała), zewnątrzwydzielniczą funkcję trzustki (stężenie elastazy 1 w stolcu) i ekspresję choroby oskrzelowo-płucnej.

**Wyniki:** U znaczącego odsetka chorych na CF w chwili stawiania diagnozy stwierdzono występowanie niedoboru masy ciała. Jednocześnie aż 7 pacjentów (70%) prezentowało kliniczne objawy niewydolności zewnątrzwydzielniczej trzustki. Stężenia kalprotektyny wynosiły 1,8–442,0 ng/ml ( $X_{sr}$   $\pm$  SEM: 99,0  $\pm$  17,0, mediana: 88,8) i były statystycznie istotnie większe niż u zdrowych niemowląt ( $X_{sr}$   $\pm$  SEM: 26,6  $\pm$  9,0, mediana: 12,5,  $p < 0,049$ ). Nie stwierdzono występowania istotnej statystycznie korelacji między stężeniami kalprotektyny a wartościami klasycznej ( $r = 0,027$ ) i konduktometrycznej próby potowej ( $r = -0,037$ ), standaryzowaną wartością masy ciała ( $r = -0,096$ ), stężeniem elastazy 1 w stolcu ( $r = -0,207$ ) oraz ekspresją choroby oskrzelowo-płucnej ( $r = 0,090$ ).

### Abstract

**Introduction:** Cystic fibrosis (CF) is inflammatory and destructive disease with differentiated clinical expression. Conducted studies revealed intestinal inflammation in CF patients. However, available results are limited to children, adolescents and young adults. There are no data assessing the initiation of intestinal inflammation at the youngest age. Therefore, the aim of the present study was to assess whether intestinal inflammation is present at diagnosis in infants diagnosed in a CF neonatal screening programme.

**Material and methods:** Ten CF infants aged up to 3 months were introduced into the study. Twenty healthy infants served as a control group. Faecal calprotectin concentrations were determined in all studied subjects. In CF infants, nutritional status (standardized body weight), exocrine pancreatic function (faecal elastase-1 concentrations) and the expression of bronchopulmonary disease were also assessed.

**Results:** In a significant percentage of CF patients body weight deficit was present at diagnosis. In 7 patients (70%) clinical symptoms of exocrine pancreatic insufficiency were found. Faecal calprotectin concentrations ranged from 1.8 to 442 ng/ml (mean  $\pm$  SEM: 99.0  $\pm$  17.0, median: 88.8) and were significantly higher than in healthy infants (mean  $\pm$  SEM: 26.6  $\pm$  9.0, median: 12.5,  $p < 0.049$ ). No significant correlation between intestinal inflammation and values of classic ( $r = 0.027$ ) and conductometric ( $r = -0.037$ ) sweat test, standardized body weight ( $r = -0.096$ ), faecal elastase-1 concentrations ( $r = -0.207$ ) and the expression of bronchopulmonary disease ( $r = 0.090$ ) was found.

**Conclusions:** Intestinal inflammation is present in cystic fibrosis patients from early infancy. No correlation between intestinal inflammation and other parameters assessing the intensity of the disease has been found. However, due

**Wnioski:** Stan zapalny przewodu pokarmowego występuje u chorych na CF od wczesnego okresu niemowlęcego. Nie wykazano związku nasilenia stanu zapalnego jelit z innymi parametrami oceniającymi ekspresję choroby. Ze względu jednak na małą liczebność badanej grupy powyższe wnioskowanie ma ograniczony charakter.

## Wprowadzenie

Mukowiscydoza (*cystic fibrosis* – CF) to choroba zapalno-destrukcyjna o różnorodnej ekspresji klinicznej. Nie ulega wątpliwości, że stan zapalny dróg oddechowych jest jej główną manifestacją kliniczną. Dodatkowo występuje wiele innych objawów, w tym ze strony przewodu pokarmowego. Jednym z istotnych, chociaż niedocenianych problemów jest stan zapalny jelit.

Wyniki wielu badań przemawiają za występowaniem procesu zapalnego przewodu pokarmowego u chorych na CF. Smyth i wsp. [1] udokumentowali zwiększoną zawartość białek zapalnych w płynie uzyskanym w wyniku płukania jelita grubego. Raia i wsp. [2] wykazali obecność nacieku komórek jednojądrzastych w blaszce właściwej (*lamina propria*) biopłatów błony śluzowej dwunastnicy, natomiast Bruzesse i wsp. [3] stwierdzili zwiększone stężenia kalprotektyny w stolcu oraz zwiększoną produkcję tlenu azotu w jelicie grubym. W mysim modelu z jelitowym fenotypem HCF Norkina i wsp. [4] wykazali nasilony stan zapalny jelita oraz znaczącą aktywację układu immunologicznego. Kontynuując badania, udokumentowano nadmierną bakteryjną kolonizację śluzu jelitowego. Przeprowadzona antybiotykoterapia doprowadziła do znaczącej redukcji liczby bakterii oraz zmniejszenia nasilenia stanu zapalnego, co sugeruje obecność związku przyczynowo-skutkowego [5]. W dotychczas przeprowadzonych badaniach własnych autorzy niniejszej pracy wykazali, że powyższa teza nie znajduje tak jednoznacznego potwierdzenia u ludzi, a występowanie zespołu jelitowego przerostu bakteryjnego u chorych na CF nie korelowało z nasileniem stanu zapalnego [6]. Niejasne pozostaje, czy CF jako choroba podstawowa prowadzi do rozwoju stanu zapalnego czy też może jedynie sprzyja nadmiernej/nieprawidłowej kolonizacji bakteryjnej przewodu pokarmowego.

Dotychczas przeprowadzone badania stanu zapalnego w przebiegu CF obejmowały wyłącznie dzieci w wieku przedszkolnym i szkolnym oraz młodych dorosłych [1–3, 6]. Nie ma natomiast jakichkolwiek danych dotyczących momentu pojawienia się zapalenia jelit u dzieci najmłodszych. Z tego też powodu w niniejszej publikacji oceniono występowanie stanu zapalnego jelit w chwili ustalania rozpoznania u niemowląt chorych na CF, diagnozowanych w badaniach przesiewowych noworodków w odniesieniu do grupy kontrolnej. Dodatkowo

to the limited number of subjects, the obtained conclusion have limited value.

podjęto próbę korelacji stanu zapalnego ze stanem odżywienia, funkcją zewnątrzwydzielniczą trzustki oraz aktywnością choroby oskrzelowo-płucnej.

## Materiał i metody

Do badań włączono 10 niemowląt, u których diagnozę postawiono we wczesnym wieku niemowlęcym (5.–10. tydz. życia) w wyniku badań przesiewowych noworodków. U każdego pacjenta wykonano klasyczną i konduktometryczną próbę potową oraz badanie molekularne genu *CFTR* (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Test konduktometryczny jest używany alternatywnie do testu klasycznego. Dokonuje się w nim pomiaru przewodnictwa elektrycznego potu (aparaty Macroduct, Nanoduct), a uzyskane wyniki są automatycznie przeliczane na stężenie wodnego roztworu NaCl o równoważnym przewodnictwie. Za wartości typowe dla CF w powyższym teście uznaje się stężenia > 80 mmol/l (większe niż dla klasycznej próby potowej) [7].

U wszystkich badanych oznaczono spektrofotometrycznie stężenia kalprotektyny w stolcu (Immunodiagnostik AG, Bensheim, Niemcy), po przeprowadzeniu podwójnej reakcji z użyciem przeciwciał monoklonalnych, które wiążą się ze ściśle określonymi epitopami enzymu (metoda immunoenzymatyczna; *enzyme-linked immunosorbent assay* – ELISA). Do dalszej analizy wyliczono wartość średnią z trzech niezwiązanych ze sobą pomiarów. Jako punkt odniesienia przyjęto stężenie kalprotektyny u 20 bezobjawowych niemowląt (stosownie dobranych pod względem płci i wieku) z badań przesiewowych noworodków, u których wykluczono rozpoznanie CF.

U każdego pacjenta oceniono stan odżywienia (standaryzowana masa ciała), zewnątrzwydzielniczą funkcję trzustki (stężenie elastazy 1 w stolcu; ELISA, ScheboBiotech, Giessen, Niemcy) oraz ekspresję choroby oskrzelowo-płucnej (bez objawów – 1, antybiotykoterapia – 2, i potrzeba hospitalizacji – 3). Standaryzowaną masę ciała wyliczono wg następującego wzoru:

$$Z\text{-score}_{MC} = \frac{MC_{akt.} [cm] - MC_{nal.} [cm]}{SD [cm]}$$

gdzie:  $MC_{akt.}$  – wysokość ciała w dniu pomiaru,  
 $MC_{nal.}$  – średnia wysokość ciała, stosownie do wieku i płci,

$SD$  – odchylenie standardowe, stosownie do wieku i płci.

**Tabela I.** Podstawowe dane kliniczne badanych pacjentów**Table I.** Basic data of examined patients

Pacjent	Masa ciała [centyl]	Próba potowa [CF <sup>-</sup> w mmol/l]		E1 [ $\mu$ g/g]	Cp [mg/l]	Ekspresja choroby oskrzelowo-płucnej	
		klasyczna	konduktometryczna			antybiotyk	hospitalizacja
1	10.	70	109	9	57,5	tak	nie
2	< 3.	52	105	16	17,5	tak	tak
3	< 3.	90	113	15	27,5	tak	tak
4	3.	70	121	23	7,5	tak	nie
5	3.–10.	87	97	33	7,5	tak	nie
6	3.	63	109	17	110	nie	nie
7	< 3.	88	111	6	400	tak	tak
8	3.	34	65	350	22,5	nie	nie
9	3.–10.	65	72	680	102	tak	nie
10	3.	69	90	200	60	nie	nie

E1 – elastaza 1 w stolcu, Cp – kalprotektyna w stolcu

Występowanie korelacji między stężeniem kalprotektyny a stężeniem elastazy 1 w stolcu, standaryzowaną masą ciała i ekspresją choroby oskrzelowo-płucnej oceniono z zastosowaniem testu Spearmana. Za istotną statystycznie przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Podstawowe dane kliniczne badanych zestawiono w tabeli I. U znaczącego odsetka chorych na CF w chwili ustalenia rozpoznania stwierdzono występowanie niedoboru masy ciała. Jednocześnie aż 7 pacjentów (70%) prezentowało kliniczne objawy niewydolności zewnętrznej trzustki.

Stężenia kalprotektyny u niemowląt z CF wynosiły 1,8–400 mg/l ( $X_{sr}$   $\pm$  SEM: 99,0  $\pm$  17,0, mediana: 88,8) i były statystycznie istotnie większe niż u zdrowych niemowląt (zakres: 1,5–115 mg/l,  $X_{sr}$   $\pm$  SEM: 26,6  $\pm$  9,0, mediana: 12,5,  $p < 0,049$ ). Nie stwierdzono występowania istotnej statystycznie korelacji między stężeniami kalprotektyny a wartościami klasycznej ( $r = 0,027$ ) i konduktometrycznej próby potowej ( $r = -0,037$ ), standaryzowaną wartością masy ciała ( $r = -0,096$ ), stężeniem elastazy 1 w stolcu ( $r = -0,207$ ) oraz ekspresją choroby oskrzelowo-płucnej ( $r = 0,090$ ).

## Dyskusja

W przeprowadzonym badaniu wykazano znacząco większe stężenia kalprotektyny w stolcu u niemowląt z CF w porównaniu z jej stężeniami w stolcu u niemowląt zdrowych. Rozpoznanie ustalono w badaniu przesiewowym noworodków, tym samym badane dzieci były możliwie najmłodsze. Z tego też względu można przyjąć,

że proces zapalny jelit w CF występuje bardzo wcześnie, najprawdopodobniej już od pierwszych tygodni, a może nawet dni życia. Niewątpliwie należy poszerzyć badaną grupę. Należy również uwzględnić, że stężenia kalprotektyny u niemowląt są generalnie większe niż u dzieci i dorosłych [8, 9].

Smyth i wsp. [1] stwierdzili zwiększoną zawartość białek pochodzenia surowiczego (albuminy,  $\alpha$ 1-antytrypsyny, IgG), immunoglobulin sekrecyjnych (IgA i IgM), enzymów komórkowych (eozynofilowe białko kationowe i elastaza neutrofilowa) oraz cytokin (IL-8 i IL-1 $\beta$ ) w płynie uzyskanym w wyniku płukania jelita grubego u 21 niewydolnych trzustkowo dzieci chorych na CF. U 14 dzieci i młodych dorosłych Raia i wsp. [2] wykazali aktywację komórek T w błonie śluzowej dwunastnicy. Nie stwierdzono jednocześnie morfologicznego uszkodzenia śluzówki. Odnotowano pozytywny efekt w przypadku zastosowania diety elementarnej, zarówno w warunkach hodowli tkankowej, jak i klinicznie u pacjenta. Hendriks i wsp. [10] wykazali zwiększoną przepuszczalność błony śluzowej jelita cienkiego oraz występowanie jej stanu zapalnego. Zastosowanie inhibitorów pompy protonowej doprowadziło do częściowej korekty obserwowanych zaburzeń.

Występowanie zmian zapalnych jelita lub zwiększonych wartości testów pośrednich stwierdzono u znaczącej większości ocenianych chorych na CF [1–3, 6, 10]. Ponieważ dwa badania obejmowały niewyselekcjonowane grupy badawcze, należy oczekiwać, że występowanie stanu zapalnego jelit w CF jest powszechne [1, 2]. Dotychczas jednak ocenie nie poddawano niemowląt w najwcześniejszym okresie życia. Jak wspomniano we wstępie, Bruzesse i wsp. [3] stwierdzili zwiększone stę-

żenia kalprotektyny w stolcu oraz zwiększoną produkcję tlenu azotu w jelicie grubym. Podaż probiotyku (*Lactobacillus rhamnosus GG*) przez 4 tyg. doprowadziła do redukcji zawartości tlenu azotu, co sugeruje zmniejszenie nasilenia stanu zapalnego. Ekstrapolując powyższe wyniki, należałoby założyć, że chorzy na CF powinni otrzymywać probiotyki od chwili postawienia diagnozy. Ustalenie takiego zalecenia wymaga jednak dalszych badań. Podobnie, ze względu na brak jednoznacznych danych, pod znakiem zapytania pozostaje wdrożenie innych metod terapeutycznych (inhibitory pompy protonowej bądź dieta elementarna).

## Wnioski

Stan zapalny przewodu pokarmowego występuje u chorych na CF od wczesnego okresu niemowlęcego. Nie wykazano związku nasilenia stanu zapalnego jelit z innymi parametrami oceniającymi ekspresję choroby. Ze względu jednak na małą liczebność badanej grupy, powyższe wnioskowanie ma ograniczony charakter.

*Źródłem finansowania są badania statutowe Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.*

## Piśmiennictwo

1. Smyth RL, Croft NM, O'Hea U, et al. Intestinal inflammation in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 2000; 82: 394-9.
2. Raia V, Maiuri L, De Ritis G, et al. Evidence of chronic inflammation in morphologically normal small intestine of cystic fibrosis patients. *Pediatr Res* 2000; 47: 344-50.
3. Bruzesse E, Raia V, Gaudiello G, et al. Intestinal inflammation is a frequent feature of cystic fibrosis and is reduced by probiotic administration. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 813-9.
4. Norkina O, Kaur S, Ziemer D, De Lisle RC. Inflammation of the cystic fibrosis mouse small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: 1032-41.
5. Norkina O, Burnett TG, De Lisle RC. Bacterial overgrowth in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator null mouse small intestine. *Infect Immun* 2004; 72: 6040-9.
6. Lisowska A, Wójtowicz J, Walkowiak J. Small intestine bacterial overgrowth is frequent in cystic fibrosis: combined hydrogen and methane measurements are required for its detection. *Acta Biochim Pol* 2009; 56: 631-4.
7. Walkowiak J, Pogorzelski A, Sands D i wsp. Zasady rozpoznawania i leczenia mukowiscydozy. *Stand Med* 2009; 3: 1-28.
8. Campeotto F, Butel MJ, Kalach N, et al. High fecal calprotectin concentrations in newborn infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89: 353-5.
9. Dorosko SM, MacKenzie T, Connor RI. Fecal calprotectin concentrations are higher in exclusively breastfed infants compared to those who are mixed fed. *Breastfeed Med* 2008; 3: 117-9.
10. Hendriks HJ, van Kreel B, Phorget PP. Effects of therapy with lansoprazole on intestinal permeability and inflammation in young cystic fibrosis patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 260-5.