

УДК 616.345-002-07:616.153.1-074

## Содержание пируваткиназы типа М2 (М2-РК) в плазме крови больных воспалительными заболеваниями толстой кишки

Е.А. Конович, И.Л. Халиф

(Государственный научный центр колопроктологии Росмедтехнологий)

### Contents of plasma M2-pyruvate kinase (M2-PK) in patients with inflammatory bowel diseases

Ye.A. Konovich, I.L. Khalif

**Цель исследования.** Определение уровня М2-пируваткиназы (М2-РК) у больных язвенным колитом (ЯК) и болезнью Крона (БК) и его зависимости от характера течения и клинико-эндоскопической активности заболевания.

**Материал и методы.** Обследованы 70 пациентов: 42 – с ЯК, 15 – с БК, 13 – с синдромом раздраженного кишечника (СРК) и 10 здоровых лиц. Концентрацию М2-РК в плазме крови определяли твердофазным сэндвич методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы «ScheBo» (Германия).

**Результаты.** Уровень М2-РК у больных ЯК, БК, СРК и здоровых лиц составил соответственно  $29,1 \pm 3,0$ ,  $17,3 \pm 1,5$ ,  $7,9 \pm 1,6$  и  $7,0 \pm 1,5$  ед./мл ( $p < 0,05$  – для ЯК и БК в сравнении с СРК и контрольной группой и для ЯК в сравнении с БК). Уровень М2-РК значительно повышался у больных с тяжелой ( $45,9 \pm 6,4$  ед./мл) и среднетяжелой ( $20,9 \pm 3,2$  ед./мл) формами ЯК, включая пациентов, резистентных к стероидной терапии ( $61,5 \pm 6,2$  ед./мл), по сравнению с больными в стадии ремиссии ( $11,0 \pm 1,8$  ед./мл,  $p < 0,05$ ) и у пациентов с хроническим непрерывным течением по сравнению с хроническим рецидивирующим течением ( $40,3 \pm 5,0$  и  $22,7 \pm 3,8$  ед./мл,  $p < 0,05$ ). Уровень М2-РК имел выраженную тенденцию к повышению с усилением эндоскопической активности ЯК.

**Aim of investigation.** Assessment of M2-pyruvate kinase level (M2-PK) at patients with ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) and its relation to course, clinical and endoscopic activity of disease.

**Material and methods.** Overall 70 patients were investigated: 42 – with UC, 15 – with CD, 13 – with irritable bowel syndrome (IBS) and 10 healthy patients. Blood plasma concentration of M2-PK was determined by solid-phase sandwich method of enzyme-linked immunoassay with application of «ScheBo» (Germany) test-systems.

**Results.** The level of M2-PK in patients with UC, CD, IBS and healthy persons was  $29,1 \pm 3,0$ ,  $17,3 \pm 1,5$ ,  $7,9 \pm 1,6$  and  $7,0 \pm 1,5$  U/ml respectively ( $p < 0,05$  – for UC and CD in comparison to IBS and control group and for UC in comparison to CD). The level of M2-PK considerably raised in patients with severe ( $45,9 \pm 6,4$  U/ml) and moderate ( $20,9 \pm 3,2$  U/ml) UC, including steroid-resistant patients ( $61,5 \pm 6,2$  U/ml), in comparison to patients in remission ( $11,0 \pm 1,8$  U/ml,  $p < 0,05$ ) and at patients with chronic continuous course in comparison to chronic relapsing course ( $40,3 \pm 5,0$  and  $22,7 \pm 3,8$  U/ml,  $p < 0,05$ ). The level of M2-PK had the strong tendency to increase with progression of endoscopic activity of UC. Increase of M2-PK concentration ( $M \pm \sigma$  of the control group,  $p < 0,05$ ) was observed in 76,2% of UC patients, at 73,3% of patients with CD and in 15,4% of patients with IBS.

Конович Евгений Аронович – доктор медицинских наук, старший научный сотрудник Государственного научного центра колопроктологии Росмедтехнологий. Контактная информация для переписки: gnck@tsr.ru; 123423, Москва, ул. Саям Адила, 2. ГНЦ колопроктологии

Халиф Игорь Львович – доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научно-организационной работе Государственного научного центра колопроктологии

Увеличение концентрации M2-PK ( $M \pm \sigma$  контрольной группы,  $p < 0,05$ ) наблюдалось у 76,2% больных ЯК, у 73,3% больных БК и у 15,4% пациентов с СРК.

**Выводы.** Содержание M2-PK в крови больных ЯК и БК значительно возрастает. Повышение уровня M2-PK у больных ЯК ассоциировано с усилением клинико-эндоскопической активности, хроническим непрерывным течением и резистентностью к стероидной терапии.

**Ключевые слова:** язвенный колит, болезнь Крона, M2-пируваткиназа.

**Conclusions.** Blood level of M2-PK of patients with UC and CD increases considerably. Elevation of M2-PK level at patients with UC is associated to enhancement of clinical and endoscopic activity, chronic continuous course and steroid-resistance.

**Key words:** ulcerative colitis, Crohn's disease, M2-pyruvate kinase.

Пируваткиназа, ключевой фермент гликолиза, присутствует в различных тканях в виде определенных изоформ, имеющих тетрамерную структуру (типы L, R, M1 и M2). В активно пролиферирующих и опухолевых клетках пируваткиназа продуцируется в форме димера, обозначаемого как M2-PK (tumor M2-pyruvate kinase) [6, 9, 15]. Антигенная специфичность M2-PK и увеличение ее концентрации в крови и кале онкологических больных явились основанием для изучения M2-PK в качестве онкомаркера: у больных с опухолями легкого, почки, молочной железы и желудочно-кишечного тракта чувствительность и специфичность метода составили соответственно 60–80% и 80–90% [2, 8, 14, 18, 21]. В последующем установлено, что повышение уровня M2-PK наблюдается также при некоторых неопухолевых заболеваниях, включая острые и хронические воспалительные процессы, заболевания сердца, сахарный диабет и др. [3, 16–18, 20, 23]. Первые публикации данных по *язвенному колиту* (ЯК) и *болезни Крона* (БК) показали возможность использования теста для дифференциации органических и функциональных заболеваний толстой кишки, активного воспалительного процесса и его ремиссии [4, 5, 7, 11].

Исследования последних лет значительно развили представления о роли изменений врожденного и адаптивного иммунитета в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника. Полученные сведения подтверждают гипотезу о генетической обусловленности нарушений иммунорегуляции в слизистой оболочке кишечника и отмене толерантности к нормальной микрофлоре [22, 24]. Интенсивно изучаются механизмы взаимодействия микрофлоры в виде ее патоген-ассоциированных молекулярных паттернов с рецепторами клеток, включая систему toll-подобных рецепторов [19, 22]. Показано, что воспалительный процесс является следствием нарушений взаимодействия врожденного иммунитета с адаптивным иммунным ответом, включая дисбаланс основных типов эффекторных клеток (Th1-, Th2-клетки, T-регуляторные клетки, NK-клетки и др.) Активация различных типов клеток адаптивного иммунитета

при ЯК (Th2- и NK T-клетки) и БК (Th1- и Th17-клетки) опосредуется различными системами цитокинов [10, 13, 26]. Исследования критериев активности воспаления, дифференциальной диагностики и прогнозирования рецидива воспалительного процесса являются актуальными вопросами в проблеме воспалительных заболеваний кишечника.

В связи с изложенным **цель** настоящей работы состояла в изучении уровня M2-PK в крови больных ЯК и БК в зависимости от характера течения и клинико-эндоскопических параметров воспалительного процесса.

## Материал и методы исследования

В течение 2009–2010 гг. обследовали 70 больных, находившихся на лечении в ГНЦ колопроктологии: у 42 диагностирован ЯК, у 15 – БК и у 13 – *синдром раздраженного кишечника* (СРК). 10 здоровых лиц были обследованы в качестве контрольной группы. Диагноз устанавливали на основании данных клинико-инструментальных исследований (эндоскопического, ультразвукового, рентгенологического и морфологического) в соответствии с международными критериями заболеваний [1].

Среди 42 больных ЯК женщин было 25, мужчин – 17, средний возраст –  $42,6 \pm 1,8$  года (17–68 лет). Длительность ЯК составила  $6,7 \pm 1,3$  года (6 мес. – 35 лет). Тотальное поражение толстой кишки выявлено у 35 пациентов, левосторонний колит – у 7. Среднетяжелая и тяжелая формы заболевания диагностированы соответственно у 17 и 15 больных, клинико-эндоскопическая ремиссия наблюдалась у 10. В группе пациентов с активным ЯК хроническое непрерывное течение отмечено у 21, хроническое рецидивирующее течение – у 11.

Среди 15 больных БК женщин было 8, мужчин – 7. Средний возраст –  $31,5 \pm 3,2$  года (16–58 лет). Длительность заболевания составила  $8,8 \pm 1,3$  года (1,5 года – 19 лет). Поражение толстой кишки наблюдалось у 12 человек, илеоколит – у 3. Воспалительная (нестриктурирующая и

непенетрирующая) форма БК диагностирована у 11, пенетрирующая форма – у 2 и стриктурирующая – у 2. Перианальные поражения были обнаружены у 10 пациентов. У всех больных в соответствии с индексом Беста зарегистрирована активная форма заболевания [1].

Концентрацию М2-РК в плазме крови определяли твердофазным сэндвич методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем фирмы «ScheVo» (Германия). В лунки планшета для иммуноферментного анализа, содержащие моноклональные антитела 1-го типа, специфичные к М2-РК, вносили стандартные растворы М2-РК и исследуемые образцы плазмы. М2-РК стандартных растворов и плазмы связывается с антителами и, таким образом, иммобилизуется на планшете. На следующем этапе вносили моноклональные антитела 2-го типа, конъюгированные с биотином, которые связываются с иммобилизованной на предыдущем этапе М2-РК. Далее проводили инкубацию с конъюгатом пероксидазы со стрептавидином, который соединяется с биотином антител 2-го типа. На заключительном этапе активность связавшейся пероксидазы определяли по интенсивности окисления субстрата – ТМБ (тетра-метил бензидина). Результат реакции регистрировали на иммуноферментном фотометре «ЭФОС 9305» (Россия).

Для статистического анализа использовали критерии *t* Стьюдента и Манна–Уитни. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования и их обсуждение

Результаты определения уровня М2-РК в плазме представлены в табл. 1, из которой видно, что концентрация М2-РК значительно увеличивается у больных ЯК и БК по сравнению с больными СРК и здоровыми лицами. У больных ЯК содержание М2-РК выше, чем у больных БК ( $p < 0,05$ ).

Уровень М2-РК при ЯК увеличивался с усилением клинической активности: он был достоверно выше у пациентов с активной формой болезни ( $32,6 \pm 3,6$  ед./мл) по сравнению с больными в фазе ремиссии ( $11,0 \pm 1,8$  ед./мл,  $p < 0,05$ ) и при тяжелом течении ЯК ( $45,9 \pm 6,4$  ед./мл) по сравнению со среднетяжелым ( $20,9 \pm 3,2$  ед./мл,  $p < 0,05$ ). Концентрация М2-РК была значительно более высокой при тотальном колите ( $37,3 \pm 5,0$  ед./мл), чем при левостороннем поражении ( $20,2 \pm 5,6$  ед./мл,  $p < 0,05$ ) и при хроническом непрерывном течении ( $40,3 \pm 5,0$  ед./мл) по сравнению с хроническим рецидивирующим ( $22,7 \pm 3,8$  ед./мл,  $p < 0,05$ ) – табл. 2.

Среди больных тотальным ЯК выраженная и умеренная эндоскопическая активность воспалительного процесса наблюдалась в 9 и 23 случаях соответственно. При выраженной активности воспаления по сравнению с умеренной отмечена четкая тенденция к увеличению содержания М2-РК:  $48,2 \pm 9,5$  и  $27,8 \pm 4,4$  ед./мл соответственно ( $p > 0,05$ ).

В целом повышение уровня М2-РК в плазме при ЯК, БК, СРК ( $> M \pm \sigma$  контрольной группы,

Таблица 1

Уровень М2-РК пируваткиназы у больных воспалительными заболеваниями толстой кишки (ед./мл)

Язвенный колит ( <i>n</i> =42)	Болезнь Крона ( <i>n</i> =15)	Синдром раздраженного кишечника ( <i>n</i> =13)	Контрольная группа ( <i>n</i> =10)
$29,1 \pm 3,0^*$ (0–84)	$17,3 \pm 1,5^{**}$ (8,6–26)	$7,9 \pm 1,6$ (4,0–15)	$7,0 \pm 1,5$ (0–14)

\*  $p < 0,05$  – между группами больных ЯК и БК, ЯК и СРК, ЯК и контрольной группой;

\*\*  $p < 0,05$  – между группами больных БК и СРК, БК и контрольной группой.

Таблица 2

Уровень М2-РК пируваткиназы в зависимости от степени тяжести, протяженности поражения толстой кишки и характера течения язвенного колита

Уровень М2-РК (ед./мл)	Степень тяжести			Протяженность поражения		Характер течения		Контроль- ная группа
	тяжелая <i>n</i> =15	средне- тяжелая <i>n</i> =17	ремиссия <i>n</i> =10	тотальная <i>n</i> =24	левосторонняя <i>n</i> =8	хроническое непрерывное <i>n</i> =21	хроническое рецидивирующее <i>n</i> =11	
$29,1 \pm 3,0$ (0–84)	$45,9 \pm 6,4^*$ (0–84)	$20,9 \pm 3,2^*$ (4,5–50)	$11,0 \pm 1,8$ (4,5–21)	$37,3 \pm 5,0^*$ (0–84)	$20,2 \pm 5,6$ (4,5–42)	$40,3 \pm 5,0^*$ (0–84)	$22,7 \pm 3,8$ (6,8–45)	$7,0 \pm 1,5$ (0–14)

\*  $p < 0,05$  при сравнении подгрупп больных с тяжелой и среднетяжелой формами ЯК; при сравнении этих подгрупп с больными в фазе ремиссии и контрольной группой; подгрупп с тотальным и левосторонним ЯК; при сравнении больных с хроническим непрерывным и хроническим рецидивирующим течением.

уровень значимости  $p < 0,05$ ) наблюдалось у 32 из 42 (76,2%), у 11 из 15 (73,3%) и у 2 из 13 (15,4%) больных соответственно.

У 8 больных с тяжелой формой ЯК в связи с неэффективностью консервативной терапии были выполнены хирургические операции: колэктомия с брюшно-анальной резекцией прямой кишки (5) и субтотальная резекция ободочной кишки с формированием илео- и сигмостом (3). При обследовании до операции уровень М2-РК у этих больных составил  $61,5 \pm 6,2$  (37–84) ед./мл, что значительно превышало ее уровень у пациентов с тяжелой формой, чувствительных к стероидной терапии –  $25,1 \pm 8,0$  (0–45) ед./мл ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, сказанное свидетельствует о том, что уровень М2-РК при хронических воспалительных заболеваниях толстой кишки (ЯК и БК) существенно повышается по сравнению с СРК как заболеванием неорганической природы и по сравнению со здоровыми лицами. Концентрация М2-РК возрастает с усилением агрессивности течения ЯК – клинко-эндоскопической активности и резистентности к стероидной терапии.

Полученные нами результаты согласуются с проведенными в последние годы исследованиями уровня М2-РК в кале. Увеличение концентрации фермента наблюдалось в 70–95% случаев [4, 5, 11]: у больных ЯК и БК при активном воспалении оно составляло  $40,0$  (6,2–87) ед./мл и  $30,0$  (8–70) ед./мл соответственно, при неактивном воспалительном процессе –  $1,2$  (0–2,4) ед./мл и  $0,55$  (0–1,7) ед./мл [4]. Показано также, что фекальная М2-РК является чувствительным маркером воспаления резервуара (поушита), развивающегося как осложнение после хирургического лечения больных ЯК [12, 25].

Предпочтение фекальному тесту как неинвазивному методу отдается при обследовании детей [5]. Вместе с тем кал как субстрат количественных исследований является более трудным объектом стандартизации по сравнению с плазмой, особенно при диарее, которая наблюдается у большинства больных с активным ЯК. Поэтому выбор субстрата определения М2-РК с учетом клинической ситуации может быть сделан после проведения соответствующих сравнительных исследований.

Представленные данные расширяют спектр органических заболеваний толстой кишки (рак, ЯК, БК), при которых выявляется увеличение содержания М2-РК-пируваткиназы в крови больных, и подтверждают ее ценность как критерия клинко-эндоскопической активности воспалительного процесса.

## Заклучение

В результате проведенных исследований выявлено увеличение в плазме крови больных с воспалительными заболеваниями толстой кишки концентрации М2-пируваткиназы, которая составила  $29,1 \pm 3,0$  ед./мл у пациентов с ЯК,  $17,3 \pm 1,5$  ед./мл – с БК,  $7,9 \pm 1,6$  ед./мл – с СРК и  $7,0 \pm 1,5$  ед./мл – у здоровых лиц. Уровень М2-РК значительно повышался при активном ЯК в его среднетяжелой ( $20,9 \pm 3,2$  ед./мл) и тяжелой ( $45,9 \pm 6,4$  ед./мл) формах, включая больных, резистентных к стероидной терапии ( $61,5 \pm 6,2$  ед./мл), по сравнению с пациентами в стадии ремиссии ( $11,0 \pm 1,8$  ед./мл), а также при хроническом непрерывном течении болезни ( $40,3 \pm 5,0$  ед./мл) по сравнению с рецидивирующим течением ( $22,7 \pm 3,8$  ед./мл). Увеличение концентрации М2-РК наблюдалось у 76,2, 73,3 и 15,4% больных ЯК, БК и СРК соответственно.

## Список литературы

1. Михайлова Т.Л., Халиф И.Л. Язвенный колит. Болезнь Крона. Клиническая характеристика // Неспецифические воспалительные заболевания кишечника / Под ред. Г.И. Воробьева, И.Л. Халифа. – М.: Миклош, 2008. – С. 136–155.
2. Сергеева Н.С., Мишунина М.П., Хомяков В.М. и др. Динамика содержания в плазме крови опухолевой пируваткиназы М2-типа (TuM2-РК) на этапах диагностики, лечения и мониторинга больных колоректальным раком // Рос. онкол. журн. – 2007. – № 5. – С. 9–12.
3. Cervencia H., Aigner R., Bacher H. et al. TUM2-PK (pyruvate kinase type tumor M2), CA19-9 and CEA in patients with benign, malignant and metastasizing pancreatic lesions // Anticancer Res. – 1999. – Vol. 19. – P. 849–852.
4. Chung-Faye G., Hayee B., Maestranzi S. et al. Fecal M2-pyruvate kinase (M2-PK): a novel marker of intestinal inflammation // Inflamm. Bowel Dis. – 2007. – Vol. 13. – P. 1374–1378.
5. Czub E., Herzig K.H., Szaflarska-Popawska A. et al. Fecal pyruvate kinase: a potential new marker for intestinal inflammation in children with inflammatory bowel disease // Scand. J. Gastroenterol. – 2007. – Vol. 42, N 10. – P. 1147–1150.
6. Eigenbrodt E., Reinacher M., Scheefers-Borchel U. et al. Double role for pyruvate kinase type M2 in the expansion of phosphometabolite pools found in tumor cells // Critical Rev. Oncogenesis. – 1992. – Vol. 3. – P. 91–115.
7. Ewald T., Toepler M., Akinci A. et al. Pyruvate kinase M2 (tumor M2-PK) as a screening tool for colorectal cancer (CRC). A review of current published data // Z. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 43, N 12. – P. 1313–1317.
8. Hang U., Hundt S., Brenner H. Sensitivity and specificity of faecal tumour M2-pyruvate kinase for detection of colorectal adenomas in a large screening study // Br. J. Cancer. – 2008. – Vol. 99, N 1. – P. 133–135.
9. Ibsen K.H., Orlando R.A., Garrat K.N. et al. Expression of multimolecular forms of pyruvate kinase in normal, benign and malignant human breast tissue // Cancer Res. – 1982. – Vol. 42. – P. 888–892.
10. Izcue A., Coombes J.L., Powrie F. Regulatory lymphocytes and intestinal Inflammation // Annu. Rev. Immunol. – 2009. – Vol. 27. – P. 313–338.
11. Jeffery J., Lewis S.J., Ayling R.M. Fecal dimeric M2-pyruvate kinase (tumor M2-PK) in the differential diagnosis of functional and organic bowel disorders

- // Inflamm. Bowel Dis. — 2009. — Vol. 15, N 11. — P. 1630–1634.
12. Johnson M.W., Mastranzi S., Duffy A.M. et al. Faecal M2-pyruvate kinase: a novel noninvasive marker of ileal pouch inflammation // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. — 2009. — Vol. 21, N 5. — P. 544–550.
  13. Kobayashi T., Okamoto S., Hisamatsu T. et al. IL-23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease // Gut. — 2008. — Vol. 57. — P. 1682–1689.
  14. Luftner D., Mesterharm J., Akrivakis C. et al. Tumor Type M2-pyruvate kinase expression in advanced breast cancer // Anticancer Res. — 2000. — Vol. 20. — P. 5077–5082.
  15. Mazurek S., Grimm H., Oehmke M. et al. Tumor M2-PK and glutaminolytic enzymes in the metabolic shift of tumor cells // Anticancer Res. — 2000. — Vol. 20. — P. 5151–5154.
  16. Oremek G., Muller R., Sapoutzis N., Wigand R. Pyruvate kinase type tumor M2 plasma levels in patients afflicted with rheumatic diseases // Anticancer Res. — 2003. — Vol. 23. — P. 1131–1134.
  17. Oremek G., Rutner F., Sapoutzis N., Sauer-Eppel H. Tumor marker pyruvate kinase type tumor M2 in patients suffering from diabetic nephropathy // Anticancer Res. — 2003. — Vol. 23. — P. 1155–1158.
  18. Oremek G., Sapoutzis N., Kramer W. et al. Value of tumor M2 (Tu M2-PK) in patients with renal carcinoma // Anticancer Res. — 2000. — Vol. 20. — P. 5095–5098.
  19. Rakoff-Nahoum S., Hao L., Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis // Immunity. — 2006. — Vol. 25. — P. 319–329.
  20. Schneider J., Morr H., Velcovsky H. et al. Quantitative detection of tumor M2-pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases // Cancer Detect. Prev. — 2000. — Vol. 24, N 6. — P. 531–535.
  21. Schneider J., Velcovsky H., Morr H. et al. Comparison of the tumor markers tumor M2-PK, CEA, CYFRA 21-1, NCE and SCC in the diagnosis of lung cancer // Anticancer Res. — 2000. — Vol. 20. — P. 5053–5058.
  22. Shih D.Q., Targan S.R. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease // World J. Gastroenterol. — 2008. — Vol. 14. — P. 390–400.
  23. Staib P., Hoffmann M., Schinkothe T. Plasma levels of tumor M2-pyruvate kinase should not be used as a tumor marker for hematological malignancies and solid tumors // Clin. Chem. Lab. Med. — 2006. — Vol. 44, N 1. — P. 28–31.
  24. Strober W., Fuss I., Mannon P. The fundamental basis of inflammatory bowel disease // J. Clin. Invest. — 2007. — Vol. 117. — P. 514–521.
  25. Walkowiak J., Banasiewicz T., Krokowicz P. et al. Fecal pyruvate kinase (M2-PK): a new predictor for inflammation and severity of pouchitis // Scand. J. Gastroenterol. — 2005. — Vol. 40, N 12. — P. 1493–1494.
  26. Zenewicz L.A., Antov A., Flavell R.A. CD4 T-cell differentiation and Inflammatory bowel disease // Trends Mol. Med. — 2009. — Vol. 15. — P. 199–207.