

## ROLA CZĄSTECZEK ADHEZYJNYCH W OCENIE STOPNIA ZAAWANSOWANIA I PROGNOZOWANIA KLINICZNEGO PRZYPADKÓW *ECHINOCOCCUS MULTILOCULARIS*

MAŁGORZATA PAUL<sup>1</sup>, JERZY STEFANIAK<sup>1</sup>, WITOLD RYCHLICKI<sup>1</sup>, MIECZYŚLAW  
KOMARNICKI<sup>2</sup> I MAŁGORZATA MAZUR-ROSZAK<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Katedra i Klinika Chorób Tropikalnych i Pasożytniczych, Akademia Medyczna,  
ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań; <sup>2</sup>Katedra i Klinika Hematologii i Chorób Rozrostowych  
Układu Krwiotwórczego, Akademia Medyczna, ul. Szamarzewskiego 84, 60-569 Poznań;  
<sup>3</sup>Katedra i Klinika Onkologii, Akademia Medyczna, ul. Łąkowa 1/2, 61-848 Poznań

**ABSTRACT.** Role of adhesion molecules in a determination of progression stages and clinical prognosis of patients infected with *Echinococcus multilocularis*. Alveococcosis in humans is characterized by a tumor-like growth with a tendency to infiltration of neighbouring organs or metastases formation in the lungs and brain. The study aimed to improve on the clinical evaluation of patients with alveolar echinococcosis (AE) and to determine the risk of metacestode spreading to adjacent tissues or distant organs by a detection of adhesion molecules involved in the tumorigenesis process. Serum concentrations of sPECAM-1, sVCAM-1 and sE-selectin adhesion molecules were studied in 8 AE patients in comparison to 75 cases with malignant neoplasms, including cases with tumors of hepatic and extra-hepatic location. The adhesion molecules were found to be early predictive markers of the active, tissue infiltrated alveococcosis with the risk of parasite spreading through the circulation. High serum levels of soluble PECAM-1 molecule were strongly related to the advanced, progressive disease and the fatality of patients' clinical prognosis.

**Key words:** adhesion molecules, clinical evaluation, *Echinococcus multilocularis*, liver neoplasms.

### WSTĘP

Zarażenie *Echinococcus multilocularis* u człowieka przybiera formę przewlekłej, podstępnie rozwijającej się choroby wątroby przypominającej rozrost nowotworowy. Pasożyt rozwija się naciekając sąsiadujące tkanki i narządy oraz wykazuje tendencję do tworzenia odległych ognisk przerzutowych w płucach i w ośrodkowym układzie nerwowym za pośrednictwem długich, niewidocznych wypustek szerzących się drogą naczyń krwionośnych i limfatycznych. W obrazie klinicznym alveokokozy dominują objawy żółtaczki i hepatomegalii z postępującym wyniszczeniem oraz wzrostem aktywności enzymów wątrobowych, natomiast w badaniach ultrasonograficznych i obrazach tomografii komputerowej jamy brzusznej obserwuje się typowe zmiany ogniskowe o cechach nieregularnego, słabo odgraniczone-



go od otoczenia wzrostu podobnego do nowotworowego, z ogniskami martwicy, zwłóknień, a także zwapnień w części centralnej lub na obrzeżach. Poszerzenie dróg żółciowych, ich niedrożność lub przemieszczenie uwidocznione w cholangio-pankreatografii wstecznej są również charakterystyczne dla alweokokozy i pozwalają na podejrzenie tej inwazji. Wobec znaczącego ryzyka wzrostu zapadalności na bąblowicę wielokomorową w naszym kraju, zwłaszcza na terenach województwa warmińsko-mazurskiego, pomorskiego i na Podkarpaciu, gdzie odsetek zarażonych lisów jest wysoki, istnieje potrzeba wczesnego rozpoznawania tej inwazji oraz jej prawidłowego różnicowania z chorobami rozrostowymi wątroby (Stefaniak 2002, Gawor i wsp. 2004).

Cząsteczki adhezyjne są proteinami powierzchniowymi, biorącymi udział w licznych procesach komórkowych związanych m. in. ze wzrostem i różnicowaniem komórek, przekazywaniem informacji, wzajemnym łączeniem się komórek oraz ich przyczepianiem do śródbłonka naczyniowego, migracją komórek układu odpornościowego biorących udział w odpowiedzi immunologicznej, a także procesami nowotworzenia i powstawania przerzutów nowotworowych. W procesie aktywnej tumorogenezy dochodzi do zmian w adhezyjności komórek, która ułatwia rozerwanie struktury prawidłowej tkanki. Dodatkowo odbywa się proces angiogenezy w celu umożliwienia intensywnego wzrostu tkance nowotworowej i zapewnienia zwiększonego dopływu krwi do powiększającej się masy nowotworu. Natomiast podczas tworzenia odległych przerzutów, komórka atypowa musi posiadać zdolność odszczepiania się od zasadniczej masy guza, przedostania do krążenia poprzez przyczepienie się do śródbłonka naczyniowego, a następnie ponownej adhezji do ściany nowego naczynia krwionośnego tak, aby utworzyć wtórne ognisko przerzutowe.

Przekazywanie sygnałów umożliwiających przemieszczanie się np. leukocytów podczas procesu zapalnego, czy komórek nowotworowych w zdrowych tkankach lub z przestrzeni międzykomórkowej do tkanek, odbywa się w kilku etapach za pośrednictwem molekuł adhezyjnych. W pracy wykorzystano trzy wybrane cząsteczki adhezyjne, swoiste dla odmiennych stadiów migracji komórek w organizmie człowieka poprzez śródbłonek naczyń krwionośnych, o różnym stadium zaawansowania: (1) śródbłonkową cząsteczkę adhezyjną leukocytów numer 1, tzw. endotelialną selektynę (e-selektyna) – biorącą udział w początkowym etapie zbliżania się komórki do śródbłonka, (2)askularną cząsteczkę adhezyjną numer 1 (VCAM-1) – odpowiedzialną za trwałe przyczepienie się (adhezję) komórki do ściany naczynia inicjujące etap migracji oraz (3) płytkowo-śródbłonkową cząsteczkę adhezyjną numer 1 (PECAM-1) – odpowiedzialną za końcowy etap przechodzenia komórki przez śródbłonek naczynia.

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania pomiaru stężeń cząsteczek adhezyjnych biorących udział w procesach tumorogenezy u pacjentów z alweokokożą, dla oceny stopnia zaawansowania klinicznego choroby oraz ustalenia roko-



wania, poprzez określenie potencjalnego ryzyka infiltracji otaczających tkanek i narządów wewnętrznych oraz tendencji do tworzenia odległych przerzutów do płuc i mózgu drogą krwiopochodną.

#### MATERIAŁ I METODY

Stężenia rozpuszczalnych molekuł adhezyjnych PECAM-1, VCAM-1 i E-selektyny oznaczano w surowicy krwi obwodowej u 8 pacjentów zarażonych *E. multilocularis* (5 kobiet i 3 mężczyzn) w wieku od 31 do 65 lat (średnio 48,4 lat), w porównaniu do 75 pacjentów z nowotworami złośliwymi o lokalizacji wątrobowej i pozawątrobowej, w tym 41 kobiet w wieku 32-75 lat (średnio 54,9 lat) i 34 mężczyzn w wieku 39-73 lat (średnio 57,0 lat).

Rozpoznanie bąblowicy wielokomorowej *E. multilocularis* stawiano na podstawie (i) stwierdzenia swoistych przeciwciał surowicznych w kierunku antygenu Em2<sup>plus</sup> w teście immunoenzymatycznym ELISA, (ii) wykazania obecności immunoglobulin przeciwko antygenom o masie 16 i 18 kDa w referencyjnej technice immunoblottingu (Western blot) oraz ostatecznie potwierdzano na podstawie (iii) badania histopatologicznego materiału uzyskanego na drodze chirurgicznej, uwidaczniającego struktury nieregularnych, różnej wielkości pęcherzyków PAS-dodatnich, odczynowy rozrost tkanki łącznej oraz ogniska martwicy i zwapnień.

Oceny rozległości zmian wywołanych przez rozrost postaci larwalnej pasożyta oraz określenia stopnia zaawansowania klinicznego przypadków *E. multilocularis* dokonywano w oparciu o międzynarodową klasyfikację PNM, uwzględniając lokalizację zmian ogniskowych w wątrobie, włączenie w proces chorobowy sąsiadujących tkanek i narządów, nacieczenie naczyń krwionośnych i dróg żółciowych, a także obecność odległych przerzutów do mózgu i płuc, na podstawie badań obrazowych, histopatologicznych i oceny chirurgicznej podczas zabiegu (Pawłowski i wsp. 2001).

W grupie 75 pacjentów z chorobami nowotworowymi, znajdowało się 41 osób ze zmianami rozrostowymi w obrębie jamy brzusznej i przewodu pokarmowego (54,7%), wśród których w rozpoznaniu histopatologicznym przeważał pierwotny rak wątroby, rak żołądka lub okrężnicy i przerzuty do wątroby w wyniku raka sutka lub ziarnicy złośliwej, oraz 34 osoby z chorobami nowotworowymi o lokalizacji pozawątrobowej (45,3%). Wśród zmian rozrostowych nie obejmujących wątroby, stwierdzano przeważnie chłoniaki ziarnicze i nieziarnicze, szpiczaka mnogiego, raka sutka i płuc, mięsaka kości. U 27 spośród 75 pacjentów ze zmianami rozrostowymi stwierdzono uogólnienie procesu nowotworowego z zajęciem licznych węzłów chłonnych lub ogniska przerzutowe do wątroby (36%).

Grupę kontrolną stanowiły surowice pobrane od 37 zdrowych mężczyzn – dawców krwi, w wieku od 28 do 64 lat (średnio 52,5 lat).

Pomiaru stężeń rozpuszczalnych podjednostek VCAM-1 (sVCAM-1) i E-selek-



tyny (sE-selektyny) dokonywano za pomocą gotowych zestawów diagnostycznych opartych na technice ELISA (R&D Systems, Minneapolis, USA), natomiast oznaczenie poziomów rozpuszczalnej cząsteczki PECAM-1 (sPECAM-1) wykonywano w oparciu o niekomercyjny test immunoenzymatyczny ELISA składany we własnym zakresie, z wykorzystaniem standardyzowanych odczynników immunologicznych (DAKO, R&D Systems, Sigma).

#### WYNIKI I DYSKUSJA

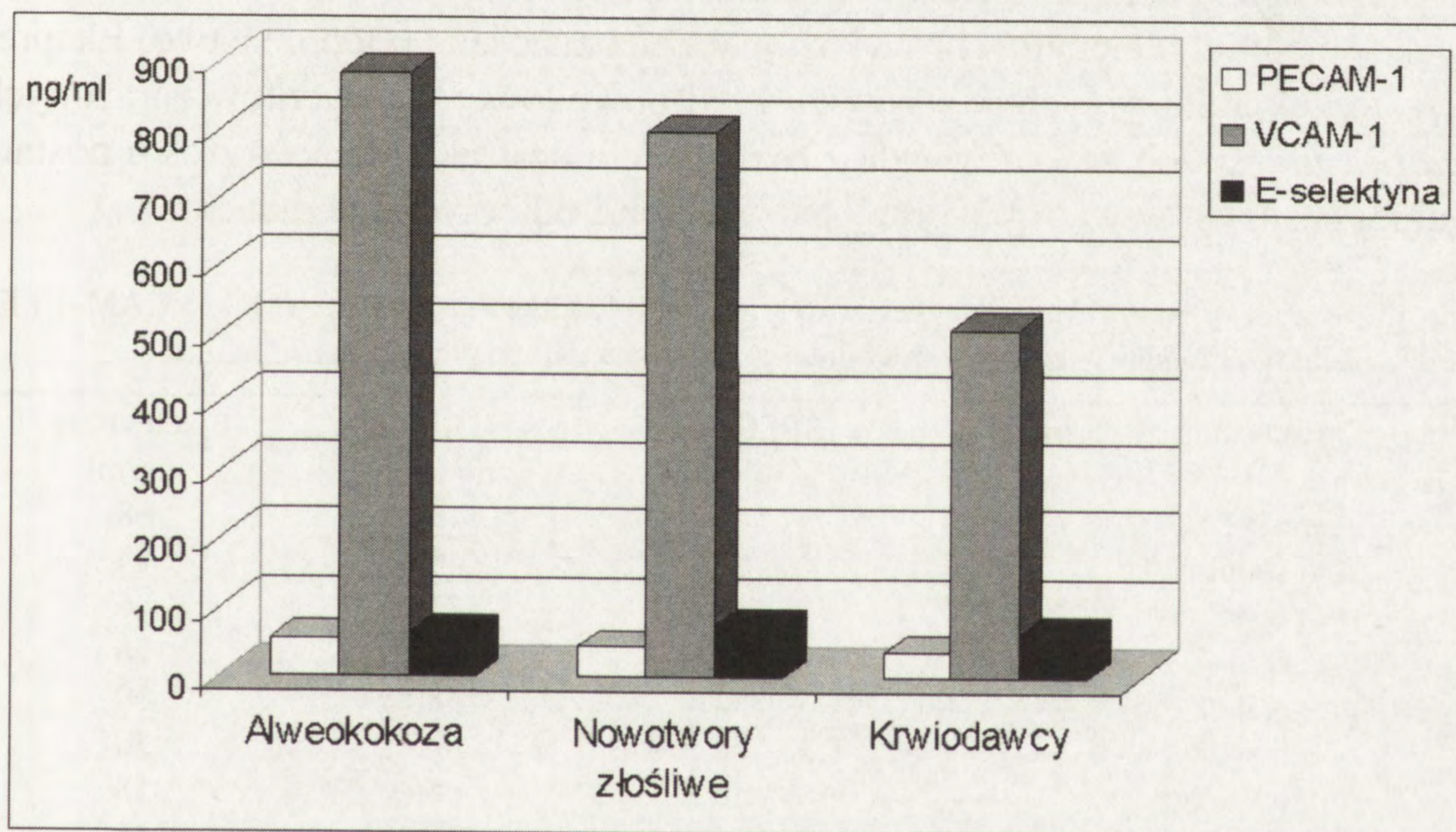
Spośród 8 pacjentów zarażonych *E. multilocularis*, rozległe zmiany obejmujące prawy i lewy płat wątroby wraz z wnęką stwierdzono u 5 osób. U pozostałych 3 pacjentów pasożyt lokalizował się na obwodzie prawego ( $n = 2$ ) lub lewego płata wątroby ( $n = 1$ ) bez naciekania głównych dróg żółciowych, naczyń wątrobowych i żył układu wrotnego. Poszerzenie dróg żółciowych, ich przemieszczenie lub niedrożność zaobserwowano u 5 chorych. Sąsiadujące z wątrobą tkanki i narządy (węzły chłonne okołoaortalne, jama otrzewnowa, przepona, prawa nerka, nadnercze, pęcherz moczowy, moczowody) były włączone w proces chorobowy u 5 osób; u 4 z nich zaobserwowano infiltrację aorty brzusznej, piersiowej lub żyły głównej dolnej, co wiązało się z wysokim ryzykiem powstawania rozsiewu drogą krwiopochodną. U 3 pacjentów zaobserwowano odległe przerzuty: (1) do płuc, (2) do płuc i opłucnej oraz (3) mózgowia i mózdzku z objawami uogólnionych drgawek z utra-



Rys. 1. Liczne przerzuty z towarzyszącym obrzękiem lewej półkuli mózgu w przebiegu bąblowicy wywołanej przez *E. multilocularis*. Obraz tomografii komputerowej, Synerview 600, Picker. (Kolekcja własna)



tą świadomości (Rys. 1). Mimo intensywnego leczenia przeciwpasożytniczego skojarzonego z rozległym zabiegiem chirurgicznym, istotną progresję stanu klinicznego zaobserwowano u 6 spośród 8 chorych (75%), doprowadzającą do zgonu w niedługim czasie u 5 z nich (62,5%). Jeden pacjent zmarł w ciągu 3 miesięcy od zabiegu transplantacji wątroby.



Rys. 2. Średnie wartości stężeń sPECAM-1, sVCAM-1 i sE-selektyny w surowicy krwi obwodowej u pacjentów z inwazją *E. multilocularis*, chorobami nowotworowymi wątroby i przewodu pokarmowego oraz u zdrowych dawców krwi

Wartości sPECAM-1, sVCAM-1 i sE-selektyny we krwi obwodowej u pacjentów zarażonych *E. multilocularis* w zależności od stadium zaawansowania klinicznego zestawiono w Tabeli 1. Średnie stężenia badanych cząsteczek adhezyjnych u pacjentów z bąblowicą wielojamową, chorobami nowotworowymi i u zdrowych krwiodawców przedstawiono na Rys. 2. Wartości stężeń sPECAM-1 okazały się statystycznie znacznie wyższe u pacjentów zarażonych *E. multilocularis*, niż u chorych z nowotworami wątroby i przewodu pokarmowego ( $P = 0,007$ ) oraz w porównaniu do zdrowych dawców krwi ( $P < 0,000001$ ), świadcząc o istotnym ryzyku rozsiewu pasożyta drogą krwiopochodną. Poziomy sVCAM-1 były wyraźnie podwyższone zarówno w surowicach chorych z alweokokozą jak i chorobami nowotworowymi, w porównaniu do osób zdrowych z grupy kontrolnej ( $P = 0,0002$ ). Na uwagę zasługuje fakt niewykazania statystycznie istotnej różnicy między wartościami sVCAM-1 u pacjentów z bąblowicą i nowotworami złośliwymi w obrębie jamy brzusznej ( $P = 0,7$ ). Wartości stężeń sE-selektyny u pacjentów z inwazją *E. multilocularis* i chorobami rozrostowymi były porównywalne ( $P = 0,4$ ). Pacjenci z alweokokozą o przebiegu progresywnym ( $n = 6$ ) wykazywali wyższe stężenia su-



rowiczej PECAM-1 i VCAM-1 w porównaniu do chorych, u których stan kliniczny był stabilny lub uzyskano regresję zmian w wyniku radykalnego zabiegu chirurgicznego (n = 2) (Tabela 1). W obrazach ultrasonograficznych i tomografii komputerowej jamy brzusznej bąblowica wielojamowa może sugerować nowotwór złośliwy wątroby o charakterze pierwotnym lub przerzutowym. Także w badaniach immunodiagnostycznych w kierunku obecności nowoczesnych markerów nowotworowych – molekuł adhezyjnych, wykazywała ona znaczące podobieństwo. Ekspresja cząsteczek adhezyjnych w surowicy krwi obwodowej u pacjentów zarażonych *E. multilocularis* dobrze korelowała z rozległością destrukcyjnego wzrostu postaci larwalnej pasożyta w wątrobie oraz otaczających i odległych narządach.

Tabela 1. Stężenia rozpuszczalnych podjednostek cząsteczek adhezyjnych PECAM-1, VCAM-1 i E-selektyny w surowicy krwi obwodowej pacjentów zarażonych *E. multilocularis*

Pacjent	Ocena stanu klinicznego	SPECAM-1 ng/ml	sVCAM-1 ng/ml	sE-selektyna ng/ml
1.	regresja	44	465	68
2.	stan stabilny	47	440	44
3.	progresja	52	710	46
4.	progresja/zgon	73	1100	76
5.	progresja/zgon	57	480	60
6.	progresja/zgon	60	805	30
7.	progresja/zgon	56	686	58
8.	progresja/zgon	57	2390	134

Zastosowanie cząsteczek adhezyjnych, biorących udział w migracji komórek poprzez śródbłonek naczyń krwionośnych, w ocenie obrazu klinicznego pacjentów z chorobami nowotworowymi było już wielokrotnie podkreślane przez innych autorów. Jednakże możliwość wykorzystania rozpuszczalnych molekuł PECAM-1, VCAM-1 oraz E-selektyny dla oceny stopnia zaawansowania alweokokozy, ustalenia rokowania klinicznego i dodatkowych wskazań do podjęcia bardziej radykalnego leczenia chirurgicznego lub stałej chemioterapii albendazolem nie była nigdy dotąd dyskutowana.

Wysokie poziomy sVCAM-1 i endotelialnej selektyny, które korelowały ze stężeniami antygenu karcynoembrionalnego zaobserwowano u chorych z rakiem jelita grubego, szczególnie w przypadkach odległych przerzutów do wątroby i płuc (Roselli i wsp. 2003). VCAM-1 i E-selektyna wskazywały na progresję zmiany nowotworowej z tendencją do tworzenia przerzutów i okazały się istotnymi markerami prognostycznymi, dotyczącymi długości przeżycia pacjentów z rakiem żołądka (Alexiou i wsp. 2003). Podobnie udokumentowano znaczącą rolę VCAM-1 w patogenezie raka trzustki (Tempia-Caliera i wsp. 2002). Natomiast u pacjentów z rakiem nerki, pęcherza moczowego lub prostaty, stężenia surowiczej VCAM-1 nie wykazywały istotnej różnicy u chorych z pojedynczym ogniskiem przerzutowym i mnogimi przerzutami, mając ograniczoną wartość w ocenie stopnia zaawansowa-



nia nowotworu (Perabo i wsp. 2001). Zastosowanie cząstek adhezyjnych jako markerów oceny stanu klinicznego chorych z pierwotnymi i przerzutowymi nowotworami wątroby wydaje się w chwili obecnej uzasadnione.

#### WNIOSKI

(1) Cząsteczki adhezyjne sPECAM-1, sVCAM-1 i sE-selektyna okazały się niezwykle przydatne dla lepszej oceny klinicznej pacjentów z alweokokozą, jako wczesne wykładniki aktywnej fazy choroby przebiegającej z ryzykiem naciekania otaczających tkanek i rozsiewu pasożyta drogą krwiopochodną.

(2) Wysokie stężenia sPECAM-1 wyraźnie korelowały z progresją stanu klinicznego pacjentów z inwazją *E. multilocularis*, obecnością odległych przerzutów do płuc i ośrodkowego układu nerwowego oraz złą prognozą dla tych chorych.

#### LITERATURA

- Alexiou D., Karayiannakis A.J., Syrigos K.N., Zbar A., Sekara E., Michail P., Rosenberg T., Diamantis T. 2003. Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *American Journal of Gastroenterology* 98: 478-485.
- Gawor J., Malczewski A., Rocki B. 2004. *Echinococcus multilocularis* – niebezpieczny dla człowieka tasiemiec lisów rudych (*Vulpes vulpes*). *Medycyna Weterynaryjna* 60: 349-351.
- Pawłowski Z.S., Eckert J., Vuitton D.A., Ammann R.W., Kern P., Craig P.S., Dar K.F., De Rosa F., Filice C., Gottstein B., Grimm F., Macpherson C.N.L., Sato N., Todorov T., Uchino J., von Sinner W., Wen H. 2001. Echinococcosis in humans: clinical aspects, diagnosis and treatment. In: *WHO/OIE manual on echinococcosis and animals: a public health problem of global concern*. (Eds. J. Eckert, M.A. Gemmell, F.X. Meslin, Z.S. Pawłowski). World Organisation for Animal Health and World Health Organization, Paris: 20-71.
- Perabo F., Sharma S., Gierer R., Wirger A., Fimmers R., Steiner G., Adam M., Schultze-Seemann W. 2001. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and E-selectin in urological malignancies. *Indian Journal of Cancer* 38: 1-7.
- Roselli M., Guadagni F., Martini F., Spila A., Mariotti S., D'Alessandro R., Aloe S., Gazzaniga P.P., Basili S., Cosimelli M., Ferroni P. 2003. Association between serum carcinoembryonic antigen and endothelial cell adhesion molecules in colorectal cancer. *Oncology* 65: 132-138.
- Stefaniak J. 2002. Alweokokoza wątroby. *Medycyna po Dyplomie* 11: 236-243.
- Tempia-Caliera A.A., Horvath L.Z., Zimmermann A., Tihanyi T.T., Korc M., Friess H., Buchler M.W. 2002. *Journal of Surgical Oncology* 79: 93-100.