

ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ ORIGINAL ARTICLES

ФЕКАЛЕН КАЛПРОТЕКТИН ПРИ ПАЦИЕНТИ С ХРОНИЧНИ ВЪЗПАЛИТЕЛНИ ЧРЕВНИ ЗАБОЛЯВАНИЯ И СТАВНО ЗАСЯГАНЕ

Цв. Великова¹, Р. Шумналиева², Ек. Иванова-Тодорова³, З. Спасова⁴,
Д. Кюркчиев³, И. Алтънкова¹ и С. Монов²

¹Клинична имунология, УБ „Лозенец“, МФ, СУ – София

²Клиника по ревматология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, МУ – София

³Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“,

Катедра по Клинична лаборатория и клинична имунология, МУ – София

⁴Клиника по гастроентерология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“, МУ – София

FECAL CALPROTECTIN IN PATIENTS WITH CHRONIC INFLAMMATORY BOWEL DISEASE AND JOINT INVOLVEMENT

Ts. Velikova¹, R. Shumnalineva², Ek. Ivanova-Todorova³, Z. Spasova⁴,
D. Kyurkchiev³, I. Altankova¹ and S. Monov²

¹Clinical Immunology, University Hospital "Lozenetz", Medical Faculty, Sofia University – Sofia

²Clinic of Rheumatology, University Hospital "Sv. Ivan Rilski", Medical University – Sofia

³Laboratory of Clinical Immunology, University Hospital "Sv. Ivan Rilski",

Department of Clinical Laboratory and Clinical Immunology, Medical University – Sofia

⁴Clinic of Gastroenterology, University Hospital "Sv. Ivan Rilski", Medical University – Sofia

Резюме:

Въведение. Хроничните възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ) – болест на Крон (БК) и улцерозен колит (УК), засягат основно млади хора и често водят до тяхното инвалидизиране. Нерядко ХВЧЗ дебютират със своите извънчревни прояви и/или усложнения (ставно, кожно, очно засягане и други). Фекалният калпротектин (ФК), като основен протеин в цитозола на неутрофилите, е с доказана роля като маркер за интестинално възпаление през последните години и може да бъде много полезен при диагностиката и проследяването на болните с ХВЧЗ. Любопитни са и данните, които разкриват ролята на калпротектина в патогенезата на някои ревматични заболявания, като прогресивна системна склероза, ревматоиден артрит, спондилоартропатии и др. *Целта* на настоящото изследване бе да се проследят нивата на ФК при болни с ХВЧЗ и ставно засягане. *Материал и методи.* В изследването бяха включени 49 болни с ХВЧЗ (25 пациенти с УК и 24 – с БК) на средна възраст 41 ± 14 год., от които със ставно засягане (артралгия/артрит) – 6 (12.2%) пациенти – четирима с УК и двама с БК. Преобладаващата част от пациентите (79.6%) бяха в стадий на активност при изследването, определена по индексите за БК и УК. Като контролна група здрави лица са изследвани 20 доброволци, съответстващи на болните по възраст и пол. Калпротектинът е изследван във фекална проба чрез имуноензимен метод. *Резултати.* Получената средна стойност за ФК при изследваните пациенти с ХВЧЗ (503.85 mg/kg) беше сигнификантно по-висока от средното ниво при здравите контроли – 4.83 mg/kg ($p < 0.001$). В групата на пациентите с БК се установиха по-високи нива на ФК в сравнение с тези при УК, но разликата не беше сигнификантна (съотв. – 622 mg/kg и 402 mg/kg, $p > 0.05$). При пациентите с ХВЧЗ и придружаваща ставна симптоматика установихме леко завишени нива на ФК спрямо пациентите без засягане на ставите, но разликата не беше значима (505.5 mg/kg срещу 496.4 mg/kg, $p = 0.974$). *Заключение.* Резултатите от проведените

<p>Ключови думи:</p> <p>Адрес за кореспонденция:</p>	<p>изследвания потвърждават ролята на ФК като маркер за интестинално възпаление при болните с ХВЧЗ. Въпреки че не установихме сигнификантни разлики в нивата на ФК при болни със и без ставно засягане поради възможното комбиниране на ставно и гастроинтестинално заболяване, тестването на ФК може да бъде от полза за откриването на тези болни.</p> <p>фекален калпротектин, болест на Крон, улцерозен колит, артралгия, артрит</p> <p><i>Д-р Цветелина Великова, дм, e-mail: ts_velikova@abv.bg</i></p>
<p>Abstract:</p> <p>Key words:</p> <p>Address for correspondence:</p>	<p><i>Introduction.</i> Chronic inflammatory bowel diseases (IBD), which are comprised of Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), mainly affect young people and often lead to their disability. Nevertheless, IBD may debut with its extra-intestinal manifestations and/or complications (i.e., joint, skin, eye involvement). Fecal calprotectin (FC) as the main protein in the cytosol of neutrophils has proven its role as a marker of intestinal inflammation in recent years and can be very useful in the diagnosis and monitoring of patients with IBD. Interesting are also data showing the role of calprotectin in the pathogenesis of some rheumatic diseases such as progressive systemic sclerosis, rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies, and others. <i>Aim.</i> The purpose of this study was to determine the levels of FC in patients with IBD and joint involvement. <i>Material and methods.</i> The study included 49 patients with IBD (25 patients with CD and 24 – with UC) at mean age 41 ± 14 years, six (12.2%) with joint involvement (arthralgia/arthritis) – four with CD and two with UC. The majority of patients (79.6%) were in the stage of activity according to corresponding indexes for activity for CD and UC. Twenty sex- and age-matched healthy persons were examined as a control group. FC was evaluated in stool sample by means of enzyme immunoassay. <i>Results.</i> We found that the average level of FC in the IBD group (503.85 mg/kg) was significantly higher than in the control group (4.83 mg/kg) ($p < 0.001$). Patients with CD showed elevated FC compared to UC patients; however, this finding did not reach significance (622 mg/kg vs. 402 mg/kg). Comparing IBD patients with joint involvement vs. those without, we observed a tendency for higher FC level in the former group (505.5 mg/kg vs. 496.4 mg/kg, $p = 0.974$). <i>Conclusion.</i> The results of this study confirm the role of the FC as a marker of intestinal inflammation in patients with IBD. Although we did not find significant differences in the levels of FC in IBD patients with and without joint involvement, due to a possible combination of joint and gastrointestinal diseases, testing of FC may be helpful in detecting this subset of patients.</p> <p>fecal calprotectin, Crohn's disease, ulcerative colitis, arthralgia, arthritis</p> <p><i>Tsvetelina Velikova, MD, e-mail: ts_velikova@abv.bg</i></p>

ВЪВЕДЕНИЕ

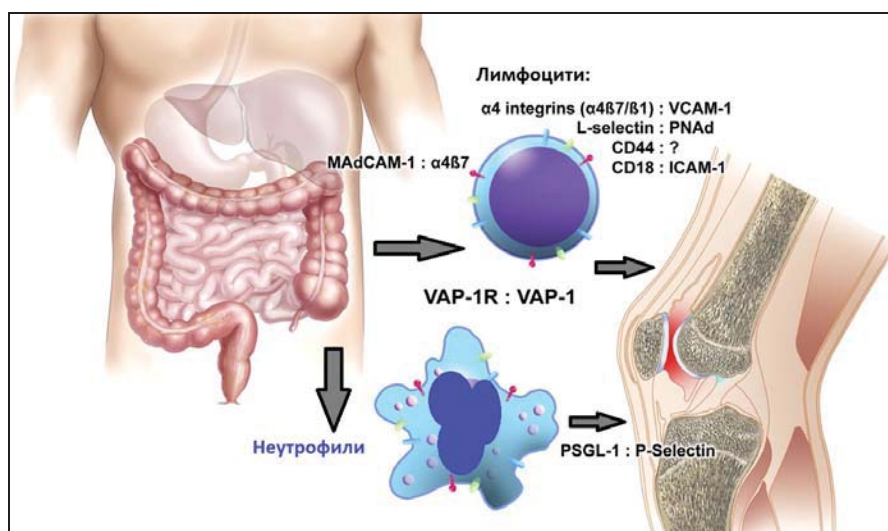
Хроничните възпалителни чревни заболявания (ХВЧЗ), включващи основно болест на Крон (БК) и улцерозен колит (УК), засягат предимно млади хора и често водят до тяхното инвалидизиране [1]. Клиничната картина се характеризира с повтарящи се епизоди на обостряне и ремисия, продиктувани от хроничното чревно възпаление. Нерядко ХВЧЗ дебютират със своите извънчревни прояви и/или усложнения, напр. ставно, кожно, очно засягане и други [1]. Твърди се, че в патогенезата на тези екстраинтестинални прояви роля играят същите ключови елементи, които дирижират и чревното възпаление. Коментира се участието на компоненти на вродения и придобития имунитет, с най-интензивно

проучване в последните години на неутрофили-те, Т-хелперните лимфоцити (Th1, Th2, Th17, и др.), техните цитокини и други [2, 3].

Артропатиите са основен клиничен проблем при пациентите с ХВЧЗ. Те са и най-често срещаните извънчревни прояви, засягащи до 30% от пациентите с УК и БК [4]. Според други проучвания обаче, артритът е отделна клинична единица [5]. Обикновено е трудно да се контролират ставните симптоми с противовъзпалителните средства, използвани за лечение на ХВЧЗ [4]. Патофизиологичните механизми, водещи до артропатия, свързана с ХВЧЗ, все още остават неизвестни, но научният интерес към тях расте, поради това че причиняват значителна заболяемост и увреждане. При нормално състояние наивните лимфо-

цити мигрират непрекъснато от кръвта в лимфоидните тъкани на червата (напр. пайеровите плаки) в търсене на техните специфични антигени. Това мигриране се регулира от експресията на множество адхезионни молекули и хемокини като $\alpha 4\beta 7$ интегрин, MAdCAM-1, VAP-1, CD44, VCAM-1, CD18, ICAM-1, L-селектини, PNA_d, PSGL-1 и др. (фиг. 1). Активирани в лимфоидните структури на лигавицата на червата, лимфоцитите, макрофагите и неутрофилите рециркулират и имат способността да се заселят във вилозния епител на му-

козата, където упражняват своите ефекторни функции – промени в мукозната мускулатура, вазодилатация, хиперемия и повишена пропускливост на съдовата стена, привличане на допълнителни възпалителни клетки, които освобождават различни възпалителни медиатори. В зависимост от типа експресирани адхезионни молекули върху имунните клетки и т.нар. „адресини“ в ендотела/тъканите, активираните клетки могат да навлязат и в ставите, кожата и т.н., което да доведе до изява на извънчревни прояви на ХВЧЗ [4].



Фиг. 1. Взаимовръзка между чревното и ставното възпаление при пациенти с ХВЧЗ и артропатия (адаптирана от Brakenhoff et al., Gut 2011)

Освен недостиг на диагностични маркери, което бави поставянето на диагнозата ХВЧЗ с до 2-4 години в световен мащаб, липсват и достатъчно проучвания за подходящи за проследяване на болестта или ефекта от терапията биомаркери. На този фон фекалният калпротектин (ФК), като основен протеин в цитозола на неутрофилите, е с доказана роля като маркер за интестинално възпаление през последните години и може да бъде много полезен при диагностиката и проследяването на болните с ХВЧЗ [6-8]. При остро възпаление той се секретира от неутрофилите и може да бъде установен както в чревното съдържимо, така и в телесните течности (серум, ставна течност, перитонеален дренаж и т.н.) [9]. Интересни са и данните, които показват ролята на калпротектина в патогенезата на някои ревматични заболявания, като прогресивна системна склероза, ревматоиден артрит, някои спондилоартропатии и други [10-12].

Целта на настоящото изследване бе да се проследят нивата на ФК във фецес при болни с ХВЧЗ (УК и БК) и да установим дали има разлики в нивата на ФК при болните със и без ставно засягане.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Лица, включени в изследването

В изследването бяха включени 49 болни с доказано ХВЧЗ, приети в Клиниката по гастроентерология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ – София. Преобладаващата част от пациентите (79.6%) бяха в стадий на активност при изследването, определена по съответните индекси за БК (CDAI – Crohn's disease activity index) и УК (Mayo score).

При шест (12.2%) от пациентите с ХВЧЗ беше установено и ставно засягане (артралгия/артрит). Освен клиничното изследване бяха използвани рентгенография на симптоматичните стави, вкл. сакроилиачни, както и ултрасонографско изследване на периферните стави, вкл. чрез power-Doppler методика за оценка на степента и активността на синовиата. От тези шест пациенти четирима бяха с УК и двама – с БК. Всички болни със ставно засягане бяха в стадий на активна ХВЧЗ.

Като контролна група здрави лица са изследвани 20 доброволци, съответни по възраст и пол на болните.

По-подробни характеристики на болните и здравите лица са представени на табл. 1.

Таблица 1. Демографски характеристики на включените в проучването лица

		Пациенти с ХВЧЗ	Здрави лица
Брой (%)		49	20
	Пациенти с БК	24 (48.9)	–
	Пациенти с УК	25 (51.1)	–
Възраст, години		41 ± 14	37 ± 9
Пол, брой (%)	Мъже	17 (34.7)	7 (35.0)
	Жени	32 (65.3)	13 (65.0)
Активност на болестта, брой (%)	Стадий на активност	39 (79.6)	–
	Ремисия	10 (20.4)	–
Ставно засягане, брой (%)	Наличие на ставно засягане	6 (12.2)	–
	Липса на ставно засягане	43 (87.8)	–

Всички лица бяха информирани за целите на проучването и подписаха информирано съгласие преди включването си в него. Изследването беше одобрено от Етичните комисии към УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ и МУ – София.

Имуноензимно изследване

Калпротектинът беше изследван във фекална проба чрез имуноензимен метод при cut-off 50 mg/kg (RIDASCREEN Calprotectin ELISA, R-Biopharm, Germany). Фекалните проби бяха обработвани съгласно протоколите за екстрахиране, приложени в кита, непосредствено при пристигането си в лабораторията. Получените супернатанти бяха съхранени на -80°C до изследването. Имуноензимното определяне на ФК беше извършено в Лаборатория по клинична имунология, УМБАЛ „Св. Иван Рилски“ при стриктно спазване инструкциите на производителя.

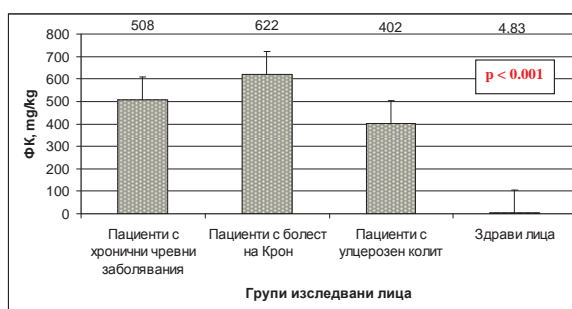
Статистически методи

Данните бяха обработени статистически с помощта на SPSS v.19 (IBM), като за ниво на сигнификантност беше избрано $p < 0.05$.

РЕЗУЛТАТИ

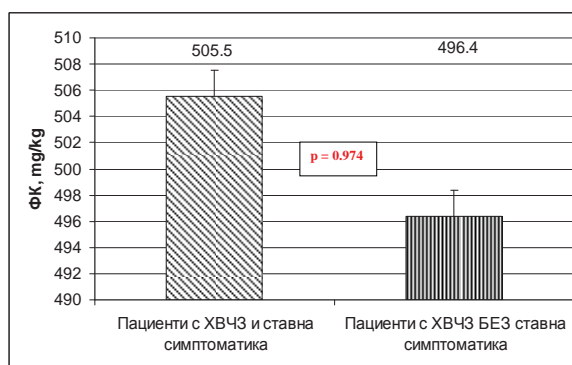
Средната стойност за ФК при пациентите с ХВЧЗ (503.85 mg/kg) беше сигнификантно по-висока от средната при здравите контроли – 4.83 mg/kg ($p < 0.001$) (фиг. 2). В групата на пациентите с БК установихме по-високи нива на ФК в сравнение с тези при УК, но разликата не беше оценена като сигнификантна (622 mg/kg и 402 mg/kg, съответно) (фиг. 2).

Беше установена умерено силна позитивна корелация между нивата на ФК и активността на заболяването при ХВЧЗ, измерена със съответните индекси ($r = 0.773$, $p = 0.042$).



Фиг. 2. Стойности на фекален калпротектин, измерени при пациенти с ХВЧЗ, БК и УК, и здрави лица

При пациентите с ХВЧЗ и придружаваща ставна симптоматика установихме леко повишени нива на ФК спрямо пациентите без засягане на ставите, но разликата не беше значима (505.5 mg/kg срещу 496.4 mg/kg, $p = 0.974$) (фиг. 3).



Фиг. 3. Нива на фекален калпротектин, измерен при пациенти с ХВЧЗ със или без ставна симптоматика

Обсъждане

Получените от нас данни за значимо повишение на ФК при болните с ХВЧЗ са в потвърждение на предишни резултати от наши и други проучвания [3, 13, 14]. Същото се отнася и за установената корелация между болестната активност и нивата на ФК [15, 16]. Трябва да се има предвид, че ФК е изследван във фекални

проби, т.е. едно повишаване на стойностите е обвързано с наличието и със степента на възпаление в гастроинтестиналния тракт. Това донякъде може да обясни негативния резултат, който получихме по отношение на нивата на ФК при пациенти със и без ставно засягане – нямаше статистически значима разлика между тях (505.5 mg/kg срещу 496.4 mg/kg, $p = 0.974$). Поточно, ставното възпаление, ако има такова, би могло да се оцени чрез изследване на нивата на калпротектин в ставна течност. Нашите очаквания бяха свързани с хипотезата, че ако нивата на ФК са повишени при наличие на интестинално възпаление, то калпротектинът да е повишен и в серумите на болните, както и в синовиалните течности и тъкани, при наличие на неутрофилно възпаление локално. Може да се спекулира, че рядко локалното възпаление дава огледално отражение в периферията, където би било най-лесно проследимо. Като бъдеща задача си поставяме да изследваме нивата на калпротектин в подходяща кохорта от пациенти както в ставна течност, така и в циркулацията.

Редица други изследователи също са проучвали възможностите на ФК да бъде използван като безопасен и неинвазивен тест за оценка на субклинично възпаление на червата при пациенти с артрит, включително и при деца [17]. Нещо повече, някои автори са установили корелация между нивата на калпротектин и рентгенографските промени при пациенти с псориаатичен артрит, докато корелация с болестната активност е липсвала [12]. Други автори са установили асоциации с CRP ($r = 0.67$), скоростта на седиментация на еритроцитите ($r = 0.28$, $p < 0.05$), активността на заболяването ($r = 0.57$) и броя на подути стави ($r = 0.48$) [18]. Нивото на калпротектин на изходно ниво обаче не е било предсказващо за рентгенографско или функционално увреждане пет години по-късно [19, 20]. Други автори установяват, че нивата на калпротектин намаляват след провеждане на лечение при псориаатичен артрит [12]. Липсват данни обаче за такива асоциации при артропатия, асоциирана с ХВЧЗ.

Това проучване има няколко ограничения. Размерът на извадката е сравнително малък, а ставно засягане е установено при 12.2% от болните, докато по литературни данни то се наблюдава при до една трета от пациентите. Това разминаване също може да е една от причините да не получим статистически значима разлика в нивата на ФК. Основното значение на това изследване е, че може да се използва за установяване на чревно засягане при пациенти от контингента на ревматологичната практика. Нещо повече, поради възможността гастроинтести-

нална патология да се съчетае с ревматологична, тестът може да бъде полезен и в двете клинични практики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Резултатите от проведените изследвания потвърждават ролята на ФК като маркер за интестинално възпаление при болните с ХВЧЗ. Въпреки че не установихме значими разлики в нивата на ФК при болни със и без ставно засягане, поради възможното комбиниране на ставно и гастроинтестинално заболяване, тестването на ФК може да бъде от полза за откриването на тези болни.

Благодарности

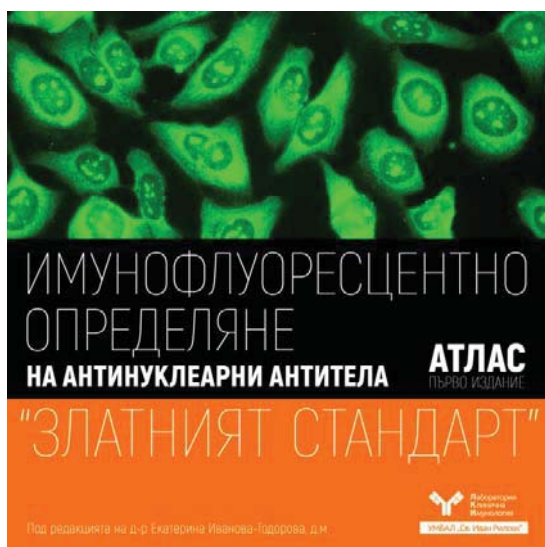
Изследванията бяха осъществени с финансовата подкрепа на Медицински университет – София, по научен проект с Договор № 53/2011.

Библиография

- Perkhorst LM, Imhann F, Festen EA on behalf of the Parelinoer Institute (PSI) and the Dutch Initiative on Crohn and Colitis (ICC), et al. Cohort profile: design and first results of the Dutch IBD Biobank: a prospective, nationwide biobank of patients with inflammatory bowel disease. *BMJ Open*, 2017, 7:e016695.
- Matsuda R, Koide T, Tokoro C et al. Quantitative cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naïve ulcerative colitis during active and quiescent disease. *Inflamm Bowel Dis*, 2009, 15(3):328-34.
- Великова ЦВ. Проучване на имунологични параметри, характеризиращи чревното възпаление, с оглед внедряване на нови показатели за диагноза и следене на клиничния ход при хронични възпалителни чревни заболявания. Дисертация 2014. МУ – София.
- Brakenhoff LKPM, van der Heijde DM et Hommes DW. IBD and arthropathies: a practical approach to its diagnosis and management. *Gut*, 2011, 60:1426-1435.
- Ford DK, Vallis DG. The clinical course of arthritis associated with ulcerative colitis and regional ileitis. *Arthritis Rheum*, 1959, 2:526-36.
- Paduchova Z, Durackova Z. Fecal calprotectin as a promising marker of inflammatory diseases. *Bratisl Lek Listy*, 2009, 110(10):598-602.
- Striz I et Trebichavsk'y I. Calprotectin – a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation. *Physiological Research*, 2004, 53(3):245-253.
- Costa F, Mumolo MG, Bellini M et al. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *Dig Liver Dis*, 2003, 35(9):642-7.
- Leach ST, Yang Y, Messina I et al. Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin S100A8/S100A9 and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2007, 42(11):1321-1331.
- Foell D et Roth J. Proinflammatory S100 proteins in arthritis and autoimmune disease. *Arthritis and Rheumatism*, 2004, 50(12):3762-3771.

11. Andréasson et al. Faecal levels of calprotectin in systemic sclerosis are stable over time and are higher compared to primary Sjögren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 2014, 16:1-9.
12. Hansson C et al. S-Calprotectin (S100A8/S100A9): A Potential Marker of Inflammation in Patients with Psoriatic Arthritis. *J Immunol Res*, 2014, 2014:1-5.
13. Manz M, Burri E, Rothen C et al. Value of fecal calprotectin in the evaluation of patients with abdominal discomfort: an observational study. *BMC Gastroenterol*, 2012, 12:5.
14. Gisbert JP, McNicholl AG: Questions and answers on the role of faecal calprotectin as a biological marker in inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis*, 2009, 41:56-66.
15. Tibble JA, Bjarnason I. Fecal calprotectin as an index of intestinal inflammation. *Drugs Today (Barc)*, 2001, 37:85-96.
16. Mao R, Xiao YL, Gao X et al. Fecal calprotectin in predicting relapse of inflammatory bowel diseases: a meta-analysis of prospective studies. *Inflamm Bowel Dis*, 2012, 18:1894-1899.
17. Madland T et al. Leukocyte protein calprotectin and outcome in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol*, 2002, 31(6):351-354.
18. Garcia-Arias M et al. Calprotectin in Rheumatoid Arthritis: Relation with Disease Activity in a Transversal and Longitudinal Study. [abstract]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63 (Suppl. 10):355.
19. Turina M et al. Calprotectin serum level is an independent marker for radiographic spinal progression in axial spondyloarthritis. *Annals of rheumatic diseases*, 2014, 73(9): 1746-1748.
20. Stoll M et al. Fecal calprotectin in children with the enthesitis-related arthritis subtype of juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol*, 2011, 38(10):2274-2275.

Постъпила за печат на 27 февруари 2018 г.



**ИМУНОФЛУОРЕСЦЕНТНО ОПРЕДЕЛЯНЕ
НА АНТИНУКЛЕАРНИ АНТИТЕЛА –
„ЗЛАТНИЯТ СТАНДАРТ“
АТЛАС**

Под редакцията
на д-р Екатерина Иванова-Тодорова, д-м

Централна медицинска библиотека,
Медицински университет – София, 2018 г., 116 с.

Това първо издание със заглавие „Имунофлуоресцентно определяне на антинуклеарни антитела – „златният стандарт“ е предназначено за специалисти по имунология с интереси в разпознаването и интерпретацията на специфични имунофлуоресцентни образи на HEp-2 клетки, както и за клинични специалисти по ревматология, гастроентерология и

онкология относно клиничната релевантност на образите.

Създаването на Атласа се базира върху схващането, че истинското знание се състои не в събирането и съхранението на флуоресцентни образи, а в използването им и в опитите за тълкуването им, което ще доведе до по-голяма възможност за прецизна диагностика при пациенти с различни аутоимунни заболявания.

Имунофлуоресцентно определяне на антинуклеарни антитела – „златният стандарт“ може да изтеглите безплатно на адрес: ivd.bg/atlas/