

СУРОГАТНИ МАРКЕРИ НА ЧРЕВНОТО ВЪЗПАЛЕНИЕ – ФЕКАЛЕН КАЛПРОТЕКТИН

В. Наков

*Клиничен център по гастроентерология, УМБАЛ „Царица Йоанна“ – ИСУЛ,
Медицински университет – София*

SURROGATE MARKERS OF INTESTINAL INFLAMMATION – FECAL CALPROTECTIN

V. Nakov

*Clinical Centre of Gastroenterology, University Hospital “Tsaritsa Yoanna” – ISUL,
Medical University – Sofia*

Резюме: *Диагностиката, оценката и проследяването на чревното възпаление създават редица трудности в гастроентерологичната практика. Това в най-голяма степен важи за случаите, при които е засегнато тънкото черво, поради факта, че ентероскопията все още не е общодостъпен метод. По тази причина в диагностичната практика са предлагани и въведени редица изследвания и методи, имащи претенциите да се явяват като сурогатни маркери, заместващи златния стандарт в диагностиката на чревното възпаление – ендоскопия с биопсия. В предлагания научен обзор се разглеждат предимствата и недостатъците на тези маркери. Особено внимание се отделя на фекалния калпротектин поради факта, че през последните години изследването се наложи в световен мащаб като основен неинвазивен маркер за диагностика, оценка и проследяване на чревното възпаление.*

Ключови думи: *чревно възпаление, сурогатни маркери, фекален калпротектин*

Адрес за кореспонденция: *Д-р Венцислав Наков, дм, Клиничен център по гастроентерология, УМБАЛ „Царица Йоанна“ – ИСУЛ, ул. “Бяло море” № 8, 1521 София, GSM: 0898 677172, e-mail: dr.nakov1962@abv.bg*

История на статията: *получена: 21.06.2012 г.*

одобрена: 10.10.2012 г.

Summary: *Diagnosis, examination and monitoring of intestinal inflammation create many problems in gastroenterological practice. This is really noticeable in cases where the small intestine is affected, because enteroscopy is not yet generally available. For this reason, a number of studies and methods, acting as surrogate markers, replacing the “gold standard” in the diagnosis of intestinal inflammation (endoscopy with biopsy) are implemented in the practice. In the proposed scientific review the author examines the advantages and disadvantages of these markers. Special attention is paid to fecal calprotectin, because recently its assessment has become the main non-invasive marker for diagnosis, examination and monitoring of intestinal inflammation worldwide.*

Key words: *intestinal inflammation, surrogate markers, fecal calprotectin*

Address for correspondences: *Ventsislav Nakov, MD, PhD, Clinical Center of Gastroenterology, University Hospital “Tsaritsa Yoanna” – ISUL, 8 Bialo more Str., Sofia 1527, Bulgaria. Tel.: +359 898677172; Fax: +359 2-9432103; e-mail: dr.nakov1962@abv.bg*

Article history: *received: 21.06.2012*

accepted: 10.10.2012

Въпреки безспорните успехи в диагностиката на чревните заболявания и в частност чревното възпаление през последните години, редица случаи все още остават проблематични. И към днешна дата диагностиката и проследяването на чревното възпаление са истинско предизвикателство за лекарите [21]. Това в най-голяма степен важи в случаите на засягане на тънкото черво, което не може да бъде изследвано със стандартно ендоскопско оборудване.

Настоящият златен стандарт за оценяване на интестиналното възпаление като място, разпространение и тежест е ендоскопията с биопсия [19]. Тази процедура обаче е инвазивна, крие немалко рискове и може да доведе до усложнения [25]. Ендоскопията може да е болезнена и това налага много често да се извършва в условията на обща анестезия, която от своя страна също крие рискове за пациента [28]. Подготовката за долна ендоскопия по принцип е неприятна за изследвания, а при някои съпътстващи заболявания и тя носи своите рискове и странични ефекти. Въвеждането в клиничната практика на ентероскопията подобри много диагностиката на тънкочревните заболявания. Тя обаче е трудно осъществима, продължителна, обременяваща за пациента и изследователите, а и все още не е широко достъпна в редица страни. Капсулната ендоскопия се понася по-лесно от пациентите, но нейната информативност невинаги е достатъчна, а освен това изследването е доста скъпо и трудоемко за лекарския екип.

Широко използваните в диагностичната практика изследвания – СУЕ, левкоцити, тромбоцити, С-реактивен протеин, са нискокчувствителни и несигурни за чревното възпаление, а и не рефлектират адекватно на болестната активност [22, 40]. Образни изследвания като ултразвук, компютърна томография, ядрено-магнитен резонанс, ентероклиза и иригография могат да са полезни при локализиране на интестиналното възпаление, но някои от тях са скъпи, сензитивността и/или специфичността им са субоптимални, при част от тях пациентът е изложен на йонизираща радиация [28].

С оглед оптимизиране на диагностиката и проследяването на чревното възпаление в диагностичната практика са въведени и редица други тестове и методи – изследване на чревен пермеабилитет, радиоактивна левкоцитна клетъчна екскреция (маркирани със 111-индий левкоцити) и др. Увеличаването на интестиналния пермеабилитет може да бъде сурогатен маркер на възпалението. Редица автори предлагат използването му и като предиктор на релапсите при възпалителните чревни заболявания. С относително до-

бра чувствителност (81%) и специфичност (73%) това изследване представлява съществено усъвършенстване в сравнение с неспецифичните маркери [38]. Увеличаването на интестиналния пермеабилитет обаче се установява в сравнително нисък процент при пациенти с улцерозен колит и болест на Крон [1]. Изследването създава и някои неудобства на пациента и не се използва широко в рутинната практика. Един от най-точните и добри начини за локализиране на интестиналния възпалителен процес и оценка на неговата тежест е 111-индий левкоцитното сканиране и количеството на индий-свързаните левкоцити във фекалиите [30, 36]. Обаче излагането на радиация, четиридневното събиране на изпражнения и високата цена правят този метод неподходящ за амбулаторно изследване. Още повече че това изследване (макар и широко цитирано) се извършва само в няколко центъра в света.

В търсенето на нови, по-достъпни, евтини и достатъчно информативни тестове за диагноза и оценяване на чревното възпаление през последните години на 20-и век все по-широко място се отделя на биологично активните маркери [9]. Биомаркерите могат да се разделят на групи според общите им свойства – например антитела, цитокини, адхезионни молекули, левкоцитни протеини и др. Някои биомаркери могат да отразяват болестната активност чрез увеличаване или намаляване на концентрацията им. Други са полезни в диференциалната диагноза, но не са подходящи за мониториране. Идеалният биомаркер трябва да е лесно приложим за рутинни клинични цели, да е стабилен в кръв или фецес, да се променя в зависимост от тежестта на болестта и да се нормализира след възстановяване или след успешна терапия [23].

Възпалението се характеризира с миграция и активиране на редица клетки към мястото на инфекцията или тъканната увреда. Водещо място сред тях заемат неутрофилните гранулоцити. При възпаление на чревната стена те мигрират към и през нея и попадат във фекалиите. Това се отнася и за наличните в тях, както и за секретираниите извън тях протеини. Откриването и количественото определяне на тези протеини ги прави много подходящи биомаркери за доказване, количествено оценяване и проследяване на чревното възпаление. Тези маркери включват калпротектин, лактоферин, полиморфонуклеарна еластаза, миелопероксидаза и др. [8, 18, 25, 26]. Сред тях най-голямо приложение в клиничната практика намират изследванията на фекалния лактоферин и фекалния калпротектин.

КАЛПРОТЕКТИН

Калпротектинът (КП) е изолиран за пръв път през 1980 г. от Магне Фагерхол и първоначално е наречен L1 протеин. Името калпротектин произлиза от факта, че е свързан с калций и има антимикробни свойства. Той е белтък, тежащ 36 kDa (килодалтона), състоящ се от 1 лека (8 kDa) и две тежки (от по 14 kDa) вериги, които са нековалентно свързани [11]. Спада към групата на S100 протеините. Тези протеини са разтворими в 100% наситен с амониев сулфат разтвор, откъдето идва името им. Тази фамилия от протеини са калций-свързващи. Те регулират нивата на цитозолния калций, действат като буфери или вторични посредници, чрез промяна на тяхната активност, зависеща от калциевата концентрация [10, 31, 32]. Калпротектинът представлява около 60% от цитозолните протеини на неутрофилите. В по-малко количество се съдържа и в моноцитите, някои макрофагеални субтипове (CD 14+), в тъканните еозинофили на илеума и излючващите се епителни клетки, с изключение на тези в нормалната кожа, но не презентира при В- и Т-лимфоцитите. Секретира се екстрацелуларно от клетките по време на клетъчна активация или се освобождава като резултат на клетъчно разрушаване или смърт. По време на микробна инвазия калпротектинът се продуцира и секретира извън епителните клетки [6, 14, 37]. Концентрацията му в колона на здрави индивиди е няколко пъти по-висока отколкото в серума. Това се дължи на два факта. Първо гранулоцитите мигриращи в чревния лумен са подложени на цитолиза с отделяне на КП. Второ – продължителният контакт на интестиналната мукоза с физиологичната бактериална флора активира продукцията на КП от епителните клетки [37]. Калпротектинът е резистентен към колонна бактериална деградация. След свързването му с калции той може да устои на разграждане от левкоцитни и микробни ензими [14].

Калпротектинът е мултипотентна биологично активна молекула [11]. Той има регулаторна роля във възпалителния процес, антипролиферативен капацитет и антимикробни функции срещу бактерии и гъби [15, 33, 35]. Антимикробната активност се дължи най-вече на свойствата му да свързва цинк. Конкурирайки се с различни ензими за ограничени количества цинк, КП може да потисне много цинк-зависещи ензими, в това число и матриксните металопротеинази, и по този начин да убие микроорганизми и други клетки. Тази активност е насочена както към извънклетъчни бактерии, така и към вътреклетъчни бактерии след фагоцитоза [12, 24, 41]. Антимикробната активност на КП изчезва при добавка на цинк [34]. Отделните су-

бединици на молекулата му нямат антимикробна активност. Калпротектинът е силен хемотаксичен фактор за неутрофилите, като увеличава и тяхната фагоцитна способност [37]. Концентрацията му в плазмата се увеличава при болести, свързани с увеличена неутрофилна активност. Калпротектинът е изследван клинично в плазмата и множество телесни течности (включително и в плевралната и синовиалната). Там той е представен в концентрации, пропорционални на нивото на възпаление [6, 17, 37, 40].

Изследването на калпротектина намира най-голямо приложение при чревното възпаление, за чието откриване обичайните методи са най-често инвазивни. Той е способен да идентифицира възпаление на тънкото черво – област, която не е възможно да бъде изследвана със стандартно ендоскопско оборудване. При възпаление на чревната стена гранулоцитите мигрират през нея. По този начин калпротектинът може да бъде открит и във фекалиите. Там той не се разрушава от чревните бактерии и е стабилен до 7 дни [14].

Тези факти засилиха интереса към фекалния калпротектин (ФКП) като маркер при редица възпалителни заболявания на червата, особено от средата на 90-те години, след като беше предложен ELISA тест за изследване на калпротектина във фекалиите. За изследването е необходима еднократна фекална проба от поръдъка на 5 g. Пробите са стабилни до 7 дни при стайна температура, а при необходимост могат да се замразяват за дълъг период [13]. Самото изследване се извършва чрез ELISA метод и е сравнително лесно и евтино. По тази причина в края на 90-те години бяха комерсиализирани тестове на редица фирми. Изследването стана общодостъпно, често използвано и още първите проучвания докладваха, че калпротектинът във фекалиите е сигнификантно повишен при редица чревни заболявания – улцерозен колит, болест на Крон, инфекциозен колит/ентероколит/, дивертикулит, НПВС ентено/коло/патия, колоректален карцином, полипи на червата, радиационен проктит [14, 37]. Интересът към това изследване доведе през последните няколко години и до производството на бързи тестове (включително и количествени), с които в рамките на около 30 min може да се извърши определяне на нивото на фекалния калпротектин, без за това да е необходима специализирана лаборатория. Количествените бързи тестове са базирани на абсорбционен имунохроматографски метод (реакция антиген-антитяло) и са с висока точност, напълно съпоставими с тази на метода ELISA [7]. С тях изследването може да се извърши практически във всеки лекарски кабинет.

Фекалният калпротектин е много чувствителен за изследване на чревното възпаление, но не определя причините за него. Следователно това изследване може да бъде приложено при ситуации, при които трябва да се разграничи интестиналното възпаление от функционалните нарушения и за определяне степента на възпаление, както и за проследяването му по време на лечение на пациенти с улцерозен колит, болест на Крон или други заболявания, при които има чревно възпаление [14].

Изключителен интерес представляват публикуваните през последните години редица проучвания и съобщения, които показват сигнификантно повишени нива на ФКП при болни с колоректален карцином и аденоми [16, 20, 29, 39]. При мултицентрови проучвания сензитивността и специфичността на теста за идентифициране е съответно 80% за рак и 70% за аденомите. Той е много по-чувствителен от теста за окултни кръвоизливи, но е по-малко специфичен – Хемокулт II има сензитивност 40% и специфичност 90% [14]. Като цяло нивата на ФКП при рак са значително по-високи от нормалните. Проучвания докладват, че 90% от болните с КРК имат повишени нива на ФКП, които не са свързани с кръвенето, а най-вероятно отразяват освобождаване от обкръжаващите тумора левкоцити [20, 39]. Нормалните нива на ФКП са сериозен негативен предиктор за дебелочревен рак [14]. Стойностите при аденоми не са толкова високи, но редица проучвания показват сигнификантна разлика със здравите контроли [16, 20, 29, 39]. Все пак има и поучвания, които не докладват такава сигнификантност. До този момент не са правени в световен мащаб големи проучвания за скрининг на колоректален карцином, чрез ФКП в общата популация [14].

Изследването на фекален калпротектин с ELISA е въведено у нас през 2008 г. в Клиниката по гастроентерология на УМБАЛ „Царица Йоанна“ – ИСУЛ, МУ – София, от В. Наков и сътр. Натрупаните към днешна дата факти потвърждават изключителната полезност на изследването при разграничаване на функционалните от органичните чревни заболявания, за диагностика и мониториране на терапията при пациенти с чревно възпаление, в това число и болни с улцерозен колит и болест на Крон, както и за предвиждане на релапс на болестта при тези пациенти. Изследването спомага и за доказване на чревно възпаление при болни, употребяващи продължително време НПВС, както и за диагностиката на дивертикулно възпаление при пациенти с дивертикулна болест на колона [2, 3, 4]. Наши непубликувани към момента резултати също потвърждават високата чувствителност на теста при диагностициране на интестинални неоплазии.

През 2009 г. ние въведохме и изследване на ФКП с бърз количествен имунохроматографски метод – „Quantum Blue“ тест на BÜHLMANN Laboratories AG Switzerland. С този тест вече са изследвани стотици пациенти и нашите резултати от сравнението му с ELISA показват силна корелация между двата теста [4]. Освен това изследването се извършва много лесно и бързо (за около 30 минути), като не са необходими специализирана лаборатория и обучен персонал [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ФКП е относително нов, неинвазивен, евтин и високо сензитивен маркер за диагностика и оценка на интестиналното възпаление. Ролята му в разграничаването на редица случаи с болест на Крон от функционални нарушения е безспорна. Методът е изключително полезен и за оценка на степента на възпаление при възпалителни чревни заболявания, за мониториране на терапията и предсказване на релапсите. Високите нива на ФКП с голяма вероятност могат на предположат съществуването на ентеропатия при пациенти, лекувани с НПВС. Повишените стойности на ФКП могат да насочат към възпаление и възпалително усложнение (дивертикулит) при дивертикулна болест на колона. Съществена е и ползата от изследване на ФКП и при пациенти с дебелочревни неоплазии, където тестът е със значително по-висока чувствителност от широко използвания за скрининг хемокулт-тест. Без съмнение ФКП има широко практическо значение като диагностичен метод в чревната патология.

Библиография

1. Герова, В. Проучване на интестиналния пермеабилитет при някои гастроентерологични заболявания. – Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“. София, Медицински университет – София, 2009, 199.
2. Наков, В., М. Шишков, С. Стойнов и И. Терзиев. Фекален калпротектин – маркер на чревното възпаление (пилотно проучване). – Бълг. хепатогастроентерол., 11, 2009, № 2, 25-29.
3. Наков, В., С. Стойнов, М. Шишков, В. Герова, Б. Владимиров, В. Ценова и Т. Кондуржиев. Фекален калпротектин за оценка на възпалителната активност при хроничен ентероколит лекуван с пробиотици. – Бълг. хепатогастроентерол., 12, 2010, № 3, 9-14.
4. Наков, В. Фекален калпротектин – неинвазивен маркер за оценка на чревното възпаление. Дисертационен труд за присъждане на образователна и научна степен „доктор“. С., Медицински университет – София, 2011, 191.
5. Шишков, М. и В. Наков. Копрологични изследвания в клиничната лаборатория, някои преаналитични решения. – Инфектология, 2010, № 1, 18-19.
6. Alic, M. Is fecal calprotectin the next standard in inflammatory bowel disease activity test? – Am. J. Gastroenterol., 94, 1999, № 11, 3370-3371.

7. Bühlmann Laboratories, A. G. Quantum Blue Calprotectin: Quantitative lateral flow assay [pamphlet]. Schönenbuch: Bühlmann Laboratories AG, 2009.
8. Bunn, S. K., W. M. Bisset et M. J. Main. Fecal calprotectin: validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. – *J- Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, **33**, 2001, 14-22.
9. Desai, D., W. A. Faubion et W. J. Sandborn. Biological activity markers in inflammatory bowel disease. – *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **25**, 2007, № 3, 247-255.
10. Donato, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. – *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **33**, 2001, № 7, 637-668.
11. Fagerhol, M. K. et al. Calprotectin (the L1 leukocyte protein). – In: Smith VL, Dedman JR, editors. Stimulus Response Coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins. CRC Press, Boca Ration, 1990, 187-210.
12. Fagerhol, M. K. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. – *Lancet*, 356, 2000, 1783-1784.
13. Fagerhol, M. K. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein. – *J. Clin. Pathol.*, **49**, 1996, M74-M79.
14. Gearry, R. et al. Faecal calprotectin: the case for a novel non-invasive way of assessing intestinal inflammation. – *J. New Zealand Medical Association*, **118**, 2005, № 1214.
15. Hahn, B. L. et P. G. Sohnle. Resistance of zinc-supplemented *Candida albicans* cells to the growth inhibitory effect of calprotectin. – *J. Infect. Dis.*, **171**, 1995, 1289-1294.
16. Hoff, G. et al. Testing for faecal calprotectin (PhiCal) in the Norwegian Colorectal Cancer Prevention trial on flexible sigmoidoscopy screening: comparison with an immunochemical test for occult blood (FlexSure OBT). – *Gut*, **53**, 2004, 1329-1333.
17. Issekutz, A. C., D. Rowter et T. A. Springer. Role of ICAM-1 and ICAM-2 and alternate CD11/CD18 ligands in neutrophil transendothelial migration. – *J. Leukoc. Biol.*, 1999, 65-117.
18. Kane, S. V., W. J. Sandborn et P. A. Rufo. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. – *Am. J. Gastroenterol.*, **98**, 2003, 1309-1314.
19. Konikoff, M. R., I. Date et I. Andersson. Role of calprotectin as a biomarker of intestinal inflammatory bowel disease. – *Inflamm. Bowel Dis.*, **12**, 2006, 524-534.
20. Kronborg, O. et al. Faecal calprotectin levels in a high risk population for colorectal neoplasia. – *Gut*, **46**, 2000, 795-800.
21. Langhorst, J. et al. 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.*, **103**, 2008, 162-169.
22. Langhorst, J., S. Elsenbruch et T. Mueller. Comparison of 4 neutrophil-derived proteins in feces as indicators of disease activity in ulcerative colitis. – *Inflamm. Bowel Dis.*, 2005, № 2, 1085-1091.
23. Larsen, A. Inflammatory biomarkers with focus on Calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12 (EN-RAGE). Method development and application in acute radiation proctitis and rheumatoid arthritis patients. [PhD Thesis]. Bergen: University of Bergen, 2006.
24. Levy, O. Antimicrobial proteins and peptides of blood: Templates for novel antimicrobial agents. – *Blood*, **96**, 2000, 2664-2672.
25. Limburg, P. J., D. A. Ahlquist et W. J. Sandborn. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. – *Am. J. Gastroenterol.*, **95**, 2000, 2831-2837.
26. Montalto, M., V. Curigliano et L. Santoro. Fecal calprotectin in first-degree relatives of patients with ulcerative colitis. – *Am. J. Gastroenterol.*, **102**, 2007, 132-136.
27. Moore, B. W. A soluble protein characteristic of the nervous system. – *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 19, 1965, № 6, 739-744.
28. Paduchova, Z. et Z. Durackova. Fecal calprotectin as a promising marker of inflammatory diseases. – *Bratisl. Lek. Listy*, **110**, 2009, № 10, 598-602.
29. Pezzilli, R. et al. Fecal calprotectin levels in patients with colonic polyposis. – *Dig. Dis. Sci.*, **53**, 2008, № 1, 47-51.
30. Roseth, A. G., P. N. Schmidt et M.K. Fagerhol. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein in patients with inflammatory bowel disease. – *Scand. J. Gastroenterol.*, **34**, 1999, 50-54.
31. Santamaria-Kisiel, L., A. C. Rintala-Dempsey et G. S. Shaw. Calcium-dependent and -independent interactions of the S100 protein family. – *Biochem. J.*, **396**, 2006, № 2, 201-14.
32. Schafer, B. W. et C. W. Heizmann. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. – *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 1996, № 4, 134-140.
33. Sohnle, P. G., C. Collins-Lech et J. H. Wiessner. The zinc-reversible antimicrobial activity of neutrophil lysates and abscess fluid supernatants. – *J. Infect. Dis.*, **164**, 1991, 136-142.
34. Sohnle P. G. et al. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). – *J. Infect. Dis.*, **182**, 2000, № 4, 1272-1275.
35. Steinbakk, M. et al. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. – *Lancet*, **336**, 1990, 763-765.
36. Tibble, J. A. et al. High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. – *Gut*, **45**, 1999, 362-366.
37. Tibble, J. A. et I. Bjarnason. Non-invasive investigation of inflammatory bowel disease. – *World J. Gastroenterol.*, **7**, 2001, № 4, 460-465.
38. Tibble, J. A. et al. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. – *Gastroenterology*, **119**, 2000, № 1, 15-22.
39. Tibble, J. A. et al. Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma. – *Gut*, **49**, 2001, 402-408.
40. Vermeire, S., G. van Assche et P. Rutgeerts. Laboratory markers in IBD: Useful, magic, or unnecessary toys? – *Gut*, **55**, 2006, 426-431.
41. Voganatsi, A. et al. Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. – *J. Leukoc. Biol.*, **70**, 2001, 130-134.