



Општи подаци и протокол истраживања

Назив Пројекта : ДИЈАГНОСТИЧКИ ЗНАЧАЈ ФЕКАЛНОГ КАЛПРОТЕКТИНА КАО БИОМАРКЕРА ИНТЕСТИНАЛНЕ ИНФЛАМАЦИЈЕ У ПЕДИЈАТРИЈСКОЈ ГАСТРОЕНТЕРОЛОГИЈИ

Кључне речи : калпротектин, интестинална инфламација, деца

Предмет, садржај и циљ истраживања

Сажетак

УВОД: Инфламаторне болести црева *M.Crohn* и *Colitis ulcerosa* у деце бележе велики пораст инциденце у свету последњих 10 година. Клиничка слика је комплексна, дијагностика тешка и удружена са бројним инвазивним процедурама које су крајње непријатне за дете. Фекални калпротектин је биолошки маркер који пружа могућност њиховог избегавања.

ЦИЉ: Утврдити значај који фекални калпротектин, као поуздан маркер интестиналне инфламације има у дијагнози и праћењу инфламаторних болести црева код деце и проценити могућност избегавања инвазивних процедура којима се деца излажу у поступку диференцијалне дијагностике према другим болестима гастроинтестиналног тракта, најчешће функционалним.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ: Проспективном клиничком студијом која ће се изводити на Педијатријској клиници у Крагујевцу, Одсек гастроентерологије са изолацијом, анализираће се, у периоду од 3 године неколико група пацијената (укупно 100) узраста 10 до 18 година и то:

1. Суспектних на инфламаторну болест црева на основу типичне клиничке слике у складу са критеријумима Европског удружења за дечју гастроентерологију (*ESPGHAN*)
2. Пацијенти са екстраинтестиналним манифестацијама инфламаторне болести црева, иначе много бројнијих у *M.Crohn* у односу на *Colitis ulcerosa*.
3. Деца са клиничком сликом функционалне болести дигестивног тракта у складу са дефинисаним критеријумима *Roma III*.
4. Пацијенти код којих је болест доказана лабораторијски, ендоскопски и хистолошки, који су на терапији
5. Здрава деца (контролна група).



Свим испитаницима ће се, у складу са водичем *ECCO Guidelines for diagnosis of IBD, Crohn disease and Ulcerative colitis*, поред анамнезе и комплетног клиничког прегледа урадити валидна процена раста и развоја, крвна слика са формулом, *SE* и *CRP*, хепатични, ренални тестови као и ултразвучни преглед абдомена, тест *BWUS Bowel Wall Ultrasonography Measurement*.

Фекални калпротектин ће се квантификовати из узорка столице пацијената *ELISA* тестом, применом комерцијалних китова " *Calfast* " произвођача *Eurospital Spa Italy, Trieste*.

Циљ истраживања:

1. Proceniti značaj fekalnog kalprotektina u dijagnostici suspektne inflamatorne bolesti creva kod dece
2. Proceniti ulogu fekalnog kalprotektina u diferencijalnoj dijagnozi funkcionalnih bolesti gastrointestinalnog trakta dece
3. Utvrditi korelaciju između povišenog kalprotektina sa ostalim parametrima inflamacije koji koristimo u dijagnozi inflamatornih bolesti creva
4. Utvrditi mogućnost praćenja uspeha terapije kao i prediktivnu vrednost kliničkog relapsa kod već dijagnostikovanih pacijenata
5. Utvrditi vrednosti kalprotektina u populaciji zdrave dece (kontrolna grupa)

Актуелност истраживања

Термин инфламаторне болести црева се односи на два различита поремећаја идиопатске хроничне упале црева, Кронову болест и Улцерозни колитис. У 10% пацијената код којих је немогуће доћи до праве дијагнозе овај поремећај се зове Недетерминисани колитис.¹

Њихова етиологија још увек није у потпуности разјашњена, карактеришу их непредвидиве егзацербације и ремисије. Појављују се пре 20 године живота у 25 до 30% свих пацијената са инфламаторним болестима.² Иако нижа у детињству у односу на одрасле, инциденца инфламаторних болести црева бележи значајан пораст код деце последњих 10 година, од 0,1 (пре 30 год) до 4,6 (2003 год) за Кронову болест и од 0,5 до 3,2 за Улцерозни колитис.^{2,3} Процењује се да у Северној Америци од инфламаторних болести пати око 50 000 деце.⁴ Најчешће време појаве болести је узраст од 11 до 20 година⁵ мада у развијеним земљама света, ови поремећаји представљају главне узроке хроничне интестиналне упале код деце већ после првих неколико година живота.²



У патогенези инфламаторних болести црева велики утицај имају генетски фактори и фактори средине.⁶ Суспектан локус за Кронову болест је смештен на хромозомима 5 и 16. Одговоран ген на хромозому 6, *NOD 2* (назван *CARD 15- caspase activation and reprimment domain*) има експресију у макрофагима и може имати утицај на интеракцију бактеријског липополисахарида и домаћина. *NOD 2* пацијенти, хомозиготи, су у 20 пута већем ризику да добију Кронову болест (20% пацијената). *Perinuklerana antineutrofilna antitela (p ANCA)* су нађена код 70% пацијена са Улцерозним колитисом у поређењу са мање од 20% оних са Кроновом болести и верује се да представљају маркер генетички контролисаног имунорегулаторног поремећаја.⁶ Фактори средине су још један важан фактор у настанку инфламаторних болести црева. Пресељење у развијене земље повећава ризик од оболевања. Специфични инфективни агенси се не доводе у везу са настанком болести. Поремећај у имунорегулацији интестиналне мукозе може бити од примарног значаја у патогенези инфламаторне болести. Црево је орган који се налази под константном имунолошком стимулацијом микроба и антигена из хране. Као одговор на то долази до тзв "физиолошке" инфламације слузнице. Код развоја инфламаторних болести патолошка инфламација замењује физиолошку. Још увек је нејасно да ли је реч о абнормалном одговору на уобичајене ентеричке антигене или о нормалном одговору на још неидентификоване микробе. У развоју болести учествују медијатори упалног процеса (цитокини, метаболити арахидонске киселине, реактивни метаболити кисеоника, фактор раста) који доводе до деструкције ткива и ремоделирања са фиброзом. Већина терапијских модела је усмерена управо на ове медијаторе.⁶

Обично је могуће направити разлику између Улцерозног колитиса и Кронове болести на основу клиничке слике, радиолошких испитивања, ендоскопских процедура и хистопатолошког налаза али понекад се деси да се сумња на Улцерозни колитис а докаже Кронова болест за коју су знатно чешће везане бројне екстраинтестиналне манифестације.^{7,8,9} Заостатак у расту и губитак телесне масе се виђа код 30-51% деце са Кроновом болести.² Нарочито су карактеристична нејасна фебрилна стања 40,5%,² афтозне улцерације у усној шупљини,¹⁰ рефрактарна анемија 23,8%,² периферни артритис 22,5%,² очне болести 1,7%,² честа еритема нодозум, задебљање интерфалангеалних збогова, бубрежни каменци и каменци у жучној кеси.^{11,12,13} Нарочито значај у диференцијано дијагностичком смислу има Рекурентни Абдоминални Бол који може маскирати бол који се јавља код Кронове болести.¹¹

Будући да је реч о хроничним стањима која су обележена рекурентним епизодама инфламације у гастроинтестиналном тракту која није непосредно видљива од стране пацијента или педијатра. развијене су бројне помоћне методе које би указале на њену озбиљност.^{11,12,13} Симптоми које има пацијент су важан индикатор инфламације и активности саме болести али су истовремено и субјективни, могу бити потенцирани другим неинфламаторним чиниоцима као што су интестиналне стриктуре, малапсорпција жучних соли, неподношење лактозе, опстипација и бројни други. Протокол назван „Crohn's Disease Activity Index, користи комбинацију симптома, физикалног налаза и лабораторијских параметара како би се установио степен активности саме болести. Серолошки маркер, *Anti-saccharomyces cerevise antitela (ASCA)* се идентификују код 55% деце оболеле од Кронове болести и само у 5% од Улцерозног колитиса. Хематолошки параметри се користе масовно али они имају органичену сензитивност и специфичност за интестиналну инфламацију и слабо корелирају са параметрима у *Disease Activity Index*.^{11,14,15} *Imagin* технике, *CT* и/или *MRI*, пасажа баријумом и



ентероклиза могу помоћи у локализацији интестиналног процеса али су веома скупе, имају субоптималну сензитивност и /или специфичност, могу бити инвазивне и излажу децу радијацији. Важећи златни стандард за процену интестиналне инфламације је ендоскопија, проксимална и колоноскопија са биопсијом^{12,16}. Техника дозвољава визуалну инспекцију гастроинтестиналног тракта и биопсију узорака слузнице који се затим подвргавају хистолошком прегледу. Локализација, заступљеност по сегментима и озбиљност болести може бити установљена овим процедуром, али, она је инвазивна, непријатна за дете, не може обухватити у потпуности све сегменте гастроинтестиналног тракта и захтева, поред оператера, педијатра - ендоскописте, седацију делимичну или општу, присуство анестезиолога а и непријатан режим припреме за колоноскопију није занемарљив. *Wireless capsule endoscopy* омогућава пуну визуализацију танког црева, али иако инвазивна и прилично скупа, метода не омогућава узимање узорака ткива. Ове ограничења лимитирају учесталост процене болести ендоскопским техником. Постало је јасно да је потребна једноставна, брза, сензитивна, специфична, не много скупа, неинвазивна метода, маркер, да детектује и прати интестиналну инфламацију у суспектним инфламаторним болестима црева код деце.

Чини се да фекални калпротектин поседује ове карактеристике.¹⁷

Фекални калпротектин је неутрофилни протеин који се налази у плазми и столици болесника са инфламаторним болестима. Најпре је био изолован из гранулоцита и назван L₁ протеин. Име "калпротектин" је проистекло из чињенице да је везан за калцијум и да има антимикуробна својства. Представља 50-60 % неутрофилног цитосолног протеина. Ослобађа се из ћелије током њене активације или апоптозе. Стабилан је у столици након екскреције неколико дана. Лако је мерљив комерцијалним методама, *Elisa* теста. Показао се као веома сензитиван маркер активности у Кроновој болести и добром корелацијом са ендоскопском и хистолошком активношћу у Улцерозном колитису. Фекални калпротектин је сензитиван и специфичан маркер релапса Улцерозног колитиса и Кронове болести; сензитивност 90% специфичност 83%.^{15,17,18,19,2}

Предмет и опис истраживања: задаци, методологија, очекивани резултати

У оквиру проспективне клиничке студије, на Педијатријској клиници у Крагујевцу, Одсек за гастроентерологију и изолацију, **анализираће се стратификован узорак**, групе од по **18 ± 2 пацијента** узраста 10 до 18 година:

1. Суспектних на инфламаторну болест црева у складу са критеријумима које садрже протокол *ECCO Guidelines for diagnosis of IBD, Crohn disease and Ulcerative colitis* (**14,20**)
2. Другу групу пацијената чиниће они са екстраинтестиналним манифестацијама које су бројније код Кронове болести у односу на Улцерозни колитис а односе се на застој у расту и развоју, рефрактарну анемију, етиолошки неразјашњену фебрилност, афтозне рецидивантне стоматитисе, промене на кожи и зглобовима, пацијенте са



хепатобилијарним проблемима ,компликацијама након апендектомије, афтозним променама у аналној регији , необјашњеним реналним коликама , појавом увеитиса.(8, 9,10)

3. Група деце са клиничком презентацијом функционалних болести у складу са критеријумима *Roma III* . (21)
4. Група пацијената код којих је дијагноза потврђена лабораторијски, ендоскопски и хистолошки, који примају терапију, у циљу праћења њеног успеха и предиктивне процене релапса. (18)
5. Група здраве деце из које ће се искључити они са било којом хроничном болести коју прати анамнеза абдоминалног бола, дијареје, акутне респираторне болести, деца на антистероидној антиинфламаторној терапији, инхибиторима протонске пумпе, антибиотцима, са менструалним или назалним крварењем у последње 3 недеље. (19)

Свим испитаницима ће се у складу са *ECCO Guidelines for diagnosis of IBD, Crohn disease and Ulcerative Colitis* поред анамнезе и комплетног клиничког прегледа урадити валидна процена раста и развоја, крвна слика са формулом, *SE* и *CRP* , хепатични , ренални тестови.и неинвазивни ултразвучни тест *BWUS (Bowel Wall Ultrasonography Measurement)*. Фекални калпротектин ће се анализирати применом комерцијалних китова *ELISA* тестом " *Calfast* " произвођача *Eurospital Spa Italy Trieste* " .

" *Calfast* " је имунохроматографски имуноесеј за детекцију калпротекина. Од деце која користе пелене столица се узима директно у тест тубу како би се избегла апсорпција воде што може повећати ниво фекалног калпротекина. Фекални узорак се разблажи дилуентом који садржи моно и поликолнална антитела у односу 1:50 .Од раствореног узорка узима се 100 *pgr* , стави у циркуларни прозор на плочици где се после инкубације од 20 минута на собној температури очитава резултат. Квантитативно мерење калпротекина у столици обезбеђује се помоћу читача „ *Calfast reader* , који квантификује резултат у облику стандардне криве. Вредности су у рангу између 30 до 300 *mg/kg*. Он се појави за неколико секунди на дисплеју инструмента и тумачи као негативан < 70 *mg/kg* ; сива зона , поновити 70 /100 *mg/kg* и позитиван резултат > 100 *mg/kg*.

Студија ће бити проспективна и неинтервенцијска . Ниједна од дијагностичких метода неће бити примењена због саме студије већ у оквиру добро познатих интернационалних протокола за испитивање и лечење инфламаторних болести црева код деце. Пре укључивања у студију родитељи потписују сагласност на предложени медицински поступак по Закону о Здравственој Заштити чл.27,28,29 и 31.,Службени гласник бр.107 од 02 децембра 2005 год .

Сви параметри који се добију током студије у испитиваним и контролној групи биће детаљно анализирани и упоређивани.



Значај истраживања

Калпротектин је протеин присутан у неутрофилима, налази се у повишеној концентрацији у столици код инфламаторних болести црева, Кронове болести и Улцерозног колитиса. Калпротектин је стабилан у узорку столице неколико дана на собној температури и много дуже на -20 степени. Фекална концентрација калпротектина корелира са ендоскопским и хистолошким налазима интестиналне инфламације.¹⁵

Само мали број пацијената са интестиналним тегобама који се јавља дечјем гастроентерологу има органску болест. Већина педијатријске популације (>75 %) има неки облик функционалне болести гастроинтестиналног тракта као што је синдром иритабилног црева нпр или опстипација. Симптоми интестиналног оштећења су углавном неспецифични (дијареја, абдоминални бол, метеоризам) и веома је важно издиференцирати пацијенте код којих не постоји потреба за компликованом и непријатном дијагностиком у односу на оне који заиста пате од органске болести танког или дебелог црева.^{21,22,23} Мерење калпротектина је ослонац „*in vitro*“ дијагностике инфламаторних болести, Кронове болести и Улцерозног колитиса уз клиничку слику и остало лабораторијско тестирање. Он пружа могућност диференцијалне дијагнозе између инфламаторних болести и функционалних оштећења гастроинтестиналног тракта, праћење успеха терапије код већ оболелих и предвиђање клиничког релапса.^{24,25,26,27} Негативна предиктивна вредност теста је око 99% у дијагнози инфламаторних болести црева. Присуство органске болести је екстремно ретко са нормалном концентрацијом калпротектина у столици.

Мерење фекалног калпротектина је неинвазивна метода за детекцију присуства инфламације интестиналне мукозе која има велики значај у гастроентерологији а нарочито у дечјој будући да се овим скринингом избегава веома захтевна и непријатна процедура испитивања – колоноскопија.

Временски оквир

Планом студије истраживање ће се изводити у периоду од три године, прегледом 100 пацијената; 75 са суспектном инфламаторном болести црева и 25 здрава деце (контролна група)

Литература:

1. Ravikumara et al. Epidemiology of Inflammatory Bowel Diseases in childhood. Indian J Pediatr 2006;73(8):717-721.



2. Medical position paper Inflammatory Bowel Disease in children and adolescents; Recommendations for Diagnosis—the Porto criteria IBD Working group of the European Society for Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN): Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2005;41:1-7.
3. Castro M at al. Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents in Italy: Data from the Pediatric National IBD Register(1996-2003). Inflamm Bowel Dis 2008; 14 (9).
4. Markowitz at al. Inflamm Bowel Dis 2004;10:599-605.
5. Lofons at al. Gastroenterology 2003;124:278.
6. Hyams J. Inflammatory bowel diseases. In: Kliegman R, Behreman E, Jenson H, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: Saunders,2007;1248-1252.
7. Hyams J. M Cronh. In: Kliegman R, Behreman E, Jenson H, eds. Nelson Textbook of Pediatrics. Philadelphia: Saunders, 2007;1252-1255.
8. Turner D, Otley A, Mack D, Hyams J, De Bruijne, Uusoue K, Walters T at al. Development, Validation and Evaluation of a Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index: A Prospective Multicenter Study, Gastroenterology 2007; 133:423-432.
9. Hyams J.S, Ferry G.D, Mandel F.S, Gryboski J.D, Kibort Ph.M at al. Development and Validation of a Pediatric Crohn ' s Disease Activity Index. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 1991;12:439-447.
10. Marković Lj. Ljušković B. Oralne manifestacije kronove bolesti. Serbian Dental J, 2004;51:103-106.
11. Veerman-Wauters G and Cucchiara S. The management of Paediatric Crohn ' s Disease: Addressing Needs. The Open Pediatric Medical Journal 2008 ;2 :21-29
12. Gert Von Assche at al. The second European evidence – based Consensus on the diagnosis and management of Crohn' s disease for the European Crohn' s and Colitis Organisation (ECCO),Journal of Crohn and Colitis 2010;4:63-101.
13. Blancone Livia at al. European evidence – based Consensus on the management of Ulcerative colitis for the European Crohn' s and Colitis Organisation (ECCO), Journal of Crohn and Colitis 2008;2:63-92
14. Canani R.B,Tanturi L,Terrin G, Romano M.T,Miele E, Staiano A, Rapacciuolo L at al. Combined Use of Noninvasive Tests is Useful in the Initial Diagnostic Approach to a Child with suspected Inflammatory Bowel Disease. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2006;42:9-15.
15. Desai D, Faubion W.A. Sandborn W.J. Biological activity markers in inflammatory bowel disease. Aliment Pharmacol Ther 2006;25:247-255



16. Park J. H. Role of colonoscopy in the diagnosis and treatment of pediatric lower gastrointestinal disorders. *Korean J Pediatr* 2010;53(9):824-829
17. Michael R.Konikoff and Lee A.Denson. Role of Fecal Calprotectin as a Biomarker of Intestinal Inflammation in Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12(6):524-534
18. Costa F, Mumala M.G, Ceccarelli L, Bellini M, Romano M.R at al. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Chron' s disease.*Gut* 2005;54:364-368.
19. Canani R.B, Rapacciuolo L, Romano M.T, Tanturi L, Terrin G, Manguso F, Cirillo P, Paparo F, Troncone R. Diagnostic value of fecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Digestive and Liver Disease* 2004;36:467-470.
20. Van Rheenen P, Eis Van de Vivijer. Fecal calprotectin for screening of patient with suspected inflammatory bowel disease ; diagnostic meta analysis. *BMJ* 2010;341:c3369.
21. Meucci G.D, Inca R, Maierom R, Orez N,Vecchi M, Visentini D, Minoli G at al. Diagnostic value of faecal calprotectin in unselected outpatient referred for colonoscopy:A multicenter prospective study. *Digestive and Liver Disease* 2010;42:191-195.
22. Montalto M, CuriglianoV, Santoro L, Armuzzi A, Cammarota G, Covino M, Mentella M at al. Fecal calprotectin in First Degree Relatives of Patient with Ulcerative Colitis. *American Journal of Gastroenterology*2006;101:1-5.
23. Pham M. at al. First degree relatives of children with Chron. *Dig Dis Sci* 2010;55:3502-7.
24. Canani R.B, Romano M.T,Terrini G, Rapacciuolo L. Fecal calprotectin in a useful diagnostic tool in pediatric gastroenterology.*Ital. J.Pediatr* 2005;51: 69-94.
25. Montalto M, Gallo A, Ianiro G, Santoro L, D'Onofrio, Ricci R, Cammarota G at al. Can chronic gastritis cause and incrise in fecal calprotectin concentrations? *World J.Gastroenterology* 2010;16(27):3406-3410.
26. Savino F, Castagno E, Calabrese R,Viola S,Oggero R,Miniero R.High Faecal Calprotectin Levels in Healthy, Exclusively Breast –Feed Infants. *Neonatology* 2009;97(4):299-304.
27. Fontana Massimo.Calprotectin:Where are we? *IBD and Coeliac Disese the Celebration day*,Jan 2012,Trieste.Abstract book,1-7.