

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA DOBRAVEC

DIPLOMSKA NALOGA

VISOKOŠOLSKI STROKOVNI ŠTUDIJ LABORATORIJSKE BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NATAŠA DOBRAVEC

**DOLOČANJE KALPROTEKTINA V BLATU PRI RAZLIČNIH ČREVESNIH
OBOLENJIH**

**MEASURING FECAL CALPROTECTIN LEVELS IN VARIOUS INTESTINAL
DISORDERS**

HIGHER EDUCATION PROGRAM LABORATORY BIOMEDICINE

Ljubljana, 2016

Diplomsko nalogo sem opravljala na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana pod vodstvom mentorjaizr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in somentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorjuizr. prof. dr. Matjažu Jerasu in somentorju prof. dr. Jošku Osredkarju za strokovno pomoč, koristne napotke in dostopnost v času nastajanja diplomske naloge. Zahvaljujem se tudi prijatelju za vso izkazano pomoč in potrpežljivost v težkih trenutkih. Zahvala pa gre tudi domačim za izjemno spodbudo med študijem.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvomizr. prof. dr. Matjaža Jerasa, mag. farm. in prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem.

Ljubljana, avgust 2016

Nataša Dobravec

VSEBINA

SEZNAM SLIK	III
SEZNAM PREGLEDNIC	IV
POVZETEK.....	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 Kronično vnetna črevesna bolezen	1
1.1.1 Epidemiologija	1
1.1.2 Etiopatogeneza.....	2
1.1.3 Značilnosti Crohnove bolezni in ulceroznega kolitisa	3
1.1.4 Sindrom razdražljivega črevesa (SRČ).....	5
1.1.5 Zdravljenje KVČB.....	7
1.1.6 Diagnostika KVČB.....	9
1.1.7 Kalprotektin	13
2 NAMEN DELA	17
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 Vzorci	18
3.2 Oprema in materiali	19
3.2.1 Priprava reagentov	19
3.3 Določanje koncentracij kalprotektina z metodo ELISA.....	20
3.3.1 Izvedba testa	20
3.4 Statistična analiza rezultatov	21
4 REZULTATI.....	22
4.1 Vzorci	22
4.2 Rezultati merjenja koncentracij kalprotektina s testom ELISA	23
4.2.1 Crohnova bolezen	23
4.2.2 Ulcerozni kolitis	24
4.2.3 Kontrolna skupina	25

4.3	Statistična primerjava fekalnih koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih bolnikov iz vseh treh skupin.....	26
4.3.1	Primerjava med skupino bolnikov s CB in kontrolno skupino.....	26
4.3.2	Primerjava med skupino bolnikov s UK in kontrolno skupino	26
4.3.3	Primerjava med skupino bolnikov s CB in UK.....	26
4.4	Vrednotenje testa ELISA.....	27
4.4.1	Crohnova bolezen	27
4.4.2	Ulcerozni kolitis	28
5	RAZPRAVA.....	29
6	SKLEP	33
7	LITERATURA	34
8	PRILOGE.....	37

SEZNAM SLIK

Slika 1: Najpogosteje vneti predeli črevesja pri Crohnovi bolezni;	3
Slika 2: Vneti predeli črevesja pri ulceroznem kolitisu;.....	4
Slika 3: Prevalenca protiteles pri bolnikih s Crohnovo boleznijo (CB), ulceroznim kolitisom (UK), nedeterminiranim kolitisom (NK) in kontrolno skupino;	11
Slika 4: Sekundarna struktura kalprotektina;.....	13
Slika 5: Shematski prikaz vezave protiteles in antigena pri metodi sendvič ELISA;	16
Slika 6: Število preiskovancev glede na spol.	18
Slika 7: Histogram, ki prikazuje frekvenčno porazdelitev preiskovancev glede na njihovo starost.....	18
Slika 8: Frekvenčni histogram koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov s Crohnovo boleznijo	23
Slika 9: Frekvenčni histogram koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov z ulceroznim kolitisom.	24
Slika 10: Frekvenčni histogram koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov iz kontrolne skupine.	25
Slika 11: Krivulja ROC (ang. Receiver Operating Characteristic) za vrednotenje testa ELISA pri določanju fekalnih koncentracij kalprotektina v vzorcih blata bolnikov s Crohnovo boleznijo.	27
Slika 12: Krivulja ROC (ang. Receiver Operating Characteristic) za vrednotenje testa ELISA pri določanju fekalnih koncentracij kalprotektina v vzorcih blata bolnikov z ulceroznim kolitisom.	28

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica I: Epidemiologija KVČB	1
Preglednica II: Razlike v kliničnih znakih med Crohnovo boleznijo in ulceroznim kolitisom	5
Preglednica III: Zunajčrevesni simptomi KVČB	5
Preglednica IV: Prikaz preiskovancev v posameznih skupinah, glede na njihovo starost. .	22
Preglednica V: Rezultati osnovne statistične analize koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov s Crohnovo boleznijo.....	23
Preglednica VI: Rezultati osnovne statistične analize koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov z ulceroznim kolitisom.	24
Preglednica VII: Rezultati osnovne statistične analize koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov iz kontrolne skupine.	25
Preglednica VIII: Statistični podatki analize ROC za vrednotenje testa ELISA pri določanju fekalnih koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih bolnikov s Crohnovo boleznijo.	27
Preglednica IX: Statistični podatki analize ROC za vrednotenje testa ELISA pri določanju fekalnih koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih bolnikov z ulceroznim kolitisom.	28
Preglednica X: Kriteriji za vrednotenje uspešnosti metode, glede na velikost površine pod krivuljo ROC.	30

POVZETEK

Kalprotektin v blatu je nespecifičen pokazatelj črevesnega vnetja. Njegovo določanje je neinvazivno. Pomaga nam pri diagnostiki kroničnih črevesnih bolezni, njegova prednost pa se pokaže pri razlikovanju med črevesnimi vnetnimi boleznimi in sindromom razdražljivega črevesa oz. drugimi boleznimi črevesnega trakta brez vnete črevesne stene. Namen diplomske naloge je bil primerjati koncentracije kalprotektina v blatu pri različnih črevesnih boleznih ter ugotoviti, ali se njegove koncentracije razlikujejo v posamezni skupini in s tem potrjujejo prisotnost ali odsotnost aktivnega vnetnega procesa. Izbrali smo skupino bolnikov s Crohnovo boleznijo, skupino z ulceroznim kolitisom in kontrolno skupino, v kateri so bili bolniki, ki niso imeli kroničnih vnetnih, pač pa druge vrste črevesnih bolezni. Nato smo količine fekalnega kalprotektina, izmerjene v posamezni skupini, primerjali med seboj. V skupini s Crohnovo boleznijo je bila povprečna koncentracija kalprotektina v blatu 694,00 µg/g (mediana 281,00 µg/g), v skupini z ulceroznim kolitisom 682,00 µg/g (mediana 312,00 µg/g), v kontrolni skupini pa 276,00 µg/g (mediana 100,00 µg/g). Za primerjavo med skupinami smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyjev U-test in ugotovili statistično značilno razliko ($P < 0,0001$) med koncentracijami fekalnega kalprotektina, izmerjenimi v obeh skupinah bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo, v primerjavi s tisto, določeno v kontrolni skupini. Količine fekalnega kalprotektina izmerjene v skupini bolnikov s Crohnovo boleznijo in tisti z ulceroznim kolitisom pa se med seboj niso statistično značilno razlikovale ($P = 0,847$). Zato smo zaključili, da je določanje kalprotektina v blatu uporaben test za razlikovanje med vnetnimi in nevnetnimi organskimi boleznimi črevesja, ni pa uporaben kot diagnostična metoda za določanje vrste kronične vnetne črevesne bolezni.

Ključne besede: kalprotektin, Crohnova bolezen, ulcerozni kolitis, statistična primerjava

ABSTRACT

Faecal calprotectin is a non-specific marker of inflammatory bowel disease. It is measured non-invasively. Calprotectin is instrumental in identifying chronic bowel diseases, however its main advantage is in its ability to distinguish between inflammatory bowel diseases and irritable bowel syndrome, as well as other bowel diseases where the intestinal wall is not inflamed. The purpose of this thesis was to compare calprotectin concentrations in stools of patients suffering from different types of bowel diseases, as well as to determine whether its concentrations differ from one group to another, thereby confirming the presence of active intestinal inflammatory processes. A control group consisting of patients with non-inflammatory bowel diseases was compared with a group of Crohn's disease patients and a group of patients with ulcerative colitis. The average faecal calprotectin concentration in Crohn's disease patients was 694,00 µg/g (median value: 281,00 µg/g) and 682,00 µg/g (median value: 312.00 µg/g) in those, suffering from ulcerative colitis. On the other hand, its average concentration in the control group was 276,00 µg/g (median value: 100,00 µg/g). Nonparametric Mann-Whitney U Test was used to compare the results obtained in all three groups. Statistically significant difference was found when faecal calprotectin concentrations defined in both groups of patients with a chronic inflammatory bowel disease were compared to that, measured in the control group ($P < 0.0001$). However, there was no statistically significant difference found in calprotectin concentrations ($P = 0.847$) between the groups of Crohn's disease and ulcerative colitis patients. This leads us to conclude that faecal calprotectin levels are useful for distinguishing organic non-inflammatory and inflammatory bowel diseases, but they cannot be used as a diagnostic tool for differentiating between the types of chronic inflammatory bowel diseases.

Key words: calprotectin, Crohn's disease, ulcerative colitis, statistical comparison

SEZNAM OKRAJŠAV

ASCA – protitelesa proti kvasovki *Saccharomyces cerevisiae*

CB – Crohnova bolezen

CRP – C-reaktivni protein

ELISA – encimska imunoadsorpcijska preiskava

GAB – protitelesa proti čašastim celicam

GIT – gastrointestinalni trakt

KVČB – kronične vnetne črevesne bolezni

p-ANCA – perinuklearna anti-nevtrofilna citoplazemska protitelesa

PAB – protitelesa proti eksokrinemu delu pankreasa

ROMA – mednarodno združenje za standardizacijo kriterijev pri diagnosticiranju in zdravljenju funkcionalnih motenj prebavil

SRČ – sindrom razdražljivega črevesa

TNF- α – tumorje nekrotizirajoči dejavnik alfa

UK – ulcerozni kolitis

1 UVOD

1.1 Kronično vnetna črevesna bolezen

Kronične vnetne črevesne bolezni (KVČB) so vnetne bolezni prebavil. Njihova glavna predstavnika sta Crohnova bolezen (CB) in ulcerozni kolitis (UK). Za obe bolezni so značilni otekanje in krvavitve v prebavnem oz. gastrointestinalnem traktu (GIT). Gre za vseživljenjske bolezni z akutnimi izbruhi ter vmesnimi daljšimi ali krajšimi remisijami. Najpogostejši znaki teh bolezni so trebušne bolečine, krči v trebušnem predelu, (krvava) driska, izguba teže in utrujenost. Kljub temu da bolezenski znaki povzročajo slabo počutje in otežujejo opravljanje vsakdanjih aktivnosti, lahko te težave obvladujemo s pravilno nego in ustreznimi zdravili.

Pri dobrih 10% primerov ne moremo natančno diagnosticirati bolezni. Takrat govorimo o intermediarnem kolitisu (1). Manj pogosta bolezen, ki jih včasih štejemo med KVČB, je mikroskopski kolitis, ki se deli na kolageni in limfocitni kolitis.

1.1.1 Epidemiologija

KVČB se lahko razvijejo pri ljudeh vseh starostnih skupin, najpogosteje pa se pojavijo pred 30. letom. Tovrstne bolezni so najpogostejše pri severnih in anglosaških Evropejcih ter od 2- do 4-krat pogostejše pri Aškenazi Judih, v primerjavi z belci nejudovskega porekla. V južni Evropi, južni Ameriki, Aziji in Afriki pa so KVČB manj pogoste.

Preglednica I: Epidemiologija KVČB (1, 2).

Incidenca (št. bolnikov/10 ⁵ prebivalcev)	Crohnova bolezen: 1 – 10 Ulcerozni kolitis: 3 – 15
Prevalenca (št. bolnikov/10 ⁵ prebivalcev)	Crohnova bolezen: 20 – 100 Ulcerozni kolitis: 50 – 80
Geografska porazdelitev	Pogosteje v severnih predelih Evrope
Spol	Enakomerno pri obeh spolih
Rasa	Pogosteje pri belcih
Kajenje	Zvišuje tveganje za Crohnovo bolezen. Ščiti pred ulceroznim kolitisom.

1.1.2 Etiopatogeneza

Možnost nastanka KVČB zvišujejo: genetska nagnjenost (večinoma pri CB), pozitivna družinska anamneza, motnje v delovanju imunskega sistema in motnje sluznične prepustnosti. Na nastanek CB vplivata tudi oralna kontracepcija in kajenje. Zanimivo je, da slednje zmanjšuje možnost nastanka UK in apendektomije. Nesteroidna protivnetna zdravila pa povečujejo možnost za nastanek obeh bolezni.

KVČB so zapletene bolezni, na nastanek katerih vplivajo številni okoljski in genetski dejavniki. Številni bolniki imajo zmanjšano biotsko raznovrstnost komezalnih črevesnih bakterij. Razloga za porušeno črevesno floro sta večinoma kronično jemanje antibiotikov in vrsta prehrane. Točnih genetskih dejavnikov, odgovornih za nastanek KVČB zaenkrat še ne poznamo, odkrili pa so že večje število genov, ki nedvomno prispevajo k nastanku bolezni. Eden izmed njih je gen NOD2/CARD15 na kromosomu 16, ki je vzročno povezan s CB (3). Do sedaj so odkrili 163 lokusov na 300 genih. Številni med njimi uravnavajo proizvodnjo citokinov, aktivacijo levkocitov in imunske odzive na bakterijske okužbe.

Raziskave so pokazale, da je nepravilen imunski odziv na običajno komezalno črevesno floro odgovoren za nastanek vnetja pri KVČB. Opazili so tudi zvišane titre protiteles razreda IgG, ki se vežejo na citoplazemske antigene bakterij normalne črevesne flore. Pri zdravih ljudeh obstaja toleranca med imunskim sistemom in črevesno floro. Moteno delovanje imunskega sistema lahko torej povzroči pretiran imunski odziv na normalno črevesno floro in s hrano zaužite neškodljive oz. hranilne snovi. Po drugi strani pa je lahko nezadovoljiv imunski odziv na mikrobo tudi vzrok za razraščanje oportunističnih in patogenih mikroorganizmov. V državah v razvoju se število bolnikov s CB povečuje zaradi vse boljše higiene, obveznih cepljenj in manjše izpostavljenosti patogenom.

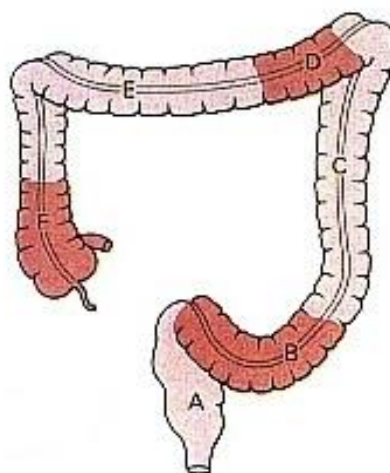
1.1.3 Značilnosti Crohnove bolezni in ulceroznega kolitisa

1.1.3.1 Crohnova bolezen (CB)

Crohnova bolezen je vrsta KVČB, ki lahko prizadene celoten prebavni trakt, od ustne votline do anusa. V zgornjem predelu je bolezen redkejša. Največkrat prizadene tanko in debelo črevo. V nasprotju z UK je pri CB vnetje črevesja transmuralno graunulomatozno (3). Bolezen se začne v globljih strukturnih slojih črevesja, vključno z mezenterijem oz. zunanjo steno, nato pa napreduje v notranjost, vse do površine sluznice.

Približno polovica bolnikov ima prizadeto celotno črevesje, pri tretjini je vnetje omejeno na tanko, pri ostalih pa na debelo črevo, kjer je CB diagnostično težje ločiti od UK.

Za potrditev diagnoze običajno med kolonoskopijo izvedejo biopsijo črevesne stene, kjer lahko na sluznici opazijo vnetna področja, ki odražajo stanje v globljih plasteh tkiva. Na teh mestih je tudi povišano število infiltriranih nevtrofilcev, ki lahko prodrejo v črevesne žleze in povzročijo njihovo vnetje in izločanje abscesa.



Slika 1: Najpogosteje vneti predeli črevesja pri Crohnovi bolezni; povzeto po (4)

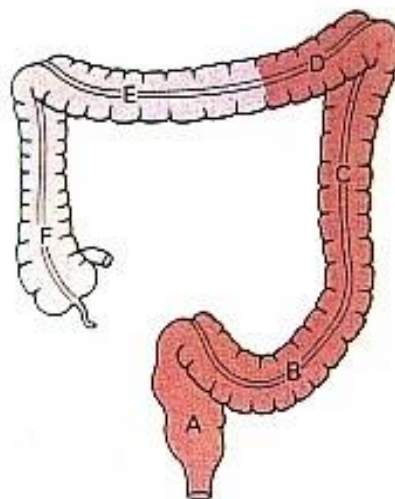
Najpogostejši simptomi pri bolnikih s CB so:

bolečina v trebuhu, driska, hujšanje in občasno zvišana telesna temperatura. V črevesju nastanejo fistule in perforacije, motena je absorpcija vitaminov, pri otrocih pa je opazen zastoj v rasti. Pri več kot tretjini bolnikov s CB se pojavijo zunajčrevesne manifestacije, pri čemer so najpogosteje prizadeti sklepi, oči in koža (3).

1.1.3.2 Ulcerozni kolitis (UK)

Področje obolelosti gastrointestinalnega trakta je pri UK omejeno na debelo črevo. Vedno je prizadeta sluznica rektuma, bolezen pa se lahko kontinuirano širi višje in zajame celotno debelo črevo. Takrat govorimo o ulceroznem pankolitisu.

Primarna patološka sprememba je vnetna reakcija, ki prizadene sluznico, redkeje pa prodre tudi do submukoze. Sluznica črevesja je pordela in edematozna, s prisotnimi manjšimi ulceracijami. Bolezenski znaki pri bolnikih so: driska s prisotnostjo krvi in sluzi, ki traja več tednov, bolečine v trebušnem predelu, lahko pride do izgube telesne teže, vnetje in kronične krvavitve pa lahko povzročijo anemije in hipoalbuminemije.



Eden od redkejših zapletov pri UK je toksični megakolon, kjer se črevo zelo razširi, črevesna stena pa se stanjša, zaradi česar lahko pride do nekroze in predrtja, kar zahteva kirurško odstranitev tako prizadetega dela črevesa. Z odstranitvijo celotnega debelega črevesa lahko bolnika z UK popolnoma pozdravimo. Z leti trajanja bolezni pa narašča tudi tveganje za nastanek črevesnega raka.

Slika 2: Vneti predeli črevesja pri ulceroznem kolitisu; povzeto po (4)

Preglednica II: Razlike v kliničnih znakih med Crohnovo boleznijo in ulceroznim kolitism (5).

Crohnova bolezen	Ulcerozni kolitis
V 80% primerov je prizadeto tanko črevo.	Prizadeto je samo debelo črevo.
V blatu ni prisotne krvi, razen če je prizadeto tudi debelo črevo.	V blatu je prisotna kri.
Vnetje prizadene celotno črevesno steno.	Vnetje je omejeno le na črevesno sluznico.
Področje prizadetosti je nezvezno.	Prizadetost je zvezna, od zadnjika proksimalno.
Prisotne so fistule, abscesi in spremembe okrog zadnjika.	Fistule se ne pojavljajo.
Pogosto so prisotni granulomi.	Granulomi se ne pojavljajo.
Zdravljenje z antibiotiki je uspešno.	Antibiotiki niso uspešni.
Po operacijah se bolezen povrne.	Operacija ozdravi bolezen.

Pri 35% bolnikov s KVČB, pogosteje pri bolnikih s CB, se pojavijo zunajčrevesni simptomi, kjer so lahko prizadeti: koža, sklepi, oči, jetra, srce, pljuča, koagulacija in prehitro staranje eritrocitov, kostni mozeg kot krvotvorni organ.

Preglednica III: Zunajčrevesni simptomi KVČB (1).

Organ	Zunajčrevesne manifestacije
Koža	Nodozni eritem, gangenozna piodermija
Sklepi	Poliartritis, monoartritis, sakroileitis
Oči	Iridociklitis, uveitis
Jetra	Sklerozantni holangitis
Srce	Perikarditis, miokarditis
Pljuča	Alveolitis, pljučna fibroza
Kri	Trombembolija, avtoimunska hemolitična anemija

1.1.4 Sindrom razdražljivega črevesa (SRČ)

Sindrom razdražljivega črevesa (SRČ) je najpogostejša funkcionalna motnja prebavil, za katero so značilne trebušne bolečine, ki jih spremljajo spremembe v pogostosti odvajanja in trdoti blata. Vzrok za nastanek bolezni je neznan, patofiziologija pa nepopolno pojasnjena. SRČ prizadene od 14 do 24% žensk in od 5 do 19% moških. Bolezen se razvije v poznih najstniških letih oz. v začetku dvajsetih let, redkejša pa je pri starejših ljudeh. Pogostejša je

v zahodnih državah. Glede na strukturo blata jo delimo v tri podskupine: SRČ s prevladujočo drisko, SRČ s prevladujočim zaprtjem in SRČ z izmenjavanjem driske in zaprtja (8, 9).

Glavni klinični znaki SRČ so: kronična bolečina v trebuhu, nelagodje in spremembe v pogostosti odvajanja ter strukturi blata, napihnjenost, močni vetrovi, občutek nepopolne izpraznitve in prisotnost sluzi v blatu. Pri bolnikih s hujšimi težavami, kot so: krvavitve, povišana telesna temperatura, povečana sedimentacija eritrocitov, izguba telesne teže, zastoj v rasti pri otrocih ter pozitivna družinska anamneza na organske črevesne bolezni (KVČB ali karcinom), je potrebno narediti natančnejši pregled (endoskopsko diagnozo), da se izključi organske bolezni (9).

Pri SRČ pogosto opazimo visceralno preobčutljivost na različne fizikalne in kemijske dražljaje. Receptorji v črevesni steni so preko nevronov povezani z avtonomnim črevesnim živčnim sistemom, ta pa preko simpatičnega in parasimpatičnega sistema s centralnim živčevjem. Zaradi te t.i. povezave možgani-črevo nekateri dražljaji vplivajo tudi na zavestno zaznavo, kar lahko povzroči občutek sitosti oz. potrebe po odvajanju. Lahko pa dražljaji potujejo tudi v obratni smeri, zato med vzroki za nastanek SRČ navajajo panično motnjo, depresijo, posttraumatsko stresno motnjo in močan stres. Pri nekaterih bolnikih so opazili netoleranco na saharide, laktozo, gluten, zelenjavo, ki povzroča napenjanje, itd. Zato je ustrezna dieta tudi eden od načinov zdravljenja. Tako npr. bolnikom z zaprtjem priporočajo uživanje večjih količin vlaknin (10, 11).

Vzroki bolezni so neznani, poznamo pa več različnih dejavnikov, ki pripomorejo k njenemu nastanku. Pri nekaterih bolnikih so odkrili neobičajno motoriko oz. peristaltiko črevesja. Tako je pri bolnikih z drisko prehajanje črevesne vsebine pospešeno, pri tistih z zaprtjem pa upočasnjeno.

Pri diagnozi SRČ v izvidih laboratorijskih testov, pregledov biopsij, ipd., ne opazimo sprememb fizioloških vrednosti. Diagnoza SRČ tako temelji na izključitvi bolezenskih stanj, ki povzročajo podobne simptome, ter na sledenju kriterijev ROMA. Osnovne preiskave, s katerimi skušamo izključiti organske vzroke prebavnih motenj, vključujejo: rdečo krvno sliko, sedimentacijo eritrocitov, biokemične preiskave (vključno z jetrnimi testi), pregled blata ali krvi na prisotnost parazitov in določanje ščitničnih hormonov (8).

Kot novejši pokazatelj pa se uporablja kalprotektin, določen v blatu. Ker z osnovnimi kliničnimi preiskavami težko postavimo pravilno diagnozo, je določanje kalprotektina v blatu primerna metoda za razlikovanje med organskimi in funkcionalnimi črevesnimi boleznimi. Kalprotektin se namreč pospešeno izloča pri vnetju črevesja, kar je značilno za KVČB, ne pa za SRČ, zato ga lahko izkoristimo tako za razlikovanje med njima kot za spremljanje bolezenskega stanja pri KVČB (12).

1.1.5 Zdravljenje KVČB

Crohnovo bolezen in ulcerozni kolitis uvrščamo med avtoimunske bolezni, ki jih zdravimo s klasičnimi protivnetnimi zdravili, imunosupresivi in biološkimi zdravili, katerih tarče so specifični imunski odzivi. Glede na to, s kako blago ali težko obliko bolezni so soočeni in kako veliko področje GIT je prizadeto, se zdravniki odločijo, katera zdravila bodo uporabili in na kakšen način jih bodo bolniki prejeli (peroralno, rektalno, z injekcijo ali infuzijo). Pri UK je v hujših oblikah bolezni, glede na prizadetost, učinkovita tudi kolektomija oz. kirurška odstranitev dela ali celotnega debelega črevesja.

1.1.5.1 Mehanizmi delovanja imunskega sistema v črevesju

Imunski sistem opravlja v črevesni sluznici zapletene naloge, saj se v črevesju poleg številnih neškodljivih snovi, med katere sodijo koristna hranila in normalna črevesna bakterijska flora, nahajajo tudi potencialno patogene in nepatogene bakterije. Imunski sistem mora zato pravilno prepoznati neškodljive oziroma koristne molekule in bakterije, hkrati pa ustrezno agresivno reagirati na škodljive snovi in mikrobo. Nepravilen imunski odziv lahko povzroči bodisi pretirano reakcijo na neškodljive antigene in tako izzove kronično vnetje, ali pa se prešibko odzove na mikrobo, zaradi česar se lahko oportunistični in patogeni mikroorganizmi lažje razmnožujejo (1, 6).

V črevesnem imunskem sistemu sodelujejo različne vrste celic, ki se nahajajo med epitelijskimi celicami in v lamini propriji. Mednje sodijo CD8⁺ intraepitelijski limfociti T, CD4⁺ limfociti T (Th1 in Th2), limfociti B, makrofagi, dendritične celice, polimorfonuklearni nevtrofilci in mastociti. Pridobljeni ali adaptivni imunski odziv se začne z aktivacijo limfocitov T, potem ko ti s svojimi T-celičnimi receptorji (TCR) specifično prepoznajo antigenske peptide, vezane na molekule poglobitnega kompleksa tkivne

skladnosti, izražene na antigene predstavljajočih celicah (APC), med katere sodijo dendritične celice, makrofagi in limfociti T. Antigene predstavljajoče celice zagotovijo tudi drugi, za aktivacijo limfocitov T nujno potreben kostimulatorni signal. Aktivirani limfociti T začnejo proizvajati citokine, ki so majhne beljakovinske molekule. Ti nastajajo v odzivih različnih vrst celic na tkivne poškodbe, vnetje ali prisotnost antigenov. Citokini skrbijo za uravnavanje vnetnega procesa tudi v črevesni sluznici. Delimo jih v dve nasprotno delujoči skupini: vnetne, med katere sodijo interleukini (IL-1, IL-2, IL-8, IL-12), tumorje nekrotizirajoči dejavnik alfa (TNF- α) in interferon gama (INF- γ) ter protivnetne, med katere uvrščamo interleukine (IL-4, IL-5, IL-10) ter transformirajoči rastni dejavnik beta (TGF- β) (1, 6, 7).

Pri normalnem imunskem odzivu na škodljive antigene pride v črevesni sluznici do aktivacije citotoksičnih CD8⁺ limfocitov T. Pri bolnikih s KVČB pa se v prisotnosti antigena aktivirajo predvsem CD4⁺ limfociti T, oziroma celice T pomagalka, ki jih delimo v več podskupin, med katerimi v tem primeru prevladujejo Th1, Th2 in Th3. Med njimi v normalnih pogojih obstaja recipročna, uravnotežena funkcijska povezava, ki pa je pri bolnikih s KVČB motena, zato pride do neravnovesja in posledične prevlade vnetnih citokinov, predvsem TNF- α , ki je pomemben regulator proizvodnje številnih drugih vnetnih citokinov (1, 6, 7).

1.1.5.2 Zdravila za zdravljenje KVČB

Zdravljenje KVČB se začne z jemanjem močnih protivnetnih zdravil, da se vnetje čim prej umiri, nato pa bolnik prejema blažja zdravila, s katerimi bolezen vzdržuje v remisiji. Med zdravilne učinkovine z izrazitim protivnetnim delovanjem štejemo spojine, ki so derivati 5-aminosalicilne kisline (5-ASA), med katere sodita sulfasalazin in mesalazin. Pri težjih oblikah, kjer remisijo težje dosežemo, pa dodatno uporabimo še kortikosteroide (prednizon), ki pa jih bolniki lahko jemljejo samo krajše obdobje, saj imajo hude, a predvidljive neželene učinke. Kortikosteroidi so protivnetna zdravila, ki delujejo sistemsko. Zavirajo tako razvoj in rast vnetnih celic v kostnem mozgu in njihovo migracijo na mesto vnetja kot tudi proizvodnjo in sproščanje vnetnih citokinov. Med njihovimi neželenimi učinki prednjačijo vplivi na presnovo kosti, maščob, mišic in na delovanje jeter (1).

Uporabljajo se tudi učinkovine z imunomodulatornim delovanjem, ki zmanjšujejo vnetje tkiva tako, da vplivajo na funkcije določenih populacij imunskih celic oz. na njihovo proizvodnjo topnih biogenih dejavnikov (citokinov). Zaradi tega imajo bolniki, ki taka zdravila prejemajo, oslabiljen imunski sistem, kar sicer poveča možnost okužb, vendar pa koristi obvladovanju KVČB. Kot imunomodulatorji se uporabljajo 6-merkaptopurin in metotreksat, ter biološka zdravila infliksimab, adalimumab in certolizumab. Med biološka zdravila uvrščamo novejšje skupine učinkovin, predvsem monoklonskih protiteles, ki jih, zaradi visokih stroškov, uporabljajo le v primerih, ko ostala farmakoterapija ne deluje dovolj dobro. Njihovo delovanje temelji na negativni regulaciji oz. blokadi vnetnih dejavnikov. Večinoma gre za monoklonska protitelesa, ki se specifično vežejo na določene citokine ali receptorje zanje. Večinoma je tarča njihovega delovanja TNF- α , ki ima najpomembnejšo vlogo v vnetnem procesu. Infliksimab je himerno mišje-človeško monoklonsko protitelo, ki se veže na topne in membransko vezane oblike TNF- α . Uporablja se za zdravljenje težjih oblik CB in UK. Je učinkovito in hitro delujoče zdravilo, ki pa lahko zato, ker vsebuje tudi beljakovine mišjega izvora, ob večkratni uporabi pri nekaterih od bolnikov izzove nastenek blokirajočih protiteles, kar seveda zmanjšuje njegovo učinkovitost. Adalimumab je človeško monoklonsko protitelo vrste IgG1, ki deluje enako kot infliksimab. Njegova imunogenost pa je zaradi prisotnosti izključno človeških beljakovin manjša, kot v primeru infliksimaba.

1.1.6 Diagnostika KVČB

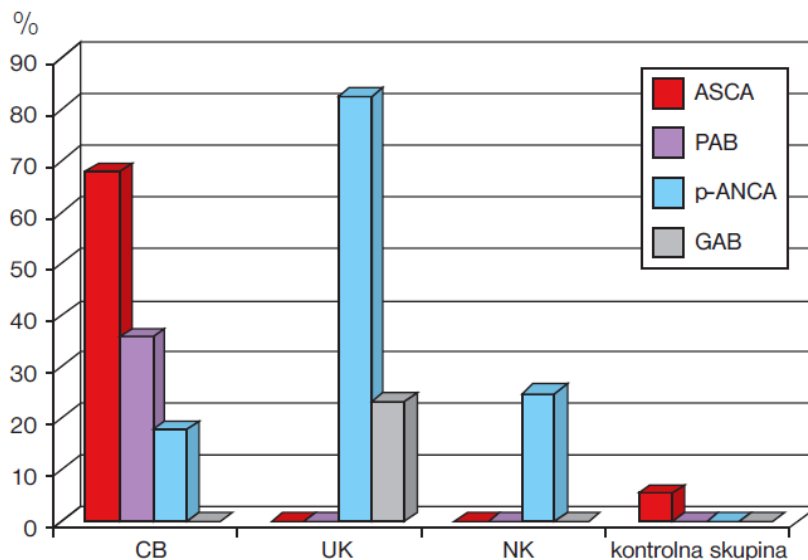
Klinična slika KVČB je zelo raznolika. Na začetku nima tipičnih znakov in zato lahko takrat razmišljamo o različnih možnih boleznih. Vse od njenega začetka pa je prisoten vsaj eden, ali pa več znakov, kot so: bolečina v trebuhu, driska, odvajanje krvavo sluzastega blata ali blata, pomešanega s krvjo (hematohezija). Pri kliničnem pregledu lahko zatipamo zatrdlino v trebušnem predelu, ki je lahko boleča. Med redkejše zgodnje znake, ki so sicer običajno prisotni šele potem, ko bolezen traja že dlje časa, sodijo pojavi fistul, analnih fisur in abscesov. Ker KVČB na začetku pogosto poteka asimptomatsko ali s prikritimi simptomi, bolnike ponavadi pregledajo šele ob pojavu težjih znakov, kot so povišana telesna temperatura, bolečine v sklepih, prizadetost oči in nastanek kožnih sprememb.

Za potrditev bolezni so pomembni predvsem anamnestični podatki, črevesni in redkeje zunajčrevesni simptomi oz. znaki bolezni. Potrebni so tudi ustrezni laboratorijski izvidi in

mikrobiološke preiskave. V pomoč so lahko razne slikovne preiskave, npr. ultrazvok trebuha, nekontrastno in kontrastno rentgensko slikanje črevesja, scintigrafija z označenimi levkociti in slikanje GIT z endoskopsko videokapsulo. Najuporabnejša metoda je endoskopski pregled zgornjega in spodnjega dela prebavnega trakta (13).

Izvidi laboratorijskih preiskav so običajno neznačilni in odvisni od intenzitete bolezni, stopnje krvavitve, obsega vnetja in malabsorbcije. Na laboratorijskih izvidih vidimo levkocitozo, trombocitozo, zvišano koncentracijo vnetnega dejavnika, C-reaktivnega proteina (CRP) in pospešeno sedimentacijo eritrocitov. S pregledom blata izključimo bakterijski, virusni ali parazitski vzrok diareje. Za potrditev ali izključitev vnetja v črevesju pa v vzorcih blata določamo vrednosti kalprotektina in laktoferina (14).

S serološkimi preiskavami preverjamo prisotnost perinuklearnih anti-nevtrofilnih citoplazemskih protiteles (p-ANCA), protiteles proti kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), protiteles proti eksokrinemu delu pankreasa (PAB) in protiteles proti čašastim celicam (GAB). Za bolnike s CB so značilni visoki titri protiteles anti-ASCA (67,9%) in nižji titri protiteles anti-PAB (35,7%), za tiste z UK pa visoki titri protiteles anti-p-ANCA (82,3%) in nizki titri protiteles anti-GAB (23,5%), ki pa so izrazito povezana z boleznijo. Vse štiri vrste protiteles imajo visoko specifičnost, a nizko občutljivost, zato je njihovo določanje primerno za razlikovanje med CB in UK, ne pa za ugotavljanje same prisotnosti ali odsotnosti KVČB (presejalni test za določanje KVČB v splošni populaciji) (15, 16).



Slika 3: Prevalenca protiteles pri bolnikih s Crohnovo boleznijo (CB), ulceroznim kolitisom (UK), nedeterminiranim kolitisom (NK) in kontrolno skupino; povzeto po (7).

Legenda: ASCA - protitelesa proti kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* ; PAB - protitelesa proti eksokrinemu delu pankreasa ; p-ANCA - perinuklearna anti-nevtrofilna citoplazemska protitelesa ; GAB - protitelesa proti čašastim celicam.

Ultrazvok je hitra in poceni preiskava, ki omogoča prikaz lokacije vnetnega dogajanja, debeline in strukture črevesne stene, ima pa to slabost, da je črevesje težko prikazati v celotni dolžini, znaki, ki jih na ta način vizualiziramo pa so lahko nespecifični.

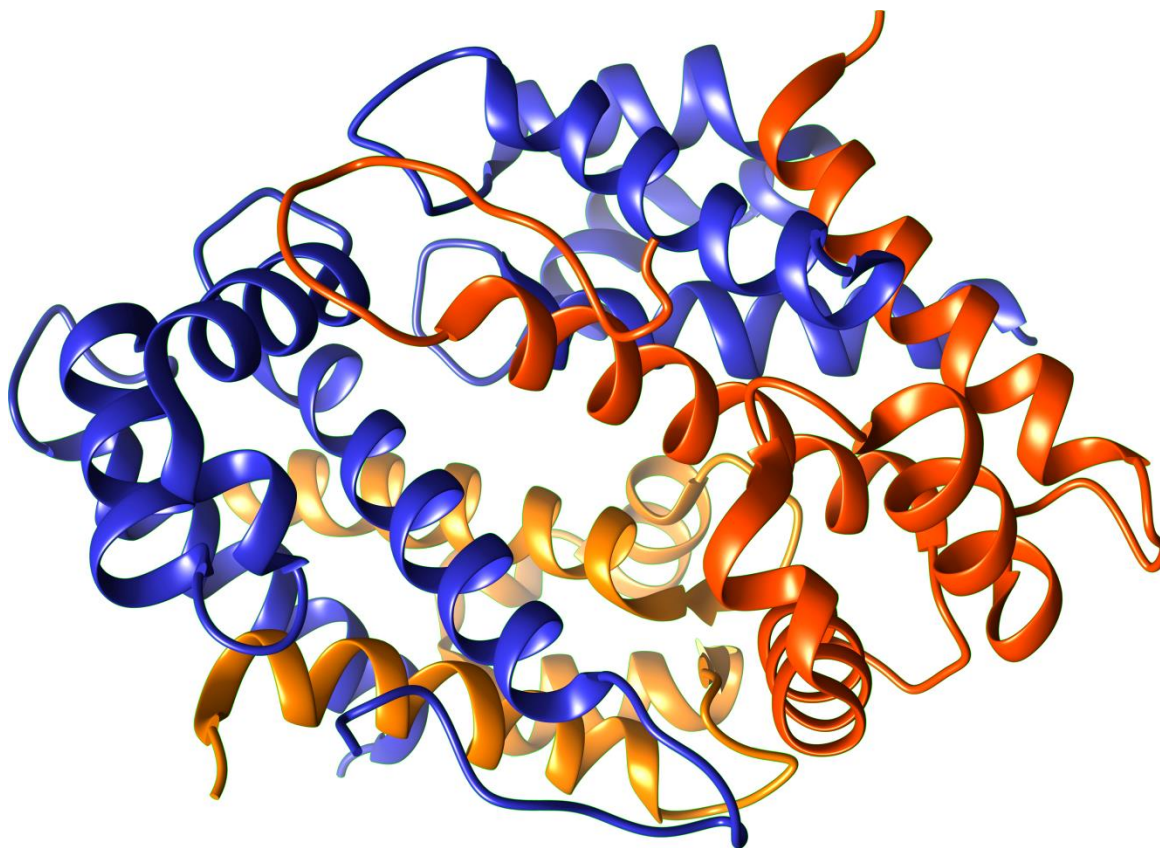
Endoskopija je najnatančnejša metoda za odkrivanje KVČB in za razlikovanje med CB in UK ter drugimi bolezenskimi stanji, ki imajo podobno klinično sliko, npr. infekcijske črevesne bolezni, okužba z virusom HIV, rakava obolenja, kolitis, povezan z jemanjem nesteroidnih antirevmatikov, ipd. Endoskopija nam omogoča tudi odvzem biopsije prizadetega dela črevesne sluznice in nato histološko analizo, s katero lahko ločimo med CB in UK, ugotovimo aktivnost bolezni in globino prizadetosti sluznice. Med aktivno fazo KVČB se v lamini propriji zbirajo nevtrofilci, limfociti in plazmatke, prisotni so abscesi črevesnih žlez, zmanjša pa se izločanje mucina. Za CB so značilni granulomi in neenakomerno vnetje sluznice. Slabi strani takšnega pregleda pa sta njegova invazivnost in cena preiskave. V uporabi je tudi kapsulna endoskopija, kjer pacient pogoltne kapsulo, v kateri je videokamera. To nam omogoči vizualni pregled celotnega prebavnega trakta. Dobra stran te preiskave je njena neinvazivnost, po drugi strani pa na ta način ne moremo odvzeti

bioptičnih vzorcev za histološki pregled. Pred to preiskavo moramo obvezno preveriti, da pacient v črevesju nima stenoz, saj bi sicer s kapsulo lahko povzročili črevesno zaporo (13).

V vzorcih blata lahko določamo količino kalprotektina, ki je pokazatelj vnetnega procesa v črevesju. V odzivu na prisotnost antigenov ga izločajo polimorfonuklearni levkociti, natančneje nevtrofilci. Pri pacientih z aktivno obliko KVČB je raven kalprotektina izrazito povišana, zato je dober biokemijski označevalec črevesnega vnetja.

1.1.7 Kalprotektin

Kalprotektin, ki ga označujejo tudi kot S100A8/S100A9, MRP-8/MRP-14, kalgranulin A/B ali antigen 27E10, je heterodimer (24 kDa), sestavljen iz dveh proteinskih monomerov, S100A8 in S100A9. Ima zelo visoko afiniteto za vezavo kalcijevih ionov, in sicer na skupno 4 mesta v posamezni molekuli. Vezava kalcija spremeni obliko molekule, kar omogoči vezavo cinkovih in manganovih ionov. Za učinkovito delovanje imunskega sistema pri sesalcih so značilne zelo nizke količine prostih prehodnih kovin. Zaradi sposobnosti vezave le-teh ima kalprotektin bakteriostatične in fungistatične lastnosti. Deluje tudi imunomodulatorno in antiproliferativno, na nevtrofilce pa kemotaktično (17, 18, 19).



Slika 4: Sekundarna struktura kalprotektina; povzeto po (20).

Kalprotektin predstavlja 5% vseh proteinov v telesu. Največ ga je v nevtrofilcih. V njih predstavlja kar 60% vseh citosolnih proteinov (21). Nevtrofilci izločajo kalprotektin v odzivu na vnetje in ob lastnem razpadu (apoptozi). V manjših koncentracijah se nahaja tudi na površini monocitov in aktiviranih makrofagov (18). Da se lahko sprosti pa mora kalprotektin na monocitih reagirati z aktiviranim žilnim endotelijem, kar pojasnjuje njegove povišane koncentracije v telesnih tekočinah (plazmi, slini in sinovialni tekočini) pacientov z akutno ali kronično vnetno boleznijo (19).

Klinični pregled bolnikov s KVČB slabo korelira z endoskopskim in histološkim pregledom za določanje stopnje aktivnosti črevesnega vnetja. Kolonoskopija z biopsijo velja za najboljšo oziroma najnatančnejšo metodo za določanje lokacije, obsega in resnosti črevesnega vnetja, predvsem pri bolnikih z UK. Poleg njene invazivnosti pa obstajajo še druge negativne lastnosti te preiskave, kot so dodatna tveganja in možnost zapletov pri posegu. Pri bolnikih s CB, kjer je vnetje prisotno tudi v tankem črevesju, je endoskopski pregled težje izvedljiv. Zato v takih primerih uporabljajo z indijem-111 (umetni izotop) označene levkocite. Žal pa je taka preiskava draga, bolnik je izpostavljen sevanju in le malo bolnišnic je ustrezno opremljenih za njeno izvajanje. Raven fekalnega kalprotektina se dobro ujema s količino z indijem-111 označenih nevtrofilcev, ki se po preiskavi izločijo z blatom. Raven kalprotektina v blatu je sorazmerna tudi s stopnjo vnetja, ki jo določijo z endoskopijo in histološkim pregledom. Omenjena korelacija pa je boljša v primeru histološkega pregleda, kar kaže na njegovo večjo občutljivost pri preiskovanju KVČB, v primerjavi z endoskopijo (18, 21).

Povišane vrednosti kalprotektina v blatu so dosti bolj natančen pokazatelj ponovitve bolezni (KVČB) od standardnih bioloških kazalnikov vnetja, med katere štejemo C-reaktivni protein (CRP), sedimentacijo eritrocitov in koncentracijo hemoglobina. Fekalni kalprotektin je torej uporaben za spremljanje vnetnega stanja pri KVČB in za razlikovanje med KVČB ter SRČ, s čimer se lahko izognemo invazivnim preiskavam. Pri SRČ lahko pogosto spremljamo podobne simptome kakor pri KVČB, vendar pa pri SRČ ni strukturnih črevesnih sprememb, ki bi te simptome povzročale. Nizke vrednosti kalprotektina v blatu precej zanesljivo kažejo na odsotnost organskih bolezni črevesja. Sicer pa je kalprotektin premalo specifičen, da bi ga lahko uporabljali za postavljanje diagnoz (19, 21).

Vrednost fekalnega kalprotektina dobro korelira z vnetjem in prehajanjem nevtrofilcev skozi črevesno steno, poleg tega pa je ta analit zelo stabilen, saj ne razpade niti po večdnevnom stanju pri sobni temperaturi, zaradi česar zbiranje in pošiljanje vzorcev v laboratorij ne terja posebnih pogojev (18, 22).

Določanje kalprotektina lahko uporabljamo za presejalno testiranje bolnikov s sumom na KVČB. Ker, kot smo že omenili, omogoča določanje njegove koncentracije v blatu razlikovanje med KVČB, SRČ in ostalimi črevesnimi boleznimi, s tem pa zmanjševanje števila potrebnih endoskopskih preiskav. Ocenjujejo, da naj bi tako pri odraslih potrebo po nadaljnjih endoskopijah zmanjšali za 2/3, pri otrocih in najstnikih pa za 1/3 (23).

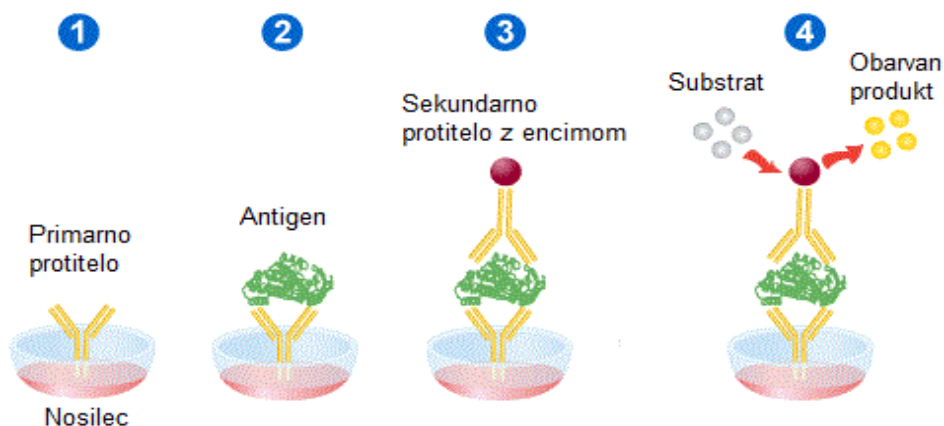
Kalprotektin je lahko uporaben tudi kot indikator drugih vnetnih reakcij. Po transplantacijah alogenskih organov se njegove serumske koncentracije naglo zvišajo takrat, kadar pride do bakterijskih okužb njihovih prejemnikov. Pri vnetju pljuč je po uporabnosti v razlikovanju med bakterijsko in virusno okužbo primerljiv s CRP. Njegove značilno povišane koncentracije so prisotne tudi pri življenjsko ogrožajočih okužbah, kot so septikemija, meningitis in pljučnice (19).

1.1.7.1 Metode določanja kalprotektina

Osnovna metoda določanja kalprotektina temelji na reakciji antigen - protitelo, pri čemer nastane reverzibilen imunski kompleks. Ta najpogosteje uporabljen analitski pristop omogoča kvalitativno in kvantitativno določanje antigenov ali specifičnih protiteles v bioloških vzorcih. Velika specifičnost reakcij med antigeni in protitelesi je idealna osnova za izvedbo različnih imunskih oz. seroloških testov.

Obstajajo hitri kvalitativni in semikvantitativni testi za določanje kalprotektina v blatu. Na testno ploščico, na katero so pritrjena protitelesa proti kalprotektinu kanemo ekstrakcijski pufer z analitom, ki ju kapilarno delovanje prenese preko testnih in kontrolnih polj. Ob prisotnosti kalprotektina pride na testnih poljih do obarvanja, kontrolne linije pa nam kažejo, ali smo test izvedli pravilno ali ne. Rezultate vrednotimo skladno z navodili proizvajalca testnega kompleta.

Za kvantitativno določanje kalprotektina uporabljamo metodo ELISA (encimski imunoadsorpcijski test), ki jo lahko izvedemo neposredno ali v obliki t.i. sendvič testa. V primeru slednjega so na nosilec vezana primarna protitelesa proti antigenu, torej kalprotektinu. Po dodatku vzorca, v katerem želimo določiti njegovo koncentracijo, nastane imunski kompleks. Po spiranju dodamo sekundarna protitelesa, na katerega je vezan encim, ki se prav tako vežejo na kalprotektin. Po dodatku substrata, ki reagira z encimom, dobimo obarvan produkt, ki mu izmerimo absorbenco pri določeni valovni dolžini. Ta je premosorazmerna s koncentracijo analita v vzorcu (17).



Slika 5: Shematski prikaz vezave protiteles in antigena pri metodi sendvič ELISA; povzeto po (24).

2 NAMEN DELA

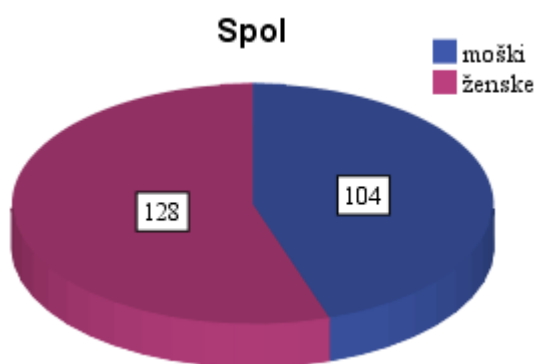
V zadnjih desetletjih je na področjih imunologije in genetike prišlo do izjemnega napredka pri razumevanju nastanka in poteka kroničnih vnetnih črevesnih bolezni (KVČB). Bolniki s temi boleznimi imajo stalno prisotne težave, ki močno zmanjšujejo kvaliteto njihovega življenja. Vse boljše poznavanje imunskih patoloških mehanizmov je privedlo do razvoja novih, predvsem bioloških zdravil in načinov zdravljenja KVČB. Ker so klasične diagnostične metode določanja in spremljanja tovrstnih bolezni invazivne in drage, iščejo nove, ki bi bile enako zanesljive, cenejše in bolj prijazne za paciente.

Namen naloge je primerjati koncentracije kalprotektina, določene v vzorcih blata bolnikov z različnimi črevesnimi boleznimi in s tem ugotoviti, ali se izmerjene koncentracije razlikujejo v posamezni skupini in če kažejo na aktivnost vnetnega procesa. Pokazati želimo, da je kalprotektin uporaben neinvazivni test za ločevanje med vnetnimi (KVČB) in nevnetnimi črevesnimi boleznimi. Zanimalo nas bo tudi, ali obstaja razlika v koncentraciji kalprotektina med glavnima predstavnikoma KVČB, torej med Crohnovo boleznijo in ulceroznim kolitisom.

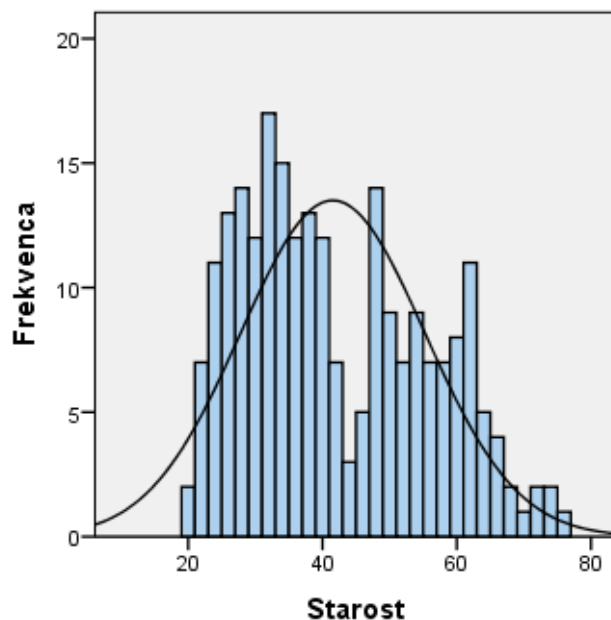
3 MATERIALI IN METODE

3.1 Vzorci

V raziskavi smo uporabili vzorce blata 232 bolnikov, in sicer 104 moških in 128 žensk (Slika 6). Crohnovo bolezen je imelo 99 bolnikov, 78 vzorcev je pripadalo bolnikom z ulceroznim kolitisom, za kontrolno skupino pa smo uporabili skupino 55 bolnikov brez KVČB, a s kakšno drugo nevnetno črevesno motnjo. Starostni razpon preiskovancev je bil med 20 in 75 let (Slika 7). Vzorce so zbrali na Gastroenterološki kliniki UKC Ljubljana, mi pa smo jih do analize shranili na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Slika 6: Število preiskovancev glede na spol.



Slika 7: Histogram, ki prikazuje frekvenčno porazdelitev preiskovancev glede na njihovo starost.

3.2 Oprema in materiali

Uporabljena oprema:

- laboratorijska tehnica
- pipete z nastavitvijo volumna od 10 do 1000 μ l,
- večkanalna pipeta,
- merilni valj,
- centrifuga,
- mešalec vortex,
- stresalnik za mikrotitrne plošče,
- spektrofotometer, (ACCESS IMMUNOASSAY SYSTEM, Beckam Coulter)
- testni komplet ELISA (HK325, Hycult biotechnology), ki vsebuje:
 - mikrotitrsko ploščico, prevlečeno s specifičnimi protitelesi,
 - koncentriran pufer za spiranje,
 - koncentriran ekstrakcijski pufer,
 - koncentrirana biotinizirana monoklonska protitelesa proti kalprotektinu,
 - kalibracijski standard (5 različnih koncentracij kalprotektina),
 - kontrolno raztopino,
 - koncentriran konjugat (encimsko označena protitelesa),
 - substrat (tetrametilbenzidin),
 - raztopino stop ELISA.

3.2.1 Priprava reagentov

Postopek priprave reagentov:

- Pufer za spiranje pripravimo z redčenjem koncentriranega pufra in destilirane vode, v razmerju 1 : 10.
- Ekstrakcijski pufer pripravimo z redčenjem koncentriranega pufra in destilirane vode, v razmerju 1 : 2,5.
- Konjugat pripravimo z redčenjem s pufrom za spiranje, v razmerju 1 : 1.000.
- Biotinizirana protitelesa pripravimo z redčenjem s pufrom za spiranje, v razmerju 1 : 1.000.

- Standardi in kontrola so v liofilizirani obliki in jih pred uporabo raztopimo v po 500 μ l destilirane vode.

3.3 Določanje koncentracij kalprotektina z metodo ELISA

Princip testa je sendvič ELISA, pri kateri uporabimo primarna in sekundarna monoklonska protitelesa, ki vežejo kalprotektin. Na dnu vdolbinic mikrotitrne ploščice so vezana primarna monoklonska protitelesa proti človeškemu kalprotektinu. Med prvo inkubacijo poteče vezava med temi protitelesi in kalprotektinom v dodanih vzorcih (standardi, kontrola in vzorci bolnikov). Med naslednjo inkubacijo, po predhodnem spiranju vdolbinic, pa vezava med kalprotektinom, vezanim na primarna protitelesa in biotiniziranimi sekundarnimi protitelesi. Po spiranju na biotinizirana sekundarna protitelesa vežemo ekstravidin, označen s peroksidazo. Tako nastane kompleks: primerno protitelo – kalprotektin – biotinizirano protitelo – konjugat ekstravidina in peroksidaze. Kot substrat uporabimo modro obarvan tetrametilbenzidin, ki ga peroksidaza pretvori v rumen produkt. Reakcijo ustavimo z alkalno raztopino stop reagenta. Intenziteto rumene barve izmerimo s spektrofotometrom pri 450 nm ter referenčno še pri 620 nm. Ta je premosorazmerna koncentraciji kalprotektina v vzorcu. Iz absorbanc različnih koncentracij standarda izdelamo umeritveno krivuljo, ki jo nato uporabimo za določanje koncentracij kalprotektina v preiskovanih vzorcih bolnikov.

3.3.1 Izvedba testa

Postopek izvedbe testa:

- Na mikrotitrski ploščici smo v dvojnikih označili položaje vdolbinic za različno koncentrirane raztopine standarda, vzorce in kontrolo.
- Vsako pozicijo smo petkrat sprali s po 250 μ l razredčenega pufru za spiranje. Po koncu spiranja smo ploščico obrnili in z nežnim udarcem po staničevini odstranili ostanke tekočine.
- V ustrezno označene vdolbinice smo odpipetirali po 100 μ l vzorcev, raztopin standarda in kontrole.
- Mikrotitrsko ploščico smo pokrili in jo inkubirali 1 uro na 37 °C.
- Nato smo aspirirali vsebine iz vseh vdolbinic in le-te sprali na enak način kot na začetku.

- Vanje smo dodali po 100 µl ustrezno pripravljenih biotiniliranih sekundarnih protiteles.
- Mikrotitrsko ploščico smo pokrili in jo ponovno inkubirali 1 uro na 37 °C.
- Po aspiriranju vsebine iz vdolbinic smo mikrotitrsko ploščico sprali na enak način kot v prejšnjem primeru.
- Nato smo v vdolbinice dodali po 100 µl konjugata ekstravidin-peroksidaza, mikrotitrsko ploščico pokrili in jo 1 uro inkubirali na 37 °C.
- Po končani inkubaciji smo vsebine iz vdolbinic aspirirali in mikrotitrsko ploščico sprali po ustaljenem postopku.
- V vsako vdolbinico smo odpipetirali po 100 µl substrata tetrametilbenzidina, za kar smo uporabili večkanalno pipeto, da smo se izognili različnim časom razvijanja barve po reakciji substrata z encimom.
- Mikrotitrsko ploščico smo inkubirali 15 minut v temi, pri sobni temperaturi.
- V vsako vdolbinico smo nato dodali po 50 µl stop raztopine in vsebine dobro premešali.
- Nato smo na spektrofotometru izmerili absorbance najprej pri 450 nm, potem pa še referenčno pri 620 nm.
- S pomočjo izmerjenih absorbanc raztopin z različnimi koncentracijami standarda (človeški kalprotektin) smo izdelali umeritveno krivuljo, ki nam je nato služila za določanje koncentracij kalprotektina v posameznih vzorcih preiskovanih bolnikov (Priloga IV).

3.4 Statistična analiza rezultatov

Pridobljene podatke in rezultate smo analizirali s programom SPSS (IBM SPSS Statistics, Version 21). Uporabili smo Kolmogorov–Smirnov test za ugotavljanje normalnosti porazdelitve podatkov, nato pa na podlagi njegovih izsledkov za primerjavo izmerjenih vrednosti v obeh skupinah bolnikov s kontrolnimi, izbrali Mann–Whitney-ev U test. Izvedli smo tudi analizo ROC (Receiver Operating Characteristic), s katero smo dobili podatke o površinah pod krivuljami in s tem o uspešnosti uporabljenih analiznih metod (AUC).

4 REZULTATI

4.1 Vzorci

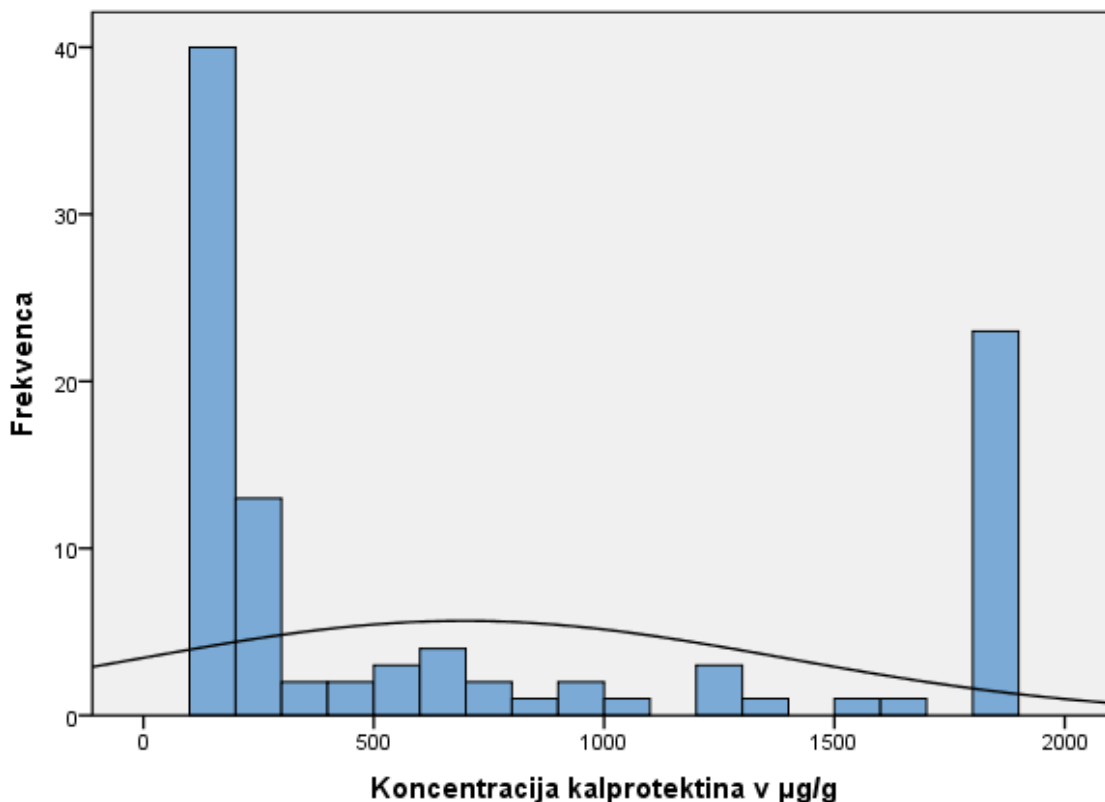
Opravili smo meritve skupno 177 vzorcev bolnikov s potrjeno KVČB. Med njimi jih je 99 imelo Crohnovo bolezen (CB), 78 pa ulcerozni kolitis (UK). V kontrolno skupino smo vključili 55 bolnikov z nevnetnimi črevesnimi zapleti. Starostni razpon preiskovancev s CB je bil med 20 in 75 let (povprečje 43 let), tistih z UK pa med 21 in 71 let (povprečje 42 let), in tistih v kontrolni skupini med 20 in 74 let (povprečje 37 let).

Preglednica IV: Prikaz preiskovancev v posameznih skupinah, glede na njihovo starost.

Diagnoza	Število pacientov	Starostni razpon	Povprečna starost
Crohnova bolezen	99	20–75	43
Ulcerozni kolitis	78	21–71	42
Kontrolna skupina	55	20–74	37

4.2 Rezultati merjenja koncentracij kalprotektina s testom ELISA

4.2.1 Crohnova bolezen

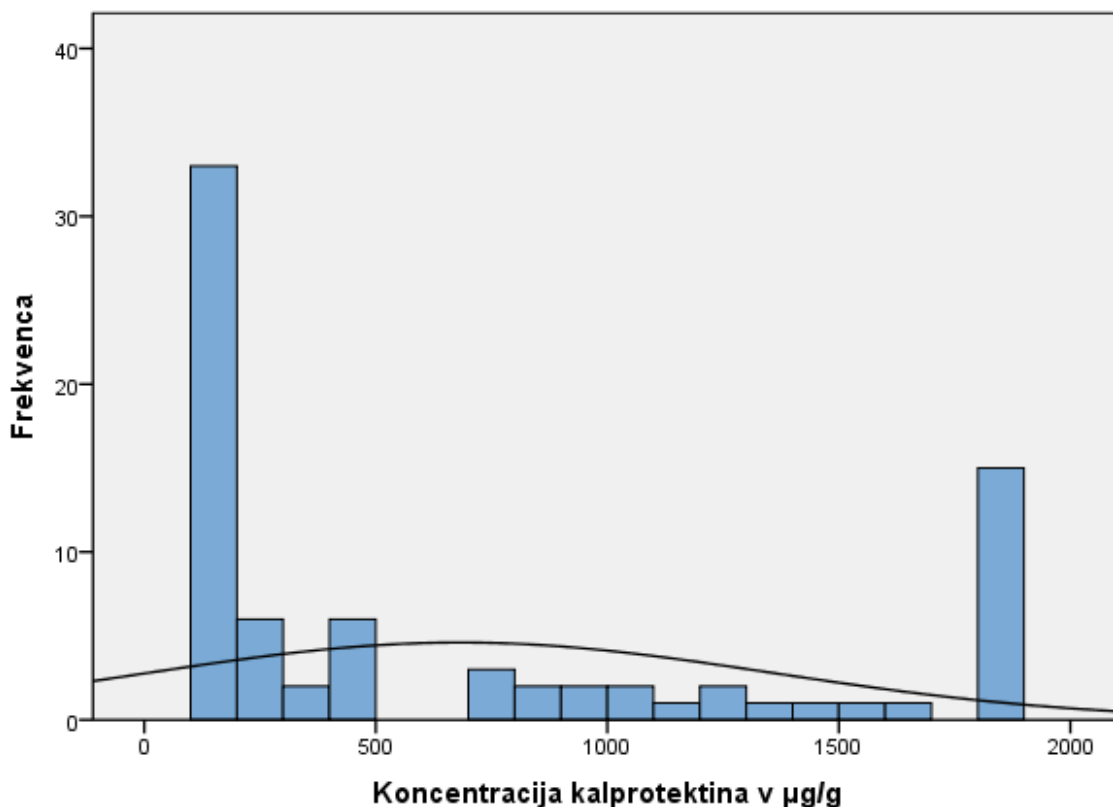


Slika 8: Frekvenčni histogram koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov s Crohnovo boleznijo

Preglednica V: Rezultati osnovne statistične analize koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov s Crohnovo boleznijo.

Koncentracija kalprotektina v µg/g	
Število vzorcev	99
Aritmetična sredina	694,00
Std. napaka povprečja (SEM)	70,110
Mediana	281,00
Std. deviacija (SD)	697,585
Varianca	486.625,217
Najnižja vrednost	100
Najvišja vrednost	1.800
Koeficient asimetrije	0,747
Std. napaka asimetrije	0,243
Koeficient sploščenosti	-1,211
Std. napaka sploščenosti	0,481

4.2.2 Ulcerozni kolitis

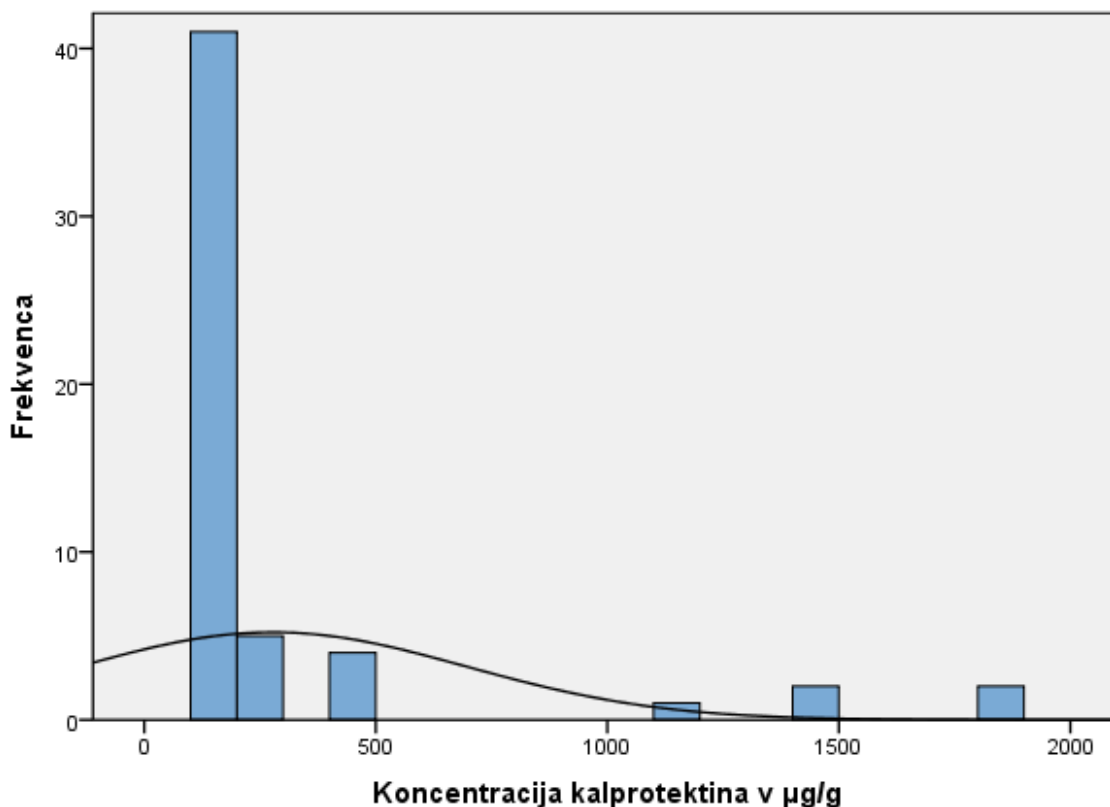


Slika 9: Frekvenčni histogram koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov z ulceroznim kolitisom.

Preglednica VI: Rezultati osnovne statistične analize koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov z ulceroznim kolitisom.

Koncentracija kalprotektina v µg/g	
Število vzorcev	78
Aritmetična sredina	682,00
Std. napaka povprečja (SEM)	76,474
Mediana	312,00
Std. deviacija (SD)	675,398
Varianca	456.161,945
Najnižja vrednost	100
Najvišja vrednost	1.800
Koeficient asimetrije	0,743
Std. napaka asimetrije	0,272
Koeficient sploščenosti	-1,134
Std. napaka sploščenosti	0,538

4.2.3 Kontrolna skupina



Slika 10: Frekvenčni histogram koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov iz kontrolne skupine.

Preglednica VII: Rezultati osnovne statistične analize koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih blata bolnikov iz kontrolne skupine.

Koncentracija kalprotektina v µg/g	
Število vzorcev	55
Aritmetična sredina	276,00
Std. napaka povprečja (SEM)	56,678
Mediana	100,00
Std. deviacija (SD)	420,337
Varianca	176.683,174
Najnižja vrednost	100
Najvišja vrednost	1.800
Koeficient asimetrije	2,814
Std. napaka asimetrije	0,322
Koeficient sploščenosti	6,976
Std. napaka sploščenosti	0,634

4.3 Statistična primerjava fekalnih koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih bolnikov iz vseh treh skupin

Kolmogorov-Smirnov test

Diagnoza	Statistika	Število meritev	Signifikantnost
Chronova bolezen	0,251	99	0,000
Ulcerozni kolitis	0,236	78	0,000
Kontrolna skupina	0,348	55	0,000

4.3.1 Primerjava med skupino bolnikov s CB in kontrolno skupino

Diagnoza	Število vzorcev	Povprečna stopnja	Seštevek stopenj
Chronova bolezen	99	89,19	8830,00
Kontrolna skupina	55	56,45	3105,00

Mann-Whitney U	1565,000
Wilcoxon W	3105,000
Z	-4,472
Asimptotska signifikantnost (2-stranska)	0,000

4.3.2 Primerjava med skupino bolnikov s UK in kontrolno skupino

Diagnoza	Število vzorcev	Povprečna stopnja	Seštevek stopenj
Ulcerozni kolitis	78	78,45	6119,00
Kontrolna skupina	55	50,76	2792,00

Mann-Whitney U	1252,000
Wilcoxon W	2792,000
Z	-4,191
Asimptotska signifikantnost (2-stranska)	0,000

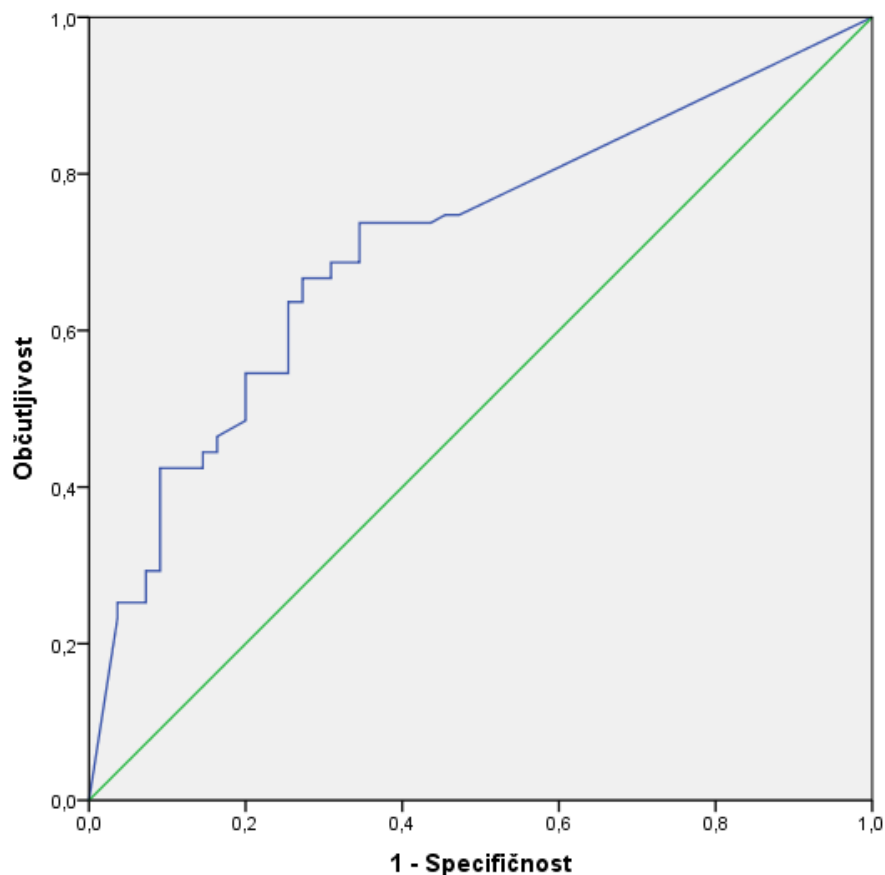
4.3.3 Primerjava med skupino bolnikov s CB in UK

Diagnoza	Število vzorcev	Povprečna stopnja	Seštevek stopenj
Chronova bolezen	99	89,65	8875,50
Ulcerozni kolitis	78	88,17	6877,50

Mann-Whitney U	3796,500
Wilcoxon W	6877,500
Z	-,193
Asimptotska signifikantnost (2-stranska)	0,847

4.4 Vrednotenje testa ELISA

4.4.1 Crohnova bolezen



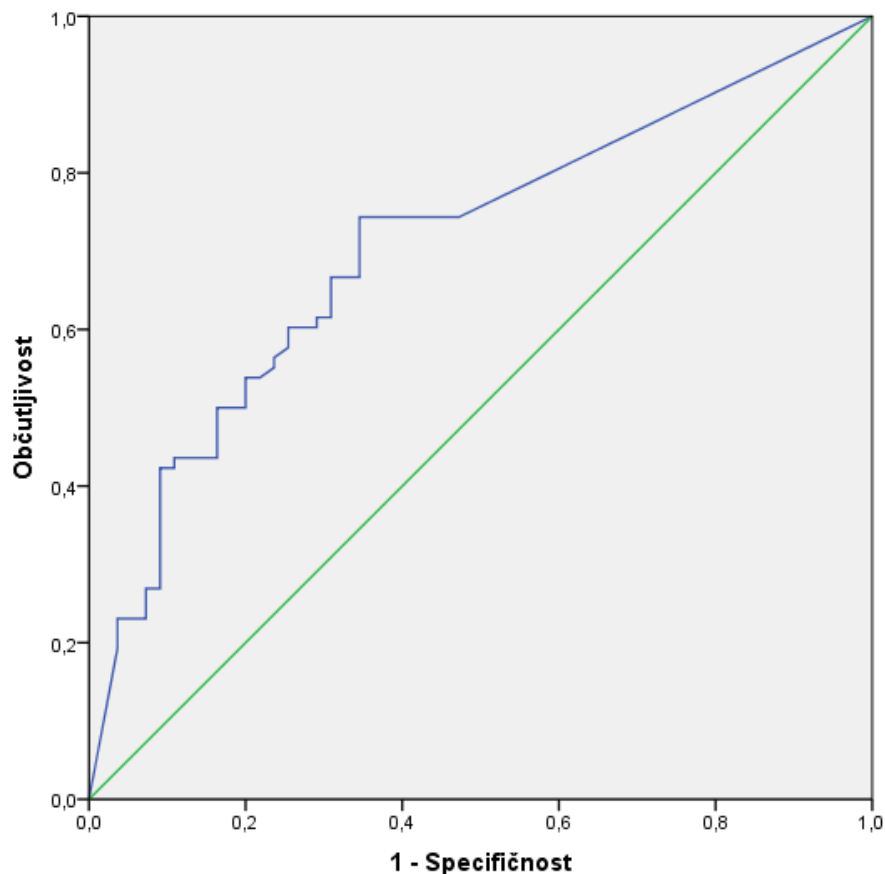
Slika 11: Krivulja ROC (ang. Receiver Operating Characteristic) za vrednotenje testa ELISA pri določanju fekalnih koncentracij kalprotektina v vzorcih blata bolnikov s Crohnovo boleznijo.

Preglednica VIII: Statistični podatki analize ROC za vrednotenje testa ELISA pri določanju fekalnih koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih bolnikov s Crohnovo boleznijo.

Površina pod krivuljo			
Testirana spremenljivka: koncentracija kalprotektina v $\mu\text{g/g}$			
Površina pod krivuljo (AUC)	Std. napaka	Asimptotski 95-odstotni interval zaupanja	
		Spodnja meja	Zgornja meja
0,713	0,042	0,630	0,795

Vrednosti koncentracij kalprotektina, določenih s testom ELISA so zbrane v Prilogi I.

4.4.2 Ulcerozni kolitis



Slika 12: Krivulja ROC (ang. Receiver Operating Characteristic) za vrednotenje testa ELISA pri določanju fekalnih koncentracij kalprotektina v vzorcih blata bolnikov z ulceroznim kolitisom.

Preglednica IX: Statistični podatki analize ROC za vrednotenje testa ELISA pri določanju fekalnih koncentracij kalprotektina, določenih v vzorcih bolnikov z ulceroznim kolitisom.

Površina pod krivuljo			
Testirana spremenljivka: koncentracija kalprotektina v $\mu\text{g/g}$			
Površina pod krivuljo (AUC)	Std. napaka	Asimptotski 95-odstotni interval zaupanja	
		Spodnja meja	Zgornja meja
0,708	0,045	0,620	0,797

Vrednosti koncentracij kalprotektina, določenih s testom ELISA so zbrane v Prilogi II.

5 RAZPRAVA

V Sloveniji imamo okoli 1.000 bolnikov z eno od oblik KVČB, njihovo število pa postopno narašča, in sicer predvsem tistih s Crohnovo boleznijo. V severni Evropi in ostalih zahodno evropskih državah pa je prevalenca KVČB še višja kot pri nas (1, 2).

Ker so klasične metode diagnosticiranja in spremljanja poteka KVČB zelo invazivne za bolnike in drage za zdravstveni sistem, se pojavljajo nove, s katerimi naj bi odpravili obe omenjeni težavi. Seveda pa morajo biti te najmanj enako zanesljive kot klasične. Mednje sodi tudi določanje fekalnih pokazateljev vnetja, laktoferina in kalprotektina.

Določanje slednjega smo uporabili v diplomski nalogi, ker nas je zanimalo, ali je primeren za spremljanje vnetja in razlikovanje med vnetnimi in nevnetnimi procesi v črevesju. Analizirali smo vzorce blata 177 bolnikov s KVČB, med katerimi je bilo 99 bolnikov s CB in 78 z UK. V kontrolno skupino pa smo uvrstili 55 bolnikov brez KVČB. V skupini bolnikov s CB je bila povprečna koncentracija kalprotektina 694,69 $\mu\text{g/g}$ blata (mediana 281,00 $\mu\text{g/g}$); v skupini z UK 682,28 $\mu\text{g/g}$ (mediana 312,00 $\mu\text{g/g}$), v kontrolni skupini pa 276,78 $\mu\text{g/g}$ (mediana 100,00 $\mu\text{g/g}$).

Za primerjavo rezultatov, določenih v posameznih skupinah smo uporabili neparametrični Mann-Whitneyjev U-test, s katerim statistično analiziramo njihove mediane. Ta test smo uporabili zato, ker smo predhodno s testom normalnosti (Kolmogorov-Smirnov test), v vseh treh preiskovanih skupinah bolnikov dokazali, da se fekalne koncentracije kalprotektina niso razporejale normalno ($P < 0,0001$).

Primerjali smo koncentracije kalprotektina, določene v posamezni skupini bolnikov s CB oz. UK s tistimi, izmerjenimi v kontrolni skupini. Ugotovili smo da se rezultati obeh skupin bolnikov s KVČB statistično značilno razlikujejo od tistih v kontrolni skupini ($P < 0,0001$). Nasprotno pa se koncentracije fekalnega kalprotektina, določene v skupinah bolnikov s CB in UK, med seboj niso statistično značilno razlikovale ($P = 0,847$).

Izvedli smo tudi analizo ROC za vrednotenje testa ELISA, uporabljenega za določanje kalprotektina v vzorcih blata bolnikov, s pomočjo katere smo izračunali površine pod krivuljami (AUC). Ta podatek nam pove, kako uspešna je metoda pri razlikovanju rezultatov

med dvema primerjanima skupinama. V našem primeru med skupinama bolnikov s CB in z UK ter kontrolno skupino.

Preglednica X: Kriteriji za vrednotenje uspešnosti metode, glede na velikost površine pod krivuljo ROC.

Površina pod krivuljo (AUC)	Opredelev
0,9–1,0	Odlična
0,8–0,9	Dobra
0,7–0,8	Srednja
0,6–0,7	Slaba
0,5–0,6	Neuporabna

Vrednosti AUC, ki smo ju dobili pri analizi ROC v skupinah bolnikov s CB in z UK, ob primerjavi s kontrolno skupino, sta bili 0,713 (CB) in 0,708 (UK). Obe vrednosti torej umeščata fekalni kalprotektin med pokazatelje, ki so srednje uporabni za razlikovanje bolnikov s KVČB od tistih, ki nimajo črevesnega vnetja. Eden od glavnih vzrokov za tak rezultat, ki je slabši od tistih, ki so jih dobili v podobnih študijah, je občutljivost uporabljenega testa ELISA. Meritveni razpon za določanje koncentracij kalprotektina je bil namreč med 100 in 1.800 µg/g blata. Zaradi tako visoke spodnje meje je bilo veliko meritev v obeh skupinah bolnikov s KVČB in tudi v kontrolni skupini na tem nivoju. Koncentracija fekalnega kalprotektina, ki je >100 µg/g je lahko prisotna tudi pri bolnikih, ki so v aktivni fazi KVČB ali imajo zaradi drugih vzrokov močno vneto črevesno sluznico. Vrednosti omenjenega nalita v zdravi populaciji pa se gibljejo okrog 11 µg/g (25). Naslednja pomanjkljivost naše naloge je nezadostna anamneza o stanju bolnikov v času testiranja. Dva bistvena podatka, ki sta nam manjkala za natančnejšo analizo, sta:

1. informacija, ali so bili bolniki s KVČB ob odvzemu vzorcev v aktivni fazi bolezni ali v remisiji, in
2. informacija, ali so v času testiranja jemali protivnetna zdravila, zaradi česar bi lahko bile koncentracije kalprotektina lažno nižje.

V podobni raziskavi, ki so jo izvedli Costa in sodelavci, so testirali uporabnost fekalnega kalprotektina kot neinvazivnega označevalca črevesnega vnetja. V raziskavo so vključili 131 bolnikov s KVČB, 26 s črevesnimi neoplazmami, 48 s sindromom razdražljivega črevesa in 34 zdravih oseb. Ugotovili so, da se je raven kalprotektina v blatu dobro ujemala z aktivnostjo KVČB in je omogočala tudi razlikovanje med bolniki, ki so bili v aktivni fazi bolezni in tistimi v remisiji (25).

Costa in sodelavci so tekom druge raziskave eno leto spremljali 79 bolnikov s KVČB, ki so bili v remisiji. Zanimalo jih je, kako uspešno je vrednotenje fekalnega kalprotektina glede na druge neinvazivne teste za spremljanje remisije in napovedovanja ponovnih zagonov bolezni. Spremljali so vrednosti CRP, sedimentacije eritrocitov (SR) in koncentracije fekalnega kalprotektina. Izkazalo se je, da ni bilo bistvenih razlik v vrednostih CRP in SR med bolniki v remisiji in tistimi z aktivno KVČB. Kalprotektin se je izkazal kot dober pokazatelj za razlikovanje med omenjenima fazama bolezni, še posebej pri bolnikih z UK (26).

Tibble in sodelavci so uporabili določanje fekalnega kalprotektina za: napovedovanje ponovnih izbruhov KVČB, razlikovanjem med KVČB in SRČ ter spremljanje odzivov bolnikov na terapijo. Ugotovili so, da vrednosti kalprotektina >50 mg/L kažejo na >80 % verjetnost, da bo bolezen prešla iz remisije v aktivno obliko v naslednjih nekaj mesecih. Tisti bolniki, ki so imeli normalne vrednosti kalprotektina niso imeli KVČB in zato ni bilo potrebe po nadaljnih preiskavah s kolonoskopijo ali radiologijo. Normalne vrednosti kalprotektina nakazujejo, da ima pacient s sindromi, značilnimi za KVČB, funkcionalno črevesno bolezen (27).

V okviru meta analize, ki jo je opravil van Rheezen s sodelavci, so pregledali rezultate 13 študij na temo diagnostične natančnosti uporabe fekalnega kalprotektina kot presejalnega testa za nadaljno endoskopijo. Vsega skupaj so v analizo zajeli 670 odraslih ter 371 otrok in najstnikov. Povprečni vrednosti občutljivosti presejalnega testa na osnovi določanja fekalnih koncentracij kalprotektina sta bili 0,93 pri odraslih ter 0,92 pri otrocih in najstnikih, njegovi povprečni specifičnosti pa 0,96 pri odraslih ter 0,76 pri otrocih in najstnikih. Ugotovili so, da bi z uporabo določanja fekalnega kalprotektina kot presejalnega testa, lahko zmanjšali

število nepotrebnih endoskopij za 67% pri odraslih in 35 % pri mladih bolnikih. Prav tako pa bi v tem primeru za 6 % odraslih in 8 % mladih postavili diagnozo KVČB kasneje (23).

6 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo želeli raziskati, ali je koncentracija fekalnega kalprotektina dober pokazatelj vnetnega dogajanja v črevesju. Potrditi ali ovreči smo želeli hipotezo, da je pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB) koncentracija fekalnega kalprotektina dober pokazatelj za razlikovanje med vnetnimi in nevnetnimi črevesnimi stanji. Zanimalo nas je tudi, ali lahko na podlagi omenjenih koncentracij ločimo Crohnovo bolezen (CB) od ulceroznega kolitisa (UK).

Ugotovili smo, da:

1. imajo bolniki s CB bistveno višje koncentracije fekalnega kalprotektina kot tisti v kontrolni skupini;
2. imajo bolniki z UK prav tako bistveno višje koncentracije fekalnega kalprotektina kot tisti v kontrolni skupini;
3. kalprotektin ni primeren za diagnosticiranje oziroma razlikovanje med CB in UK.

Z našimi izsledki smo prispevali k splošnemu pregledu odnosa med koncentracijami fekalnega kalprotektina in črevesnimi boleznimi. Za bolj natančno analizo bi potrebovali več dodatnih podatkov o bolnikih, predvsem o tem, ali je posamezen bolnik s KVČB v remisiji ali v aktivni fazi bolezni in ali v času testiranja jemlje protivnetna zdravila.

7 LITERATURA

- (1) Koželj M, Ferkolj I; Kronična vnetna črevesna bolezen, *Krka Med Farm* 2004; 10-47
- (2) Kocijančič A, Mrevlje F, Štajer D; *Interna medicina, Littera Picta* 2005
- (3) Smrekar N; Kronična vnetna črevesna bolezen, *Med Razgl* 2010; 49: 511-512
- (4) <https://medcoi.com/health/crohns-disease-and-ulcerative-colitis-differential-diagnosis> (2/4/16)
- (5) <https://www.merckmanuals.com/professional/gastrointestinal-disorders/inflammatory-bowel-disease-ibd/overview-of-inflammatory-bowel-disease> (2/4/16)
- (6) Bratkovič T, Biološke učinkovine pri zdravljenju Crohnove bolezni in ulceroznega kolitisa, *Farm Vestn* 2008; 59: 48-49,51
- (7) Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P; Focus on Mechanisms of Inflammation in Inflammatory Bowel Disease Sites of Inhibition: Current and Future Therapies, *Gastroenterology clinics of North America* 2006; 35(4): 743-746
- (8) <https://www.merckmanuals.com/professional/gastrointestinal-disorders/irritable-bowel-syndrome-ibs/irritable-bowel-syndrome-ibs> (15/5/16)
- (9) Orel R, Sindrom razdražljivega črevesa, *Med Razgl* 2010; 49: 479-485
- (10) <http://www.niddk.nih.gov/health-information/health-topics/digestive-diseases/irritable-bowel-syndrome/Pages/symptoms-causes.aspx> (15/5/16)
- (11) <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/irritable-bowel-syndrome/basics/treatment/con-20024578> (15/5/16)
- (12) Lewis J, The utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* 2011; 140: 1817-1826
- (13) Kocijanič B; Kronična vnetna črevesna bolezen, *Farm Vestn* 2008; 59: 43-45
- (14) Bukovnik N, Bizjak A, Pernat Drobež C, Skalicky M, Dinevski D; Telemedicinsko spremljanje bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo, *Informatica Medica Slovenica* 2012

- (15) Urlep-Žužej D, Dolinšek J, Mičetić-Turk D, Homšak E, Zagradišnik B; Klinična uporabnost seroloških označevalcev v diagnostiki kronične vnetne črevesne bolezni v pediatriji, *Zdrav Vestn* 2006; 75(Suppl. II): 5-13
- (16) Stöcker W, Otte M, Ulrich S, Normann D, Stöcker K, Jantschek G; Autoantibodies against the exocrine pancreas and against intestinal goblet cells in the diagnosis of Crohn's disease and ulcerative colitis, *Deutsche Medizinische Wochenschrift* 1984
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6150841>
- (17) HUMAN Calprotectin/S100A8/A9 ELISA Kit; Hycult biotechnology
- (18) Gaya DR, Mackenzie JF; Faecal calprotectin: a bright future for assessing disease activity in Crohn's disease, *Q J Med* 2002; 95: 557-558
- (19) Striz I, Trebichavský I; Calprotectin - a pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation; *Physiol Res* 2004; 53(3): 245-253
- (20) http://i0.wp.com/autoimmunityblog.com/wp-content/uploads/2013/11/calprotectin_structure.png (21/5/16)
- (21) Vieira A, et al; Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes, *BMC Research Notes* 2009; 2 :211
- (22) Carroccio A, et al; Diagnostic Accuracy of Fecal Calprotectin Assay in Distinguishing Organic Causes of Chronic Diarrhea from Irritable Bowel Syndrome: A Prospective Study in Adults and Children, *Clinical Chemistry* 2003; 49(6): 861-867
- (23) Van Rheeën PF, Van de Vijver E, Fidler V; Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis, *BMJ* 2010;341:c3369
- (24) <http://blog.leinco.com/wp-content/uploads/2010/06/sandwichELISA.gif> (22/5/16)
- (25) Costa F, et al; Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation, *Dig Liver Dis.* 2003; 35(9): 642-647
- (26) Røseth AG, Determination of faecal calprotectin, a novel marker of organic gastrointestinal disorders, *Dig Liver Dis.* 2003; 35(9): 607-609

- (27) Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Forgacs I, Bjarnason I; Use of surrogate markers of inflammation and Rome criteria to distinguish organic from nonorganic intestinal disease, *Gastroenterology* 2002; 123: 450-460

8 PRILOGE

Priloga I: Prikaz vseh rezultatov testa ELISA, določenih v vzorcih bolnikov s Crohnovo boleznijo.

Starost	Spol	Koncentracija ($\mu\text{g/g}$)	Diagnoza
56	Ž	100	Crohnova bolezen
26	M	100	Crohnova bolezen
53	Ž	100	Crohnova bolezen
62	Ž	100	Crohnova bolezen
56	M	100	Crohnova bolezen
51	M	100	Crohnova bolezen
57	M	100	Crohnova bolezen
60	M	100	Crohnova bolezen
35	M	100	Crohnova bolezen
36	M	100	Crohnova bolezen
33	Ž	100	Crohnova bolezen
42	Ž	100	Crohnova bolezen
64	Ž	100	Crohnova bolezen
50	M	100	Crohnova bolezen
42	M	100	Crohnova bolezen
51	Ž	100	Crohnova bolezen
25	M	100	Crohnova bolezen
67	Ž	100	Crohnova bolezen
55	M	100	Crohnova bolezen
62	M	100	Crohnova bolezen
23	Ž	100	Crohnova bolezen
64	Ž	100	Crohnova bolezen
38	Ž	100	Crohnova bolezen
32	M	100	Crohnova bolezen
50	M	100	Crohnova bolezen
48	M	108	Crohnova bolezen
47	Ž	117	Crohnova bolezen
59	M	119	Crohnova bolezen
32	M	126	Crohnova bolezen
57	M	128	Crohnova bolezen

33	M	129	Crohnova bolezen
62	Ž	140	Crohnova bolezen
75	M	147	Crohnova bolezen
49	M	169	Crohnova bolezen
25	Ž	172	Crohnova bolezen
53	M	172	Crohnova bolezen
47	M	182	Crohnova bolezen
22	Ž	184	Crohnova bolezen
24	M	193	Crohnova bolezen
52	M	197	Crohnova bolezen
61	Ž	201	Crohnova bolezen
35	M	203	Crohnova bolezen
28	M	203	Crohnova bolezen
42	M	208	Crohnova bolezen
50	Ž	208	Crohnova bolezen
74	Ž	228	Crohnova bolezen
20	M	264	Crohnova bolezen
57	Ž	272	Crohnova bolezen
44	M	279	Crohnova bolezen
36	Ž	281	Crohnova bolezen
39	Ž	281	Crohnova bolezen
34	M	282	Crohnova bolezen
65	Ž	299	Crohnova bolezen
51	Ž	320	Crohnova bolezen
37	Ž	338	Crohnova bolezen
66	M	459	Crohnova bolezen
22	Ž	466	Crohnova bolezen
45	Ž	523	Crohnova bolezen
23	Ž	538	Crohnova bolezen
38	M	585	Crohnova bolezen
37	M	603	Crohnova bolezen
53	M	611	Crohnova bolezen
60	Ž	661	Crohnova bolezen
46	Ž	667	Crohnova bolezen
45	Ž	771	Crohnova bolezen

26	Ž	796	Crohnova bolezen
36	Ž	840	Crohnova bolezen
49	M	911	Crohnova bolezen
62	M	916	Crohnova bolezen
31	Ž	1.079	Crohnova bolezen
28	M	1.264	Crohnova bolezen
47	Ž	1.284	Crohnova bolezen
32	Ž	1.297	Crohnova bolezen
28	Ž	1.301	Crohnova bolezen
69	M	1.548	Crohnova bolezen
31	M	1.604	Crohnova bolezen
28	M	1.800	Crohnova bolezen
33	Ž	1.800	Crohnova bolezen
60	M	1.800	Crohnova bolezen
57	Ž	1.800	Crohnova bolezen
39	Ž	1.800	Crohnova bolezen
35	Ž	1.800	Crohnova bolezen
65	M	1.800	Crohnova bolezen
23	Ž	1.800	Crohnova bolezen
22	Ž	1.800	Crohnova bolezen
29	M	1.800	Crohnova bolezen
30	M	1.800	Crohnova bolezen
39	Ž	1.800	Crohnova bolezen
26	M	1.800	Crohnova bolezen
29	M	1.800	Crohnova bolezen
47	M	1.800	Crohnova bolezen
48	Ž	1.800	Crohnova bolezen
34	Ž	1.800	Crohnova bolezen
50	M	1.800	Crohnova bolezen
29	M	1.800	Crohnova bolezen
34	Ž	1.800	Crohnova bolezen
25	Ž	1.800	Crohnova bolezen
31	Ž	1.800	Crohnova bolezen
28	M	1.800	Crohnova bolezen

Priloga II: Prikaz vseh rezultatov testa ELISA, določenih v vzorcih bolnikov z ulceroznim kolitisom.

Starost	Spol	Koncentracija ($\mu\text{g/g}$)	Diagnoza
28	M	100	Ulcerozni kolitis
41	M	100	Ulcerozni kolitis
57	Ž	100	Ulcerozni kolitis
27	Ž	100	Ulcerozni kolitis
29	Ž	100	Ulcerozni kolitis
21	M	100	Ulcerozni kolitis
37	Ž	100	Ulcerozni kolitis
45	M	100	Ulcerozni kolitis
35	M	100	Ulcerozni kolitis
38	Ž	100	Ulcerozni kolitis
54	Ž	100	Ulcerozni kolitis
56	Ž	100	Ulcerozni kolitis
50	Ž	100	Ulcerozni kolitis
33	M	100	Ulcerozni kolitis
35	M	100	Ulcerozni kolitis
39	M	100	Ulcerozni kolitis
51	Ž	100	Ulcerozni kolitis
24	M	100	Ulcerozni kolitis
37	M	100	Ulcerozni kolitis
34	M	100	Ulcerozni kolitis
36	Ž	117	Ulcerozni kolitis
38	Ž	119	Ulcerozni kolitis
63	M	119	Ulcerozni kolitis
71	Ž	122	Ulcerozni kolitis
51	Ž	125	Ulcerozni kolitis
55	M	129	Ulcerozni kolitis
48	Ž	138	Ulcerozni kolitis
30	M	138	Ulcerozni kolitis
39	Ž	140	Ulcerozni kolitis
38	Ž	142	Ulcerozni kolitis
60	M	150	Ulcerozni kolitis
60	Ž	197	Ulcerozni kolitis

33	Ž	198	Ulcerozni kolitis
31	Ž	212	Ulcerozni kolitis
25	Ž	218	Ulcerozni kolitis
32	M	224	Ulcerozni kolitis
26	Ž	242	Ulcerozni kolitis
29	Ž	242	Ulcerozni kolitis
63	M	257	Ulcerozni kolitis
31	M	367	Ulcerozni kolitis
23	Ž	388	Ulcerozni kolitis
37	M	416	Ulcerozni kolitis
53	M	417	Ulcerozni kolitis
26	Ž	423	Ulcerozni kolitis
56	Ž	474	Ulcerozni kolitis
50	Ž	492	Ulcerozni kolitis
53	M	493	Ulcerozni kolitis
48	Ž	704	Ulcerozni kolitis
35	M	736	Ulcerozni kolitis
33	M	756	Ulcerozni kolitis
61	M	842	Ulcerozni kolitis
32	Ž	883	Ulcerozni kolitis
38	Ž	900	Ulcerozni kolitis
25	Ž	979	Ulcerozni kolitis
47	Ž	1.026	Ulcerozni kolitis
42	Ž	1.032	Ulcerozni kolitis
47	Ž	1.128	Ulcerozni kolitis
51	Ž	1.245	Ulcerozni kolitis
42	M	1.266	Ulcerozni kolitis
59	Ž	1.367	Ulcerozni kolitis
67	Ž	1.480	Ulcerozni kolitis
61	Ž	1.511	Ulcerozni kolitis
62	M	1.664	Ulcerozni kolitis
50	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis
32	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis
39	M	1.800	Ulcerozni kolitis
55	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis

40	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis
46	M	1.800	Ulcerozni kolitis
25	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis
61	M	1.800	Ulcerozni kolitis
57	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis
40	M	1.800	Ulcerozni kolitis
53	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis
33	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis
21	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis
57	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis
27	Ž	1.800	Ulcerozni kolitis

Priloga III: Prikaz vseh rezultatov testa ELISA, določenih v vzorcih kontrolne skupine.

Starost	Spol	Koncentracija ($\mu\text{g/g}$)	Diagnoza
25	Ž	100	Kontrolna skupina
43	M	100	Kontrolna skupina
39	M	100	Kontrolna skupina
30	Ž	100	Kontrolna skupina
35	Ž	100	Kontrolna skupina
36	M	100	Kontrolna skupina
33	Ž	100	Kontrolna skupina
24	Ž	100	Kontrolna skupina
29	M	100	Kontrolna skupina
34	Ž	100	Kontrolna skupina
20	Ž	100	Kontrolna skupina
44	Ž	100	Kontrolna skupina
47	Ž	100	Kontrolna skupina
42	Ž	100	Kontrolna skupina
31	Ž	100	Kontrolna skupina
29	M	100	Kontrolna skupina
32	Ž	100	Kontrolna skupina
32	Ž	100	Kontrolna skupina
59	M	100	Kontrolna skupina
31	Ž	100	Kontrolna skupina
40	M	100	Kontrolna skupina
61	M	100	Kontrolna skupina
27	Ž	100	Kontrolna skupina
61	M	100	Kontrolna skupina
28	Ž	100	Kontrolna skupina
38	Ž	100	Kontrolna skupina
32	Ž	100	Kontrolna skupina
25	M	100	Kontrolna skupina
40	Ž	100	Kontrolna skupina
40	Ž	104	Kontrolna skupina
24	Ž	108	Kontrolna skupina
24	Ž	110	Kontrolna skupina
66	M	110	Kontrolna skupina

22	M	113	Kontrolna skupina
33	M	114	Kontrolna skupina
27	Ž	115	Kontrolna skupina
64	Ž	133	Kontrolna skupina
48	Ž	137	Kontrolna skupina
71	M	149	Kontrolna skupina
21	M	167	Kontrolna skupina
24	Ž	174	Kontrolna skupina
48	Ž	212	Kontrolna skupina
37	Ž	224	Kontrolna skupina
33	Ž	226	Kontrolna skupina
47	M	282	Kontrolna skupina
54	M	299	Kontrolna skupina
28	M	442	Kontrolna skupina
54	M	472	Kontrolna skupina
74	Ž	472	Kontrolna skupina
30	M	490	Kontrolna skupina
32	M	1.151	Kontrolna skupina
28	M	1.442	Kontrolna skupina
24	M	1.477	Kontrolna skupina
29	Ž	1.800	Kontrolna skupina
28	Ž	1.800	Kontrolna skupina

Priloga IV: Umeritvena krivulja za kalprotektin.

