

# Rola kalprotektyny oraz jej potencjalne zastosowanie w diagnostyce chorób psów i kotów

Olga Gójska-Zygnier, Anna Maria Zdebska, Daria Orzeł, Katarzyna Jaworska

z Labros – Specjalistycznej Przychodni Weterynaryjnej w Warszawie

Omówienie roli kalprotektyny oraz jej przydatności w diagnostyce chorób wymaga pewnego wprowadzenia na temat białek z rodziny S100. Nazwę „S100”, a właściwie „białko S-100” wprowadził Blake W. Moore w 1965 r. Wykrył on białko o niskim ciężarze cząsteczkowym, przemieszczające się szybciej od innych białek podczas elektroforezy w żelu skrobiowym. W badaniach Moore’a obecność tego białka stwierdzona została w homogenacie z mózgu, natomiast nie stwierdzono go w homogenacie z wątroby. Podczas próby izolacji białko, zamiast wytrącać się, ulegało rozpuszczeniu w nasyconym roztworze siarczanu amonu. Roztwór ten wykorzystywany jest do precipitacji białek jako pierwszy krok do ich oczyszczania, co możliwe jest dzięki wytrącaniu białek w tym roztworze. Ponieważ badane białko nie wytrącało się nawet w 100% roztworze siarczanu amonu, Moore nazwał je „białkiem S-100” (1). Odkryte dwa pierwsze białka z rodziny S100 nazywane są obecnie S100A1 i S100B (2).

## Białka S100

Rodzina białek S100 liczy obecnie co najmniej 25 różnych białek kodowanych przez geny z rodziny S100, z których większość znajduje się u człowieka na chromosomie pierwszym. Białka te należą do nadrodziny białek posiadających strukturalny motyw helisa-pętla-helisa wiążących jon wapnia, tzw. motyw EF-hand (2, 3, 4). Białka te mają niską masę cząsteczkową wynoszącą od 9 do 13 kDa (wg niektórych źródeł od 10 kDa do 12 kDa lub 14 kDa). Monomery białek S100 posiadają dwa wiążące wapń motywy EF-hand oraz dwa fragmenty hydrofobowe (2, 5, 6, 7). Związanie wapnia przez motyw EF-hand powoduje zmianę konformacji białka. Oprócz jonów wapnia różne białka z rodziny S100 mogą również wiązać jony cynku (np. S100A7), cynku i manganu (np. S100A8, S100A9), czy też jony cynku i miedzi (np. S100A12). Związanie tych, innych niż wapń, jonów metali powoduje zmianę konformacji białka, jednak inną niż po związaniu jonów wapnia (2, 8). Większość białek S100 występuje w postaci homodimerów, a jedynie niektóre z nich tworzą heterodimery (np. S100A/S100B), homotetramery (np. S100A3) bądź multimery (np. S100A4), czy też występują w postaci monomerów (np. S100G; 5).

Białka z rodziny S100 są białkami cytozoolowymi pełniącymi różne role zarówno wewnątrz- jak i zewnątrzkomórkowe (4). Przykładowo wewnątrzkomórkowo białko S100B reaguje z aneksyną A6 (białko zmieniające przepuszczalność błon na skutek zmiany wewnątrzkomórkowego pH oraz biorące udział

## Calprotectin and its potential use in diagnostics of canine and feline diseases

Gójska-Zygnier O., Zdebska A.M., Orzeł D., Jaworska K., Labros – Specialized Veterinary Surgery in Warsaw

Calprotectin is a heterodimer made of two calgranulins (S100A8 and S100A9). It is the main cytosolic protein of neutrophils. The protein has antimicrobial properties and mediates inflammatory response by activation of pro-inflammatory cytokines and chemokines. However, calprotectin also plays negative role in autoimmune diseases, and may induce cell proliferation in some cancers via RAGE (Receptor for the Advanced Glycation end Products) and NF-κB (Nuclear Factor kappa B). Calprotectin level determination in serum, stool and urine is used in diagnostics of various diseases in human medicine. Neutrophils play leading role in the release of calprotectin at sites of inflammation, and fecal calprotectin (FC) has long been considered as potential biomarker of colorectal polyps and cancer. However, there are only few studies in showing the use of calprotectin determination in dogs and cats diseases. This review presents role of calprotectin in the infections, inflammatory and neoplastic diseases, and its potential use in diagnostics of small animals diseases.

**Keywords:** calgranulin A/B, calprotectin, cat, dog, fecal calprotectin, biomarker.

w naprawie błon komórkowych), białko S100A14 hamuje nowotworzenie przez wpływ na białko p53 będące jednym z najważniejszych supresorów transformacji nowotworowej, natomiast białko S100A4 (kalwaskulina nazywana też metastazyną 1) reaguje z białkami, takimi jak tropomiozyna, niemięśniowa miozyna IIA oraz aktyna, promując migrację komórek i uczestnicząc w ten sposób w powstawaniu przerzutów nowotworowych (7, 9, 10, 11). Zewnątrzkomórkowo białka z rodziny S100 działają parakrynnie lub autokrynnie, np. białko S100A1 zwiększa napływ jonów wapnia do kardiomiocytów, białko S100A2 działa chemotaktycznie na eozynofile, natomiast białko S100A6 (kalcyklina) stymuluje wydzielanie insuliny (7). Białka S100 poprzez wpływ na różne mechanizmy biorą udział w regulacji apoptozy, proliferacji i różnicowaniu komórek, metabolizmu komórkowego, homeostazy wapnia, fosforylacji białek, indukcji procesu zapalnego i odpowiedzi immunologicznej na zakażenie (6, 7).

Białka należące do omawianej rodziny wykorzystywane są w diagnostyce różnych chorób u ludzi. Przykładem może być białko S100B, którego stężenie w surowicy i płynie mózgowo-rdzeniowym jest niewielkie, natomiast wzrasta w przypadku urazów czaszkowo-mózgowych (12). W związku z tym białko S100B wykorzystywane jest jako wysoce czuły i swoisty marker urazowego uszkodzenia mózgu, zwłaszcza w przypadku nieznacznych uszkodzeń, jako uzupełnienie badań

obrazowych. Białko to przydatne jest również w rokowaniu oraz ocenie efektywności leczenia uszkodzeń mózgu, a także może być przydatne w ocenie rozległości uszkodzenia (12, 13). Innym przykładem zastosowania białek z rodziny S100 w diagnostyce jest białko S100A6, którego stężenie wzrasta w przypadku raka żołądka, płuc, jajników i pęcherza moczowego. Ponadto poziom tego białka jest podniesiony u ludzi w przypadku ostrego zespołu wieńcowego oraz pierwotnego zapalenia dróg żółciowych (14). Kolejnym przykładem wykorzystania białek S100 w diagnostyce chorób jest oznaczanie w kale heterodimeru białkowego powstałego z połączenia białek S100A8 i S100A9, które pozwala na różnicowanie nieswoistego zapalenia jelit z zespołem jelita nadwrażliwego (7). Najlepiej poznanym białkiem z rodziny białek S100 jest kalwaszulina (S100A4), której poziom zewnątrzkomórkowy znacząco wzrasta w przypadku wielu nowotworów (raków różnych narządów, białaczek, czerniaka i innych). Białko to wykorzystywane jest w diagnostyce tych nowotworów oraz przewidywaniu przerzutów. Ponadto białko S100A4 jest markerem nefropatii toczniowej, a jako że uczestniczy w zwłóknieniu tkanek, wzrost ekspresji jego genu stwierdzano w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc, nadciśnieniu płucnym oraz przeroście mięśnia sercowego (7, 15).

### Alarminy

Warto wspomnieć, że białka z rodziny S100 wraz z niektórymi innymi białkami, peptydami i innymi cząsteczkami cytozolowymi (np. ATP, kwas moczowy), jądrowymi (np. niehistonowe białko chromosomalne HMGN1, białko HMGBl) oraz pochodzącymi z ziarnistości wewnątrzkomórkowych (np. granulizyna, defensyny) zaliczane są do tzw. alarmin (16). Termin „alarminy” wprowadzony został w 2005 r. przez autorów Oppenheim i Yang. Odnosił się do różnych białek, których wydzielanie zwiększa się gwałtownie na skutek zakażenia i/lub śmierci komórki, a białka te rekrutują i aktywują komórki prezentujące antygen. Jako że białka te odgrywają rolę wczesnych sygnałów ostrzegawczych aktywujących odpowiedź układu immunologicznego, nazwane zostały alarminami (17). Obecnie alarminy definiowane są jako aktywujące odpowiedź immunologiczną endogenne białka lub peptydy (czasem również inne cząsteczki) uwalniane na skutek degranulacji komórek, ich uszkodzenia lub śmierci, bądź też uwalniane są w wyniku indukcji odpowiedzi immunologicznej. Synonimem dla alarmin stosowanym w immunologii jest określenie wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem (DAMP, Damage-associated molecular patterns). Rolą alarmin jest chemotaktyczne działanie na leukocyty oraz ich aktywacja i stymulowanie uwalniania prozapalnych cytokin i chemokin, to istotna rola zarówno w odporności wrodzonej jak i nabytej (16).

### Kalgranuliny

W obrębie rodziny białek S100 wyróżnia się również niewielką grupę białek sensorycznych wykrywających wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia.

Białka te nazywane są kalgranulinami. Należą do nich kalgranulina A (białko S100A8), kalgranulina B (białko S100A9) oraz kalgranulina C (S100A12). Kalgranuliny oprócz swojej funkcji sensorycznej odgrywają również istotną rolę w reakcji układu odpornościowego na zakażenia (7). Wszystkie trzy kalgranuliny wytwarzane są stale wewnątrz neutrofilów (kalgranuliny A i B również wewnątrz monocytów, aktywowanych makrofagów i komórek dendrytycznych), natomiast w innych komórkach ich produkcja regulowana jest za pośrednictwem cytokin pro- i przeciwzapalnych (18, 19, 20, 21). Przykładowo produkcja kalgranuliny C przez keratocyty rogówki stymulowana jest przez cytokiny prozapalne, takie jak TNF- $\alpha$  i IL-1 $\alpha$  (22). Sama kalgranulina C aktywuje komórki tuczne oraz działa chemotaktycznie na monocyty i mastocyty (18). Z kolei bakteryjne lipopolisacharydy pośrednio indukują wydzielanie kalgranuliny A przez makrofagi. Wzrost produkcji kalgranuliny B obserwowano natomiast w zakażeniach spowodowanych wirusem grypy typu A oraz posocznicy spowodowanej zakażeniem *Klebsiella pneumoniae* (20). Białko S100A8 stymuluje produkcję cytokin TNF- $\alpha$  i IL-1 $\beta$  oraz działa chemotaktycznie na neutrofile. Natomiast kalgranulina B, podobnie jak kalgranulina A, bierze udział w migracji leukocytów, działając chemotaktycznie na neutrofile oraz zwiększa produkcję TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , a także produkcję prozapalnej cytokiny IL-6 oraz chemokiny IL-8 (7). Warto dodać, że same cytokiny prozapalne, takie jak TNF- $\alpha$  czy IL-1 $\beta$ , również zwiększają produkcję kalgranulin A i B (23). Kalgranuliny A i B oprócz indukowania stanu zapalnego za pośrednictwem prozapalnych cytokin i chemokin wykazują również działanie antibakteryjne przez zdolność wiązania jonów cynku (20). Kalgranulina A razem z kalgranuliną B tworzą wspomniany już wcześniej heterodimer białkowy S100A8/A9 nazywany kalprotektyną (24).

### Kalprotektyna

Jak już wcześniej wspomniano, kalprotektyna jest stale obecna w neutrofilach (cytoplazma) oraz monocytach (błony komórkowe). Inne nazwy stosowane dla kalprotektyny to, oprócz wspomnianego już heterodimeru białkowego S100A8/A9, antygen 27E10, antygen CF (cystic fibrosis), kalgranulina A/B, białko MRP-8/14 (myeloid-related protein), białko p8,14 czy białko L1 (25). Kalprotektyna została odkryta w 1980 r. przez norweskich naukowców Magne K. Fagerhol, Inge Dale oraz Terje Anderson. Białko to stanowiło około 5% białek granulocytów, a że wyizolowano je z leukocytów, nazwane zostało L1 (26). Z kolei w 1987 r. Dorin i wsp. uzyskali sekwencję nukleotydową, a następnie w oparciu o nią ustalono sekwencję aminokwasową antygeny CF (27). W tym samym roku Odink i wsp. wykazali, że wiążące wapń białka MRP-8 i MRP-14 ulegają ekspresji w makrofagach w przewlekłych zapaleniach (28). W 1988 r. Anderson i wsp. wykazali, że białko L1, antygen CF i kompleks białkowy MRP-8/14 są tym samym białkiem (29). W 1990 r. Steinbakk i wsp. zaproponowali nazwę „kalprotektyna” zamiast nazwy „białko L1”,

gdyż białko to wiązało wapń oraz wykazywało funkcje ochronne w hodowlach różnych patogenów, hamując wzrost *Candida* spp. i *Cryptococcus neoformans*, a w wyższych stężeniach hamowało również wzrost hodowli *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* oraz *Klebsiella* spp. (30). Obecnie nazwy „L1”, „antygen CF” czy „MRP-8/14” są rzadko stosowane, a najczęściej używane nazwy to „kalprotektyna” oraz „S100A8/A9” (21).

Pomimo wstępnych badań wskazujących na niską zawartość procentową kalprotektyny w granulocytach (26) obecnie wiadomo, że białko to stanowi około 45% białek cytoplazmatycznych neutrofilów, natomiast jego zawartość w monocytach jest około 40-krotnie niższa (31). Wyniki odnoszące się do dokładnej lokalizacji omawianego białka nie są do końca zgodne. Według Stroncek i wsp. kalprotektyna obecna jest w błonie komórkowej, cytoplazmie i ziarnistościach granulocytów obojętnochłonnych (32). Sprenkeler i wsp. wykazali natomiast, że heterodimer S100A8/A9 nie jest obecny w ziarnistościach neutrofilów, lecz w samej cytoplazmie tych komórek, a jej zewnątrzkomórkowe stężenie nie wzrasta na skutek degranulacji neutrofilów (33). Jak wcześniej wspomniano, omawiając produkcję kalgranuliny, kalprotektyna ulega stałej ekspresji wewnątrz niektórych komórek układu odpornościowego. Białko S100A8/A9 może również być produkowane w innych komórkach, czego stymulatorem mogą być różni patogeny i mediatory zapalenia (21, 25).

## Rola w zakażeniach

Wewnątrzkomórkowo kalprotektyna, oprócz wspomnianej już sensorycznej dla wapnia roli kalgranuliny, bierze udział w reorganizacji cytoszkieletu oraz metabolizmie kwasu arachidonowego (20). Reorganizacja cytoszkieletu leukocytów umożliwia ich migrację do miejsca zakażenia i/lub zapalenia, fagocytozę, czy też wydzielanie ziarnistości litycznych zawierających perforynę i granzymy do synapsy immunologicznej powstającej po połączeniu komórki cytotoksycznej z patogenem lub inną komórką przeznaczoną do zabicia (34). W migracji neutrofilów i monocytów do przestrzeni pozanaczyniowej biorą udział również integryny (transbłonowe białka adhezyjne uczestniczące w przyleganiu komórek do innych komórek lub macierzy zewnątrzkomórkowej), których zwiększona ekspresja indukowana jest przez kalgranuliny A i B, jak również przez niektóre chemokiny, np. CCL25 czy CCL28 (21, 35, 36, 37). W przyleganiu leukocytów do komórek śródbłonka naczyń krwionośnych i dalszej ich migracji do przestrzeni pozanaczyniowej bierze udział podjednostka S100A9 kalprotektyny reagująca z proteoglikanami glikokaliksu śródbłonka. Ponadto receptorami dla kalprotektyny są również RAGE (receptor for the advanced glycation end products; receptor końcowych produktów zaawansowanej glikacji), TLR4 (Toll-like receptor 4), CD33 (cluster of differentiation; antygen różnicowania komórkowego) oraz CD36 (7, 25, 38). Receptor CD33 jest transbłonową glikoproteiną, dla której – oprócz S100A9 – ligandem jest

kwas sjałowy (39). Z receptorem CD36 kalprotektyna reaguje prawdopodobnie po związaniu z wielonienasyconymi kwasami tłuszczowymi, ułatwiając wychwytywanie tych kwasów tłuszczowych przez komórki śródbłonka (21). Receptory dla kalprotektyny oraz efekt ich aktywacji przedstawiono w tabeli 1. Według Striz i Trebichavský (25) kwas arachidonowy może również indukować wiązanie kalprotektyny z komórkami śródbłonka naczyń włosowatych. Sama kalprotektyna może natomiast indukować uszkodzenie i śmierć komórek śródbłonka, odgrywając rolę w zapaleniu naczyń i innych waskulopatiach (40). Uwalniania z neutrofilów kalprotektyna prowadzi do dalszej aktywacji kolejnych neutrofilów (33).

Wspomniana już zdolność kalprotektyny do wiązania nienasyconych kwasów tłuszczowych, takich jak kwas arachidonowy czy oleinowy, wpływa na ich metabolizm, a równocześnie same nienasycone kwasy tłuszczowe wpływają na zmianę struktury podjednostek kalprotektyny (20, 41). Kwas arachidonowy jest ważnym składnikiem błon komórkowych odgrywającym istotną rolę m.in. w regulacji ich płynności i przepuszczalności, działaniu kanałów i receptorów błonowych, powstawaniu wolnych rodników tlenowych czy syntezie tlenu azotu, co wpływa na prawidłowe działanie układu nerwowego, mięśni, układu krążenia oraz odpowiedzi immunologicznej (42, 43). Ponadto kwas arachidonowy wykazuje działanie bójcze względem bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, grzybów oraz wirusów osłonkowych. To działanie kwasu arachidonowego wynika z różnych mechanizmów wpływających na przepuszczalność błon komórkowych i różne procesy wewnątrzkomórkowe, takie jak odychanie komórkowe, transport aminokwasów czy fosforylacja oksydacyjna (44).

Kalprotektyna, jako białko wiążące jony cynku, zewnątrzkomórkowo ogranicza działanie metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej (enzymów proteolitycznych zwanych matryksynami biorących udział w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej, trawiących kolagen czy elastynę) odgrywających istotną rolę w embriogenezie, morfogenezie, angiogenezie czy gojeniu ran, a w stanach patologicznych również w patogenezie zapalenia stawów, nowotworzeniu, chorobach sercowo-naczyniowych i neurologicznych (25, 45, 46). Jak już wcześniej wspomniano, kalprotektyna dzięki zdolności wiązania jonów cynku wykazuje również działanie ograniczające wzrost drożdżaków, gronkowców czy pałeczki okrężnicy (25).

Tabela 1. Receptory dla kalprotektyny oraz efekty ich działania

Receptor	Efekt
TLR4	produkcja cytokin prozapalnych
RAGE	aktywacja czynnika transkrypcyjnego NF-κB
CD36	wzrost wychwytywania kwasu arachidonowego przez komórki śródbłonka
CD33	aktywacja mieloidalnych komórek supresorowych

Objaśnienia: TLR4 – Toll-like receptor 4; RAGE – receptor for the advanced glycation end products; CD36 – cluster of differentiation 36; CD33 – cluster of differentiation 33



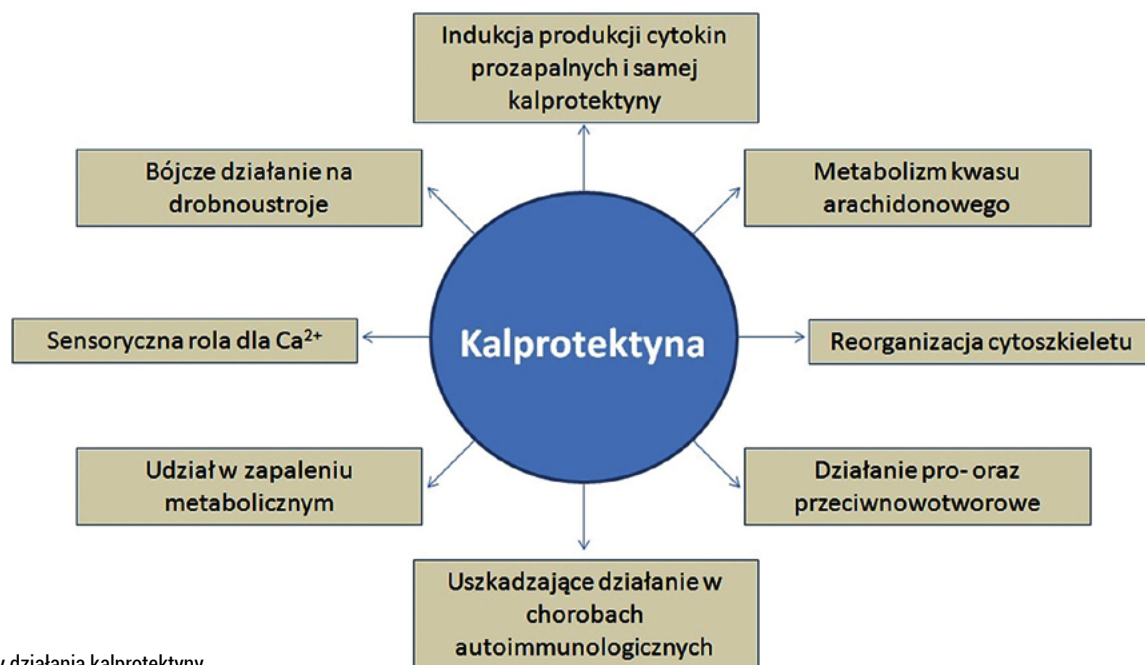
Nisapakultorn i wsp. dowiedli również, że komórki nabłonkowe wykazujące ekspresję genów dla białek S100A8 i S100A9 hamowały przyleganie i wiązanie do nich takich bakterii, jak *Listeria monocytogenes* czy *Salmonella enterica* (47). Ponadto kalprotektyna, działając zewnątrzkomórkowo, reaguje z receptorami TLR4 monocytów, zwiększając produkcję TNF- $\alpha$  oraz innych cytokin prozapalnych (40). Produkcja cytokin takich jak TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 oraz IL-18, a także dalsza produkcja kalprotektyny odbywają się za pośrednictwem receptorów TLR4 i RAGE, a następnie czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B), który po aktywacji polegającej na fosforylacji i odłączeniu inhibitora NF- $\kappa$ B przemieszcza się z cytoplazmy do jądra komórkowego i wiąże z określoną sekwencją DNA. To z kolei prowadzi do ekspresji określonego genu. W ten sposób kalprotektyna, działając parakrynnie i autokrynnie na zasadzie sprzężenia zwrotnego dodatniego, prowadzi do nadprodukcji S100A8/A9 (48, 49, 50). Nadekspresja kalprotektyny w makrofagach zwiększa zewnątrzkomórkową produkcję wolnych rodników tlenowych, choć równocześnie prowadzi też do zwiększenia produkcji IL-10 (51). IL-10 natomiast jest główną cytokiną przeciwzapalną ograniczającą odpowiedź immunologiczną na zakażenie, chroniąc w ten sposób tkanki przed uszkadzającym działaniem układu odpornościowego (52).

Pomimo zdolności kalprotektyny do ograniczania wzrostu różnych patogenów oraz bójczego działania na te drobnoustroje jej wyższy poziom w surowicy – w porównaniu do pacjentów z sepsą, których udało się uratować – stwierdzano u ludzi z posocznicą, którzy nie przeżyli choroby (40). Li i wsp. wykazali, że w komórkach nabłonkowych jelita świń z uszkodzeniem indukowanym przez toksynę *Clostridium perfringens* białko S100A9 wpływało na ekspresję prozapalnych cytokin i chemokin, zwiększało tlenowe uszkodzenie komórek oraz promowało ich apoptozę (53). Według Ehrchen i wsp. blokada

aktywności kalprotektyny, bądź też blokada jej wydzielania, mogłyby stanowić istotny element w leczeniu posocznicy (40). Potwierdzeniem tych przypuszczeń mogą być wyniki badań Guo i wsp., którzy wykazali, że w przebiegu zakażenia koronawirusem SARS-CoV-2 dochodzi do aktywacji niedojrzałych neutrofilów z niską ekspresją antygeny Ly-6G, za co najprawdopodobniej odpowiadała aktywacja receptorów TLR4 za pośrednictwem kalprotektyny (54). Autorzy wykazali, że u myszy zakażonych SARS-CoV-2 zahamowanie osi S100A8/A9 – TLR4 (Paquinimod – inhibitor wiązania S100A9 do receptora TLR4) ogranicza nieprawidłową odpowiedź immunologiczną (aktywację niedojrzałych neutrofilów), replikację wirusa i śmiertelność (54, 55).

### Rola w chorobach autoimmunologicznych

Kalprotektyna, oprócz udziału w odpowiedzi immunologicznej na zakażenie, bierze również udział w patogenezie chorób o podłożu autoimmunologicznym oraz chorób nowotworowych (ryc. 1; 21, 40). Jej zwiększone stężenie w surowicy obserwowano m.in. u ludzi z reumatoidalnym zapaleniem stawów, toczeniem rumieniowatym układowym, zespołem Sjögrena (autoimmunologiczne zapalenie tkanki łącznej z uszkodzeniem nabłonka gruczołowego, a zwłaszcza gruczołów łzowych i ślinianek), spondyloartropatiami czy łuszczycowym zapaleniem stawów (48, 56, 57). Wykryto również dwukrotnie wyższe średnie stężenie kalprotektyny w surowicy pacjentów z miastenią w porównaniu do osób zdrowych (58). Jednak w przypadku celiakii wyniki badań są sprzeczne. W dwóch pracach stwierdzono wyższe stężenie kalprotektyny w kale u dzieci z nieleczoną chorobą trzewną w porównaniu do dzieci zdrowych oraz dzieci z celiakią stosujących dietę bezglutenową (59, 60). W innych pracach natomiast nie stwierdzono różnic w stężeniach kalprotektyny w kale u osób dorosłych z nieleczoną celiakią w porównaniu do osób zdrowych (61,



Ryc. 1. Wybrane efekty działania kalprotektyny

62). W niedawno opublikowanych wynikach badań z Polski również wykazano brak istotnych różnic w stężeniach kalprotektyny w kale u dzieci z nieleczoną (dopiero rozpoznaną) celiakią w porównaniu do dzieci chorych stosujących dietę bezglutenową (63). Według Capone i wsp. oznaczanie kalprotektyny w kale nie znajduje zastosowania w diagnostyce celiakii oraz ocenie stopnia zmian jelitowych w tej chorobie (62). Porównanie tych badań pokazuje, że w niektórych chorobach o podłożu autoimmunologicznym kalprotektyna prawdopodobnie nie odgrywa istotnej roli. Szaflarska-Popławska i wsp. zwracają uwagę, że rozbieżności w wynikach badań mogą również wynikać z wieku pacjentów (w tym również różnic w wieku dzieci w grupach badanych i kontrolnych), który wpływa na poziom kalprotektyny w kale i wyższy jest u dzieci poniżej piątego roku życia (63). Badania Roca i wsp. pokazują, że poziom kalprotektyny w kale u dzieci stopniowo obniża się od momentu urodzenia do 16. roku życia, a wyraźny spadek obserwowany jest do 11. roku (64, 65). Należy jednak podkreślić, że najbardziej znaczący spadek stężenia kalprotektyny w kale u dzieci następuje po ukończeniu pierwszego roku życia, kiedy to stężenie obniża się 3–4-krotnie (66). Warto również dodać, że u zdrowych dorosłych osób poziom kalprotektyny w kale wzrasta wraz z wiekiem (67).

Przykładem uszkadzającego działania kalprotektyny w chorobach autoimmunologicznych może być reumatoidalne zapalenie stawów, w którego przebiegu kalprotektyna osiąga wysokie stężenia w błonie maziowej i mazi stawowej, a produkowana jest przez makrofagi, granulocyty, fibroblasty i chondrocyty. Związanie ligandów z TLR4 (w tym kalprotektyny) stymuluje proliferację fibroblastów, produkcję IL-6 oraz dalszą produkcję S100A8/A9. Degranulacja granulocytów oraz różnicowanie i aktywacja osteoklastów za pośrednictwem TLR4 oraz kalgranuliny A prowadzą odpowiednio do uszkodzenia chrząstki i resorpcji kości (48). U pacjentów z łuszczycą również wykazano, że kalprotektyna jest jednym z czynników postępu choroby. Białko to zwiększa ekspresję składowej C3 dopełniacza oraz aktywuje składowe C3 i czynnik B (składowa alternatywnej drogi aktywacji dopełniacza). Dopełniacz natomiast jest istotnym elementem procesu zapalnego w przebiegu łuszczycy. U chorych z łuszczycą główną rolę odgrywa klasyczna droga aktywacji dopełniacza, choć wykazano, że aktywacja drogi alternatywnej również ma swój udział w rozwoju procesu zapalnego. Oprócz dopełniacza istotną rolę odgrywają również cytokiny prozapalne, których wzrost prowadzi do zwiększenia ekspresji białka S100A8/A9, o czym wspomniano już w części pracy poświęconej kalgranulinom (20, 68, 69, 70).

### Rola w zapaleniu metabolicznym

Omówienie roli kalprotektyny w zapaleniu metabolicznym wymaga krótkiego wyjaśnienia – czym jest zapalenie metaboliczne. W ujęciu klasycznym głównymi cechami zapalenia są: wzrost temperatury, zaczerwienienie, obrzęk i ból (*calor, rubor, tumor, dolor*). Cechy te opisał rzymski uczyony Aulus Cornelius

Celsus w pierwszym stuleciu naszej ery, a ok. 150 lat później grecki lekarz i filozof Claudius Galenus dodał piątą cechę, upośledzenie funkcji – *functio laesa* (71). W zapaleniu główną rolę odgrywa odpowiedź immunologiczna, która regulowana jest przez cytokiny i chemokiny. W zależności od typu odpowiedzi immunologicznej (Th1 lub Th2) dominują inne cytokiny. W odpowiedzi typu Th1 główną rolę odgrywają prozapalne cytokiny, takie jak TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 i IL-12 (72). Okazuje się, że zwiększone wydzielanie tych cytokin towarzyszy również otyłości i chorobom z nią związanych (73). W związku z tym wprowadzony został termin zapalenie metaboliczne (czasem określane jako metazapalenie), które definiowane jest jako indukowane otyłością przewlekłe zapalenie o niskim stopniu nasilenia (74). W 1993 r. wykazano związek pomiędzy zwiększoną ekspresją TNF- $\alpha$  w tkance tłuszczowej oraz insulinoopornością (75). Obecnie wiadomo, że cytokiny prozapalne takie jak TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  oraz IL-6 prowadzą do insulinooporności i dalej – cukrzycy typu 2, biorąc w ten sposób udział w rozwoju zespołu metabolicznego (74, 76). Zarówno w tkance tłuszczowej trzewnej, jak i podskórnej stwierdzono wzrost liczby makrofagów u otyłych osobników. Natomiast zwiększona liczba neutrofilów obserwowana była jedynie w tłuszczu trzewnym (73).

Wzrost stężenia kalprotektyny w surowicy oraz miejscu zapalenia stwierdzany był w przebiegu chorób związanych z zapaleniem metabolicznym, takich jak cukrzyca typu 2, skaza moczanowa oraz otyłość. W tkance tłuszczowej kalprotektyna za pośrednictwem receptorów TLR4 zwiększała ekspresję IL-1 $\beta$  w makrofagach. Z kolei w przebiegu skazy moczanowej kwas moczowy w postaci moczanu monosodowego stymuluje neutrofile i makrofagi do zwiększonego wydzielania S100A8/A9. Sama kalprotektyna podtrzymuje stan zapalny poprzez chemotaktyczne działanie na makrofagi oraz indukcję zwiększonego wydzielania cytokin prozapalnych, przez co również wpływa na rozwój chorób związanych z otyłością (20, 77, 78). Obecnie kalprotektyna uznawana jest za jeden z markerów otyłości (79).

### Rola w nowotworzeniu

Jak wyżej wspomniano, białka z rodziny S 100 biorą udział w regulacji apoptozy, proliferacji i różnicowaniu komórek. Kalprotektyna również ma swój udział w tych procesach (21). Wyniki niektórych badań wskazują, że kalprotektyna może wykazywać działanie przeciwnowotworowe. Z kolei jednak inne prace wykazały, że kalprotektyna może również sprzyjać nowotworzeniu (40). Zwiększony poziom S100A8/A9 występuje u chorych z różnymi rodzajami chorób nowotworowych, a badania *in vitro* pokazały, że kalprotektyna indukuje apoptozę w liniach komórkowych uzyskanych z guzów ludzkich i mysich (40). Jak podają Ehrchen i wsp., badania *in vivo* nie potwierdzały jednak tego efektu (40). Obecnie prowadzone badania wskazują, że kalprotektyna, powodując wzrost ekspresji genów związanych z apoptozą, w przypadku płaskonabłonkowego

raka głowy i szyi, może wykazywać działanie przeciwnowotworowe (80, 81). Podobne wyniki uzyskano w przypadku komórek gruczolakoraka żołądka, na które kalprotektyna działała cytotoksycznie oraz stymulowała ich apoptozę (82).

Z drugiej jednak strony kalprotektyna wykazuje również działanie sprzyjające rozwojowi nowotworów. Przykładem takiego działania może być wiązanie S100A8/A9 z receptorami RAGE komórek raka okrężnicy, prowadzące do aktywacji czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B oraz proliferacji komórek nowotworowych (83). Innymi przykładami mogą być redukcja wzrostu chłoniaków i mięsaków u myszy ze znokautowanym genem *S100A9*, czy też hamowanie wzrostu raków gruczołu sutkowego inhibitorem kaskady IL-6 – JAK2 – STAT3 – S100A8/A9, gdzie JAK2 oznacza enzym kinazę Janusową 2 (wewnątrzkomórkowy kinaza tyrozynowa), natomiast STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) jest białkowym wewnątrzkomórkowym przekaźnikiem sygnału i aktywatorem transkrypcji (40, 84). Ponadto, Rigidaccio i wsp. wykazali wysoką ekspresję kalprotektyny w raku piersi oraz korelację pomiędzy wysoką ekspresją receptora RAGE i złym rokowaniem (85). Autorzy zwrócili uwagę również na nową ścieżkę sygnałową zainicjowaną przez kalprotektynę (S100A8/A9 – RAGE – FAK – YAP) i odgrywającą rolę w wzroście guza, gdzie FAK (focal adhesion kinase) oznacza kinazę ogniskowo-adhezyjną biorącą udział w przyleganiu komórek oraz przerzutach nowotworowych, natomiast YAP (yes-associated protein) oznacza białko powiązane z białkiem Yes, będącym promotorem transkrypcji genów biorących udział w proliferacji komórek (85, 86). Warto również wspomnieć o mieloidalnych komórkach supresorowych (MDSC, myeloid-derived suppressor cells), których powstawanie i ekspansja związane są nie tylko z działaniem różnych czynników wzrostowych oraz cytokin i chemokin prozapalnych, ale również białek S100A8 i S100A9. Komórki te hamują działanie cytotoksycznych limfocytów T oraz indukują limfocyty T supresorowe, upośledzając przeciwnowotworowe działanie limfocytów cytotoksycznych, a ponadto poprzez indukcję angiogenezy wpływają na wzrost nowotworu (87). Badania Chen i wsp. wykazały, że S100A9 za pośrednictwem receptora CD33 powoduje ekspansję mieloidalnych komórek supresorowych, co może wpływać na rozwój zespołu mielodysplastycznego (88). Podjednostka kalprotektyny S100A9 powoduje ekspansję komórek MDSC oraz prowadzi do ich aktywacji. Obecnie nie jest do końca jasne, czy wpływ na receptor CD33 komórek MDSC odbywa się tylko za pośrednictwem homodimeru S100A9, czy też za pośrednictwem heterodimeru S100A8/A9 (39).

Rozbieżności w działaniu kalprotektyny w chorobach nowotworowych częściowo może wyjaśniać praca Shabani i wsp., w której autorzy zwracają uwagę na fakt, że wiele nowotworów może rozwijać się w miejscach zakażeń, zapaleń i przewlekłego działania drażniącego (24). W swojej pracy autorzy przypominają również, że już w 1863 r. niemiecki patolog Rudolf Virchow wskazywał, że rozwój raka może być związany z przewlekłym zapaleniem, a obecnie

wiadomo, że utrzymujące się zapalenia niektórych narządów prowadzić mogą do rozwoju nowotworu, zaś za główną przyczynę uznaje się uszkodzenie DNA (24). Obecne w miejscu zapalenia cytokiny prozapalne, takie jak TNF- $\alpha$  czy IL-6, oraz czynniki wzrostu wykazują działanie mitogenne sprzyjające nowotworzeniu. Ponadto, kalprotektyna za pośrednictwem czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B zwiększa ekspresję genów, których produkty odgrywają rolę w gojeniu ran, angiogenezie oraz przerzutach nowotworowych (24). Wang i wsp. oraz Shabani i wsp. zwracają również uwagę, że kalprotektyna w niskich stężeniach zewnątrzkomórkowych stymuluje proliferację komórek nowotworowych oraz ich migrację, natomiast w wysokich stężeniach zjawisko to nie występuje (20, 24). Białko S100A8/A9, działając wewnątrzkomórkowo, zwiększa ekspresję genów dla białek takich jak integryna  $\alpha$ 5, ZO-1 (Zona Occludens 1) i E-kadheryna (glikoproteina odpowiedzialna za kontakt pomiędzy komórkami nabłonkowymi) odgrywających rolę w ograniczaniu rozwoju raka (89, 90). A zatem, jak podają Shabani i wsp., kalprotektyna w zależności od stężenia oraz działania wewnątrz- lub zewnątrzkomórkowego może mieć różny wpływ na rozwój choroby nowotworowej (24).

### Wykorzystanie kalprotektyny w diagnostyce

U ludzi kalprotektyna oznaczana jest w surowicy, moczu i kale, znajdując zastosowanie w diagnostyce wielu chorób. Białko to może być oznaczane w ślinie, mazi stawowej czy nawet nasieniu (48, 91, 92). W 2022 r. Sprenkeler i wsp. wykazali, że wysoki poziom białka S100A8/A9 w surowicy może być markerem NETozy (33). Nazwa „NEToza” pochodzi od skrótu NET (neutrophil extracellular trap) oznaczającego sieć, jaką tworzy uwolniona z aktywowanych neutrofilów zdekondensowana chromatyna jądrowa wraz z białkami z ziarnistości tych komórek, co następuje po dezintegracji zewnętrznej błony komórkowej neutrofilów. Sieć nici DNA i białek histonowych tworzy pułapkę, w której zewnątrzkomórkowo zatrzymywane są i zabijane patogeny, a wraz z uwolnieniem przez neutrofile chromatyny z białkami uwalniana jest również kalprotektyna (93, 94, 95). Oprócz NETozy i wspomnianej wcześniej otyłości według różnych autorów u ludzi kalprotektyna w surowicy może być markerem miasteni, niektórych chorób płuc (w tym mukowiscydozy), nieswoistych zapaleń jelit, insulinooporności, cukrzycy typu 2, różnych chorób reumatycznych, przewlekłej niewydolności serca oraz posocznicy, co związane jest z faktem wzrostu stężenia kalprotektyny w surowicy na skutek aktywacji neutrofilów i korelacji tego stężenia z innymi markerami wymienionych chorób (48, 58, 91, 96, 97, 98, 99). U pacjentów z COVID-19 wykazano również związek pomiędzy wzrastającym stężeniem kalprotektyny w surowicy a ciężkim przebiegiem choroby i spadkiem wysycenia krwi tlenem (100). Wykazano również wzrost stężenia kalprotektyny w osoczu krwi u dzieci z zapaleniem wyrostka robaczkowego (101). Wyższe stężenie kalprotektyny stwierdzano też w surowicy: kobiet



ciężarnych w stanie przedrzucawkowym w trzecim trymestrze ciąży, osób z obturacyjnym bezdechem sennym, pacjentów z zapaleniem tarczycy, osób z reakcją zapalną związaną z odrzuceniem przeszczepu, chorych z ostrymi zespołami wieńcowymi, dzieci z bakteryjnymi zakażeniami dróg moczowych, czy też u osób z ciężkim urazowym uszkodzeniem mózgu (102, 103, 104, 105, 106, 107, 108). Zatem wzrost stężenia kalprotektyny w surowicy może zostać uznany za marker zapalenia (20).

Oznaczanie kalprotektyny w moczu jest również przydatne w diagnostyce niektórych chorób. Znaczny wzrost stężenia w moczu obserwowano u pacjentów z odmienniczkowym zapaleniem nerek (109). Heller i wsp. stwierdzili ponad 60-krotnie wyższe stężenie kalprotektyny w moczu u osób z wewnątrznerkowym ostrym uszkodzeniem nerek w porównaniu do pacjentów z przednerkowym ostrym uszkodzeniem nerek (110). Badacze uznali, że kalprotektyna w moczu może być markerem pozwalającym na różnicowanie ostrych uszkodzeń nerek w zależności od lokalizacji czynnika etiologicznego (110). Co ciekawe, Heller i wsp. nie stwierdzili różnic w stężeniach kalprotektyny w moczu pomiędzy pacjentami z przednerkowym ostrym uszkodzeniem nerek oraz grupą kontrolną, którą stanowiły osoby zdrowe (110). Ebbing i wsp. wykazali natomiast, że wywołane chirurgicznie ostre niedokrwienie nerek (przyczyna przednerkowa) trwające kilka do kilkudziesięciu minut (mediana 13 min; rozstęp międzykwartylowy: 4,5–20,3 min) u 26 osób z guzem nerki operowanych metodą oszczędzającą nerkę powodowało wzrost stężenia kalprotektyny w moczu już po dwóch godzinach od przywrócenia przepływu krwi przez nerkę i było 69-krotnie wyższe względem wartości podstawowych (111). W innej pracy Ebbing i wsp. stwierdzili wzrost stężenia kalprotektyny w moczu u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, rakiem nerki oraz rakiem prostaty (112). W przypadku wszystkich trzech chorób wzrost stężenia był istotny statystycznie w porównaniu do grupy zdrowych osób, a najwyższy wzrost (ok. 10-krotny) obserwowano w przypadku raka pęcherza moczowego (112). Bausch i wsp. wykazali jednak brak swoistości kalprotektyny u pacjentów z rakiem pęcherza moczowego, u których występowała jałowa leukocyturia, gdyż w statystycznej analizie wielowymiarowej wykazano, że w tych przypadkach leukocyty były głównym źródłem kalprotektyny w moczu (113). U pacjentów z COVID-19 stwierdzono, że wzrost stężenia kalprotektyny w moczu pozwala przewidzieć u nich ryzyko rozwoju ostrego uszkodzenia nerek oraz ryzyko zgonu (114).

Oprócz chorób układu moczowego oznaczanie białka S100A8/A9 w moczu może być również wykorzystane w diagnostyce insulinooporności oraz cukrzycy typu 2, gdyż podobnie jak w przypadku kalprotektyny w surowicy, jej stężenie wzrasta również w moczu (91). Wzrost stężenia heterodimeru S100A8/A9 w moczu stwierdzono również u pacjentów z toczeniem rumieniowatym układowym. Stężenie w moczu korelowało ze stopniem aktywności choroby, nie było jednak zależne od stopnia w skali BILAG (British Isles Lupus Assessment Group) wskazującego

na aktywność lub brak aktywności choroby nerek u pacjentów z toczeniem (115).

Warto jednak zaznaczyć, że diagnostyka chorób w oparciu o stężenie kalprotektyny w moczu u ciężarnych kobiet jest znacznie ograniczone lub wręcz niemożliwa. To ograniczenie spowodowane jest wysokim stężeniem kalprotektyny w moczu ciężarnych we wszystkich trymestrach ciąży oraz bezpośrednio po porodzie (116). Ponadto, stężenie kalprotektyny w moczu może wzrastać po intensywnym wysiłku fizycznym, jednak wzrost ten nie jest wielokrotny, jak ma to miejsce w przypadku różnych chorób (117).

Kolejnym materiałem, w którym może być oznaczone stężenie kalprotektyny, jest kał. Należy jednak pamiętać, o czym już wcześniej wspomniano, że u ludzi stężenie S100A8/A9 w kale zależne jest od wieku: wyższe u dzieci (zwłaszcza poniżej pierwszego roku życia) i osób starszych (66, 67, 96, 109). Ponadto krwawienie do przewodu pokarmowego również zwiększa stężenie omawianego białka w kale (118). Znaczny wzrost stężenia stwierdzano w przebiegu nieswoistych zapaleń jelit (IBD), takich jak wrzodziejące zapalenie okrężnicy czy choroba Leśniowskiego-Crohna, a wzrost stężenia był skorelowany z nasileniem zmian obserwowanych zarówno w badaniu endoskopowym, jak i w badaniu histopatologicznym wycinków jelit (119, 120, 121). Kalprotektyna w kale okazała się też czułym testem do monitorowania postępów leczenia pacjentów z chorobą Leśniowskiego-Crohna, u których stosowano monoklonalne przeciwciała anty-TNF- $\alpha$ , takie jak infliksymab czy adalimumab, a spadek stężenia S100A8/A9 korelował z obniżaniem się wartości w skalach CDEIS (Crohn disease endoscopic index of severity) i CDAI (Crohn's Disease Activity Index). Te wyniki wskazują, że stężenie kalprotektyny w kale jest również dobrym wskaźnikiem gojenia się śluzówki jelita (122). Podobnie u chorych z nawracającym zakażeniem *Clostridioides difficile* obniżenie stężenia S100A8/A9 siedem dni po przeszczepie mikrobioty kałowej pozwalało na przewidywanie dobrego rokowania po tym zabiegu (123). Badanie kalprotektyny w kale może być również wykorzystywane w diagnostyce różnicowej IBD z zespołem jelita nadwrażliwego (IBS), w którym wzrost stężenia kalprotektyny w kale jest możliwy, jednak jest niższy niż w przypadku IBD (21). Oprócz IBD oznaczanie S100A8/A9 w kale przydatne może być również w diagnostyce i monitorowaniu martwiczego zapalenia jelit u noworodków, zapaleniu jelit związanym ze zmianami w składzie mikrobioty jelitowej w przebiegu mukowiscydozy, zapaleń jelit u chorych z chorobą Parkinsona czy rakach jelita grubego. Stężenie kalprotektyny w kale wzrasta również u dzieci w przebiegu zakażeń jelitowych, jednakże zmiany w stężeniu nie pozwalają na odróżnienie zakażeń wirusowych od bakteryjnych (96, 124, 125, 126). Jak podają Trzepizur i Toporowska-Kowalska, niektórzy autorzy badań stwierdzali jednak wyższe stężenia kalprotektyny kałowej u dzieci zakażonych *Salmonella* spp. bądź *Campylobacter* spp. w porównaniu do zakażeń spowodowanych przez rotawirusy czy adenowirusy (124). Shastri i wsp. w badaniach 2383 przypadków pacjentów z ostrą biegunką wykazali, że oznaczanie

kalprotektyny w kale w diagnostyce ostrych biegunek bakteryjnych jest metodą stosunkowo czułą i swoistą (127). Uzyskane przez autorów tych badań wartości czułości i swoistości testu wyniosły odpowiednio 83 i 87% (127). Należy zatem podkreślić, że wyższe stężenie kalprotektyny w kale nie zawsze występuje i wskazuje na infekcje bakteryjne, czego przykładem mogą być również zakażenia spowodowane przez *Clostridioides difficile*, choć w przypadku tego zakażenia stężenie kalprotektyny w kale skorelowane jest z ciężkością przebiegu choroby oraz wysokim stężeniem toksyn tego patogenu (128).

W tym miejscu należy wyjaśnić zamienne stosowanie nazw *Clostridium difficile* i *Clostridioides difficile*. Powszechnie stosowaną w medycynie i weterynarii nazwą gatunkową jest *Clostridium difficile*, jednak od 2016 r. oficjalną nazwą gatunkową jest *Clostridioides difficile*, oprócz którego do rodzaju *Clostridioides* przeniesiony został również gatunek wcześniej nazywany *Clostridium mangenotii*, a którego obecnie oficjalną nazwą gatunkową jest *Clostridioides mangenotii* (129).

Omawiając zakażenia, warto również wspomnieć o pasożytniczych inwazjach przewodu pokarmowego, a zwłaszcza o inwazji tęgoryjców. Te niczenie powodują krwawienie do jelita cienkiego, co związane jest z częstą zmianą miejsca przyczepiania się pasożyta do śluzówki (130, 131). Jednakże, pomimo krwawienia do światła przewodu pokarmowego, które powinno podnosić stężenie S100A8/A9 w kale, poziom tego białka u zarażonych osobników nie ulega zwiększeniu, a wręcz może być tendencja odwrotna (132). Badania z kilku krajów dowodzą braku związku pomiędzy zarażeniami u ludzi spowodowanymi przez glistę, włosogłówkę czy tęgoryjce a stężeniem kalprotektyny w kale, co wskazuje na łagodne zmiany zapalne w jelitach osób zarażonych tymi pasożytami (132, 133). Wydaje się, że pewnym wyjaśnieniem tego zjawiska, przynajmniej w przypadku inwazji tęgoryjców, może być działanie glikoproteiny NIF (Neutrophil Inhibitory Factor), za pośrednictwem której pasożyty te powodują hamowanie aktywności neutrofilów (134). Warto jednak zaznaczyć, że wykazano związek pomiędzy inwazjami pierwotniaków jelitowych a wzrostem stężenia kalprotektyny w kale (135, 136).

W przypadku zakażeń spowodowanych przez SARS-CoV-2 przebiegających z biegunką stężenie heterodimeru S100A8/A9 w kale było wyższe niż u osób zakażonych, u których nie występowały objawy ze strony przewodu pokarmowego (124). Podobnie, wyższe stężenie kalprotektyny w kale obserwowano w przebiegu gruźlicy jelitowej w porównaniu do płucnej postaci choroby (96). Ponadto, jak podają Kotsiou i wsp., wysokie stężenia kalprotektyny w kale na skutek zapaleń jelitowych u dzieci w wieku dwóch lat pozwalają na przewidzenie wystąpienia astmy i atopowego zapalenia skóry u tych dzieci w wieku sześciu lat, co wskazuje, że wczesne zmiany w układzie odpornościowym przewodu pokarmowego mogą mieć wpływ na rozwój alergii u dzieci (96). Badania Seo i wsp. pokazały z kolei, że stężenie kalprotektyny w kale u dzieci i młodzieży w wieku od 3 do 18 lat z atopowym zapaleniem skóry było skorelowane ze stopniem w skali SCORAD (Scoring Atopic Dermatitis

Index), wskazującym na nasilenie zmian w przebiegu tej choroby (137). Kim i wsp. wykazali natomiast, że zastosowanie probiotyków (*Lactobacillus* sp.) u myszy z indukowanym oksazolonom atopowym zapaleniem skóry zmniejszyło stężenie kalprotektyny w kale oraz nasilenie zmian patologicznych (138).

Przedstawione w powyższym skrócie możliwości wykorzystania kalprotektyny w diagnostyce różnych chorób u ludzi pokazują, że oznaczanie kalprotektyny u psów i kotów może mieć również bardzo szerokie zastosowanie. Obecnie w diagnostyce komercyjnej u psów i kotów kalprotektyna oznaczana jest w surowicy (metoda radioimmunologiczna) i w kale (metoda radioimmunologiczna i metoda immunoturbidymetryczna), jednak według wiedzy autorek niniejszego opracowania w Polsce dostępne jest na razie jedynie badanie kalprotektyny kałowej (139, 140, 141). Przeprowadzone w 2018 r. badania Heilmann i wsp. pokazały, że opracowany dla psów radioimmunologiczny test diagnostyczny do oznaczania kalprotektyny w kale jest wystarczająco czuły, dokładny, precyzyjny i powtarzalny, by móc stosować go również w diagnostyce chorób u kotów (140). Autorzy zaznaczają jednak, że test traci dokładność przy wysokich stężeniach tego białka w kale kotów (140). W 2022 r. Enderle i wsp., oceniając immunoturbidymetryczny test do oznaczania stężenia kalprotektyny w kale u ludzi, stwierdzili, że może on być stosowany u psów i kotów (141). Wykazano, że u obu gatunków zwierząt test cechuje się liniowością, precyzją, powtarzalnością i dokładnością, a dzięki temu znajduje zastosowanie w diagnostyce chorób u tych zwierząt.

Dotychczasowe badania przeprowadzone u psów i kotów wskazują, że stężenie kalprotektyny w kale psów znacząco wzrasta w przewlekłych chorobach przewodu pokarmowego oraz jest skorelowane z nasileniem zmian histopatologicznych w przewodzie pokarmowym (142, 143). Według Heilmann i Steiner kalprotektynę można uznać za marker zapalenia jelit u psów (144). Heilmann i wsp. stwierdzili, że stężenie kalprotektyny w kale jest wyższe u psów z enteropatią reagującą na leczenie glikokortykosteroidami lub lekami immunosupresyjnymi niż u psów z enteropatią reagującą na dietę lub antybiotykoterapię (143). Ponadto Enderle i wsp. wykazali, że u niewielkiego odsetka psów i kotów stężenie heterodimeru S100A8/A9 w kale nieznacznie przejściowo wzrasta powyżej zakresu wartości referencyjnych po szczepieniu przeciwko parwowirowi (141). Autorzy stwierdzili również, że u części psów leczonych niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi stężenie kalprotektyny nieznacznie wzrasta względem wartości przed leczeniem, jednak nadal pozostaje w zakresie wartości referencyjnych (141). W przypadku kotów leczenie niesteroidowymi lekami przeciwzapalnymi może wpływać na stężenie omawianego białka w kale. U jednego kota (spośród 11 osobników leczonych meloksykalem) stwierdzono znaczący wzrost stężenia S100A8/A9 podczas stosowania meloksykamu (452 µg/g) oraz tydzień po zakończeniu leczenia (261 µg/g) względem stężenia kalprotektyny w kale tego kota przed zastosowaniem terapii przeciwzapalnej wynoszącego 9 µg/g (141).



Heilmann i wsp. stwierdzili, że stężenie białka S100A8/A9 w surowicy większe lub równe 296 µg/l ma umiarkowanie wysoką czułość (82,4%) w rozpoznaniu IBD u psów, jednak swoistość tego badania w diagnostyce IBD u psów wynosiła 68,4%, co wskazuje, że kalprotektyna wzrasta w większości przypadków IBD u psów, jednak podobnie jak u ludzi jej stężenie wzrasta również w przypadku zapaleń toczących się w innych narządach (139). Tutaj warto zaznaczyć, że stężenie kalprotektyny w surowicy nie było znacząco skorelowane z ciężkością przebiegu choroby oraz nasileniem zmian histopatologicznych w jelicie, natomiast stężenie kalprotektyny w kale taką korelację wykazuje (139, 142). Z jednej strony stosunkowo niska swoistość badania stężenia kalprotektyny w surowicy psów w wykrywaniu IBD ogranicza jej zastosowanie w diagnostyce tej choroby, z drugiej jednak strony obserwacja ta pozwala przyjąć założenie, że oznaczanie stężenia kalprotektyny w surowicy psów może mieć również zastosowanie w diagnostyce innych chorób. Przykładem może być oznaczanie stężenia kalprotektyny w surowicy sznauców miniaturowych z idiopatyczną hiperlipidemią, u których na czczo występuje związana z insulinoopornością hipertriglicydemia. W przypadku psów z hipertriglicydemią stężenie kalprotektyny w surowicy było wyższe. Według autorów tych badań kalprotektyna w surowicy może być markerem insulinooporności u sznauców miniaturowych z wysokim stężeniem triglicydów we krwi (145). Innym przykładem jest potencjalne różnicowanie przypadków sepsy od przypadków zespołu uogólnionej reakcji zapalnej (SIRS – Systemic Inflammatory Response Syndrome) u psów, co proponują Thames i wsp. (146). Autorzy tych badań stwierdzili wzrost stężenia kalprotektyny w surowicy psów zarówno z posocznicy, jak i zespołem uogólnionej reakcji zapalnej w porównaniu do zdrowych psów. Jednakże podczas hospitalizacji zwierząt okazało się, że stężenie kalprotektyny u psów z sepsą codziennie obniżało się, natomiast u psów z SIRS codziennie wzrastało przez okres trzech dni prowadzenia badań (146).

Należy również pamiętać, że u szczeniąt stwierdzano wyższe stężenie kalprotektyny w kale niż u dorosłych psów, podobnie jak to obserwowano również u ludzi. Autorzy tych badań porównali również stężenie kalprotektyny w kale u suk ciężarnych oraz w okresie laktacji z tą samą grupą kontrolną, którą stanowiły dorosłe zdrowe psy, i nie stwierdzili istotnych różnic między tymi grupami (147).

Na koniec warto wspomnieć, że kalprotektyna, a właściwie przeciwciała przeciwko niej stosowane są również w histopatologii w badaniach immunohistochemicznych różnych tkanek, np. w przebiegu zakaźnego zapalenia otrzewnej, przewlekłych zapaleń jelit czy chłoniaka jelit (148, 149, 150).

## Podsumowanie

Oznaczanie kalprotektyny w różnym materiale daje duże możliwości w diagnostyce chorób, co pokazały badania u ludzi. Dotychczas opublikowano niewiele prac badawczych pokazujących możliwości

wykorzystania kalprotektyny w diagnostyce chorób u psów i kotów. Można jednak przypuszczać, że w przyszłości znacznie zwiększy się liczba chorób psów i kotów, w diagnostyce których wykorzystywane będzie oznaczanie kalprotektyny w różnym materiale biologicznym.

## Piśmiennictwo

- Moore B.W.: A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1965, 19(6), 739–744.
- Filipek A. Cytoskielet a białka wiążące wapń z rodziny S100. *Kosmos*, 2001, 50(3), 309–314.
- Marenholz L., Heizmann C.W., Fritz G.: S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 322(4), 1111–1122.
- Xia C., Braunstein Z., Toomey A.C., Zhong J., Rao X.: S100 Proteins As an Important Regulator of Macrophage Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 2018, 8, 1908. Doi: 10.3389/fimmu.2017.01908.
- Delangre E., Opplinger E., Berkcan S., Gjorgjieva M., Correia de Sousa M., Foti M.: S100 Proteins in Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(19), 11030. Doi: 10.3390/ijms231911030.
- Singh P., Ali S.A.: Multifunctional Role of S100 Protein Family in the Immune System: An Update. *Cells*, 2022, 11(15), 2274. Doi: 10.3390/cells11152274.
- Gonzalez L.L., Garrie K., Turner M.D.: Role of S100 proteins in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Cell Research*, 2020, 1867(6), 118677. Doi: 10.1016/j.bbamcr.2020.118677.
- Zackular J.P., Chazin W.J., Skaar E.P.: Nutritional Immunity: S100 Proteins at the Host-Pathogen Interface. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(31), 18991–18998.
- Kulesza M., Dansonka-Mieszkowska A., Pieńkowska-Grela B.: Napraw albo zgini – rola białka p53 w życiu komórki. *Biuletyn Polskiego Towarzystwa Onkologicznego – Nowotwory*, 2019, 4(5–6), 220–231.
- Bandorowicz-Pikuła J., Seliga A.K.: Annexin A6 as a cholesterol and nucleotide binding protein involved in membrane repair and in controlling membrane transport during endo- and exocytosis. *Postępy Biochemii*, 2018, 64(2–3), 190–195.
- Ranjan A., Iwakuma T.: Non-Canonical Cell Death Induced by p53. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(12), 2068. Doi: 10.3390/ijms17122068.
- Szyller J., Sikora T.: Diagnostyka laboratoryjna w medycynie ratunkowej – charakterystyka i możliwości. *Anestezjologia i Ratownictwo*, 2014, 8, 429–436.
- Thelin E.P., Nelson D.W., Bellander B.M.: A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury. *Acta Neurochirurgica*, 2017, 159(2), 209–225.
- Leśniak W., Filipek A.: S100A6 Protein – Expression and Function in Norm and Pathology. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(2), 1341. Doi: 10.3390/ijms24021341.
- Fei F., Qu J., Li C., Wang X., Li Y., Zhang S.: Role of metastasis-induced protein S100A4 in human non-tumor pathophysiologicals. *Cell & Bioscience*, 2017, 7, 64. Doi: 10.1186/s13578-017-0191-1.
- Yang D., Han Z., Oppenheim J.J.: Alarmins and Immunity. *Immunological Reviews*, 2017, 280(1), 41–56.
- Oppenheim J.J., Yang D.: Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Current Opinion in Immunology*, 2005, 17(4), 359–365.
- Goyette J., Geczy C.L.: Inflammation-associated S100 proteins: new mechanisms that regulate function. *Amino Acids*, 2011, 41(4), 821–842.
- Perera C., McNeil H.P., Geczy C.L.: S100 Calgranulins in inflammatory arthritis. *Immunology and Cell Biology*, 2010, 88(1), 41–49.
- Wang S., Song R., Wang Z., Jing Z., Wang S., Ma J.: S100A8/A9 in Inflammation. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9, 1298. Doi: 10.3389/fimmu.2018.01298.
- Jukic A., Bakiri L., Wagner E.F., Tilg H., Adolph T.E. Calprotectin: from biomarker to biological function. *Gut*, 2021, 70(10), 1978–1988.
- Gottsch J.D., Li Q., Ashraf F., O'Brien T.P., Stark W.J., Liu S.H.: Cytokine-induced calgranulin C expression in keratinocytes. *Clinical Immunology*, 1999, 91(1), 34–40.
- Kido J., Hayashi N., Kataoka M., Nagata T.: Calprotectin Expression in Human Monocytes: Induction by *Porphyromonas gingivalis* Lipopolysaccharide, Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , and Interleukin-1 $\beta$ . *Journal of Periodontology*, 2005, 76(3), 437–442.
- Shabani F., Farasat A., Mahdavi M., Gheibi N.: Calprotectin (S100A8/S100A9): a key protein between inflammation and cancer. *Inflammation Research*, 2018, 67(10), 801–812.
- Striz I., Trebichavský I.: Calprotectin – a Pleiotropic Molecule in Acute and Chronic Inflammation. *Physiological Research*, 2004, 53(3), 245–253.

26. Fagerhol M.K., Dale I., Anderson T.: Release and Quantitation of a Leucocyte Derived Protein (L1). *Scandinavian Journal of Haematology*, 1980, 24(5), 393–398.
27. Dorin J.R., Novak M., Hill R.E., Brock D.J., Secher D.S., van Heyningen V.: A clue to the basic defect in cystic fibrosis from cloning the CF antigen gene. *Nature*, 1987, 326(6113), 614–617.
28. Odink K., Cerletti N., Brügger J., Clerc R.G., Tarcsay L., Zwadlo G., Gerhards G., Schlegel R., Sorg C.: Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature*, 1987, 330(6143), 80–82.
29. Andersson K.B., Sletten K., Berntzen H.B., Dale I., Brandtzaeg P., Jellum E., Fagerhol M.K.: The Leucocyte L1 Protein: Identity with the Cystic Fibrosis Antigen and the Calcium-Binding MRP-8 and MRP-14 Macrophage Components. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1988, 28(2), 241–245.
30. Steinbakk M., Naess-Andresen C.F., Lingaas E., Dale I., Brandtzaeg P., Fagerhol M.K. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet*, 1990, 336(8718), 763–765.
31. Edgeworth J., Gorman M., Bennett R., Freemont P., Hogg N.: Identification of p8,14 as a Highly Abundant Heterodimeric Calcium Binding Protein Complex of Myeloid Cell. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266(12), 7706–7713.
32. Stroncek D.F., Shankar R.A., Skubitz K.M.: The subcellular distribution of myeloid-related protein 8 (mrp8) and mrp14 in human neutrophils. *Journal of Translational Medicine*, 2005, 3, 36. Doi: 10.1186/1479-5876-3-36.
33. Sprengel E.G.G., Zandstra J., van Kleef N.D., Goetschalckx I., Verstege B., Aarts C.E.M., Janssen H., Tool A.T.J., van Mierlo G., van Bruggen R., Jongerius I., Kuijpers T.W.: S100A8/A9 is a Marker for the Release of Neutrophil Extracellular Traps and Induces Neutrophil Activation. *Cells*, 2022, 11(2), 236. Doi: 10.3390/cells11020236.
34. Vicente-Manzanares M., Sánchez-Madrid F.: Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nature Reviews Immunology*, 2004, 4(2), 110–122.
35. Rose D.M., Alon R., Ginsberg M.H.: Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunological Reviews*, 2007, 218, 126–134.
36. Pardo-Cabañas M., García-Bernal D., García-Verdugo R., Kremer L., Márquez G., Teixidó J.: Intracellular signaling required for CCL25-stimulated T cell adhesion mediated by the integrin  $\alpha 4\beta 1$ . *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, 82(2), 380–391.
37. Miles A., Liaskou E., Eksteen B., Lalor P.F., Adams D.H.: CCL25 and CCL28 promote  $\alpha 4\beta 7$ -integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow. *American Journal of Physiology, Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2008, 294(5), G1257–G1267.
38. Pietkiewicz J., Seweryn E., Bartyś A., Gamian A.: Receptory końcowych produktów zaawansowanej glikacji – znaczenie fizjologiczne i kliniczne. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2008, 62, 511–523.
39. Garcia V., Perera Y.R., Chazin W.J.: A Structural Perspective on Calprotectin as a Ligand of Receptors Mediating Inflammation and Potential Drug Target. *Biomolecules*, 2022, 12(4), 519. Doi: 10.3390/biom12040519.
40. Ehrchen J.M., Sunderkötter C., Foell D., Vogl T., Roth J.: The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 2009, 86(3), 557–566.
41. Gheibi N., Ghorbani M., Shariatfar H., Farasat A.: Effects of unsaturated fatty acids (Arachidonic/Oleic Acids) on stability and structural properties of Calprotectin using molecular docking and molecular dynamics simulation approach. *PLoS One*, 2020, 15(3), e0230780. Doi: 10.1371/journal.pone.0230780.
42. Das U.N.: Arachidonic acid in health and disease with focus on hypertension and diabetes mellitus: A review. *Journal of Advanced Research*, 2018, 11, 43–55.
43. Tallima H., El Ridi R.: Arachidonic acid: Physiological roles and potential health benefits – A review. *Journal of Advanced Research*, 2018, 11, 33–41.
44. Das U.N.: Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: A review. *Journal of Advanced Research*, 2018, 11, 57–66.
45. Zitka O., Kukacka J., Krizkova S., Huska D., Adam V., Masarik M., Prusa R., Kizek R.: Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17(31), 3751–3768.
46. Jabłońska-Trypuć A., Matejczyk M., Rosochacki S.: Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016, 31(S1), 177–183.
47. Nisapakultorn K., Ross K.F., Herzberg M.C.: Calprotectin Expression Inhibits Bacterial Binding to Mucosal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 2001, 69(6), 3692–3696.
48. Ometto F., Friso L., Astorri D., Botsios C., Raffener B., Punzi L., Doria A.: Calprotectin in rheumatic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 2017, 242(8), 859–873.
49. Perkins N.D.: Integrating cell-signalling pathways with NF- $\kappa$ B and IKK function. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology*, 2007, 8(1), 49–62.
50. Gašiorowski K., Brokos B., Echeverría V., Barreto G.E., Leszek J.: RAGE-TLR Crosstalk Sustains Chronic Inflammation in Neurodegeneration. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55(2), 1463–1476.
51. Yang J., Anholts J., Kolbe U., Stegehuis-Kamp J.A., Claas F.H.J., Eikmans M.: Calcium-Binding Proteins S100A8 and S100A9: Investigation of Their Immune Regulatory Effect in Myeloid Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(7), 1833. Doi: 10.3390/ijms19071833.
52. Iyer S.S., Cheng G.: Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammation and autoimmune disease. *Critical Reviews in Immunology*, 2012, 32(1), 23–63.
53. Li J., Xie K., Yang J., Zhang J., Yang Q., Wang P., Gun S., Huang X.: S100A9 plays a key role in *Clostridium perfringens* beta2 toxin-induced inflammatory damage in porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells. *BMC Genomics*, 2023, 24(1), 16. Doi: 10.1186/s12864-023-09118-6.
54. Guo Q., Zhao Y., Li J., Liu J., Yang X., Guo X., Kuang M., Xia H., Zhang Z., Cao L., Luo Y., Bao L., Wang X., Wei X., Deng W., Wang N., Chen L., Chen J., Zhu H., Gao R., Qin C., Wang X., You F.: Induction of alarmin S100A8/A9 mediates activation of aberrant neutrophils in the pathogenesis of COVID-19. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(2), 222–235.e4.
55. Mellett L., Khader S.A.: S100A8/A9 in COVID-19 pathogenesis: Impact on clinical outcomes. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2022, 63, 90–97.
56. Hammer H.B., Odegard S., Fagerhol M.K., Landewé R., van der Heijde D., Uhlig T., Mowinckel P., Kvien T.K.: Calprotectin (a major leucocyte protein) is strongly and independently correlated with joint inflammation and damage in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2007, 66(8), 1093–1097.
57. Kopeć-Mędrak M., Widuchowska M., Kucharz E.J.: Calprotectin in rheumatic diseases: a review. *Reumatologia*, 2016, 54(6), 306–309.
58. Stascheit F., Hotter B., Hoffmann S., Kohler S., Lehnerer S., Spettek A., Meisel A.: Calprotectin as potential novel biomarker in myasthenia gravis. *Journal of Translational Autoimmunity*, 2021, 4, 100111. Doi: 10.1016/j.jtauto.2021.100111.
59. Ertekin V., Selimoğlu M.A., Turgut A., Bakan N.: Fecal calprotectin concentration in celiac disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 2010, 44(8), 544–546.
60. Balamtekin N., Baysoy G., Uslu N., Orhan D., Akçören Z., Özen H., Gürakan F., Saltık-Temizel İ.N., Yüce A.: Fecal calprotectin concentration is increased in children with celiac disease: relation with histopathological findings. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 2012, 23(5), 503–508.
61. Montalto M., Santoro L., Curigliano V., D'Onofrio F., Cammarota G., Panunzi S., Ricci R., Gallo A., Grieco A., Gasbarrini A., Gasbarrini G.: Faecal calprotectin concentrations in untreated coeliac patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2007, 42(8), 957–961.
62. Capone P., Rispo A., Imperatore N., Caporaso N., Tortora R.: Fecal calprotectin in coeliac disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(2), 611–612.
63. Szaflarska-Popławska A., Romańczuk B., Parzęcka M.: Faecal calprotectin concentration in children with coeliac disease. *Przeegląd Gastroenterologiczny*, 2020, 15(1), 44–47.
64. Roca M., Rodriguez Varela A., Donat E., Cano F., Hervas D., Armisen A., Vaya M.J., Sjölander A., Ribes-Koninckx C.: Fecal Calprotectin and Eosinophil-derived Neurotoxin in Healthy Children Between 0 and 12 Years. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2017, 65(4), 394–398.
65. Roca M., Rodriguez Varela A., Carvajal E., Donat E., Cano F., Armisen A., Vaya M.J., Ekoff H., Hervas D., Rydell N., Ribes-Koninckx C.: Fecal calprotectin in healthy children aged 4–16 years. *Scientific Reports*, 2020, 10(1), 20565. Doi: 10.1038/s41598-020-77625-7.
66. Kolho K.L., Alftan H.: Concentration of fecal calprotectin in 11,255 children aged 0–18 years. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2020, 55(9), 1024–1027.
67. Park S.Y.: Age-Related Fecal Calprotectin Concentrations in Healthy Adults. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*, 2020, 52(3), 181–187.
68. Chimenti M.S., Triggianese P., Botti E., Narcisi A., Conigliaro P., Giunta A., Teoli M., Perricone R., Costanzo A.: S100A8/A9 in psoriatic plaques from patients with psoriatic arthritis. *Journal of International Medical Research*, 2016, 44(1 suppl), 33–37.
69. Schonhaler H.B., Guinea-Viniegra J., Wculek S.K., Ruppen I., Ximénez-Embún P., Guío-Carrión A., Navarro R., Hogg N., Ashman K., Wagner E.F.: S100A8-S100A9 Protein Complex Mediates Psoriasis by Regulating the Expression of Complement Factor C3. *Immunity*, 2013, 39(6), 1171–1181.
70. Giang J., Seelen M.A.J., van Doorn M.B.A., Rissmann R., Prens E.P., Damman J.: Complement Activation in Inflammatory Skin Diseases. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9, 639. DOI: 10.3389/fimmu.2018.00639.
71. Rather L.J.: Disturbance of function (*functio laesa*): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 1971, 47(3), 303–322.

72. Elenkov I.J., Iezzoni D.G., Daly A., Harris A.G., Chrousos G.P.: Cytokine Dysregulation, Inflammation and Well-Being. *NeuroImmunoModulation*, 2005, 12(5), 255–269.
73. Wu H., Ballantyne C.M.: Metabolic Inflammation and Insulin Resistance in Obesity. *Circulation Research*, 2020, 126, 1549–1564.
74. Dali-Youcef N., Mecili M., Ricci R., Andrés E.: Metabolic inflammation: Connecting obesity and insulin resistance. *Annals of Medicine*, 2013, 45(3), 242–253.
75. Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M.: Adipose Expression of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ : Direct Role in Obesity-Linked Insulin Resistance. *Science*, 1993, 259(5091), 87–91.
76. Eckel R.H., Grundy S.M., Zimmet P.Z.: The metabolic syndrome. *Lancet*, 2005, 365(9468), 1415–1428.
77. Catalán V., Gómez-Ambrosi J., Rodríguez A., Ramírez B., Rotellar F., Valentí V., Silva C., Gil M.J., Fernández-Real J.M., Salvador J., Frühbeck G.: Increased Levels of Calprotectin in Obesity Are Related to Macrophage Content: Impact on Inflammation and Effect of Weight Loss. *Molecular Medicine*, 2011, 17(11–12), 1157–1167.
78. Pedersen L., Nybo M., Poulsen M.K., Henriksen J.E., Dahl J., Rasmussen L.M.: Plasma calprotectin and its association with cardiovascular disease manifestations, obesity and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus patients. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2014, 14, 196. Doi: 10.1186/1471-2261-14-196.
79. Mortensen O.H., Nielsen A.R., Erikstrup C., Plomgaard P., Fischer C.P., Krogh-Madsen R., Lindgaard B., Petersen A.M., Taudorf S., Pedersen B.K.: Calprotectin — A Novel Marker of Obesity. *PLoS One*, 2009, 4(10), e7419. Doi: 10.1371/journal.pone.0007419.
80. Argyris P.P., Slama Z.M., Ross K.F., Khammanivong A., Herzberg M.C.: Calprotectin and the Initiation and Progression of Head and Neck Cancer. *Journal of Dental Research*, 2018, 97(6), 674–682.
81. Argyris P.P., Saavedra F., Malz C., Stone I.A., Wei Y., Boyle W.S., Johnstone K.F., Khammanivong A., Herzberg M.C.: Intracellular calprotectin (S100A8/A9) facilitates DNA damage responses and promotes apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 2023, 137, 106304. Doi: 10.1016/j.oraloncology.2022.106304.
82. Shabani F., Mahdavi M., Imani M., Hosseini-Feizi M.A., Gheibi N.: Calprotectin (S100A8/S100A9)-induced cytotoxicity and apoptosis in human gastric cancer AGS cells: Alteration in expression levels of Bax, Bcl-2, and ERK2. *Human & Experimental Toxicology*, 2020, 39(8), 1031–1045.
83. Turovskaya O., Foell D., Sinha P., Vogl T., Newlin R., Nayak J., Nguyen M., Olsson A., Nawroth P.P., Bierhaus A., Varki N., Kronenberg M., Freeze H.H., Srikrishna G.: RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2008, 29(10), 2035–2043.
84. Rodriguez-Barrueco R., Yu J., Saucedo-Cuevas L.P., Oliván M., Llobet-Navas D., Putcha P., Castro V., Murga-Penas E.M., Collazo-Lorduy A., Castillo-Martin M., Alvarez M., Cordon-Cardo C., Kalinsky K., Maurer M., Califano A., Silva J.M.: Inhibition of the autocrine IL-6–JAK2–STAT3–calprotectin axis as targeted therapy for HR/HER2 breast cancers. *Genes & Development*, 2015, 29(15), 1631–1648.
85. Rigracciolo D.C., Nohata N., Lappano R., Cirillo F., Talia M., Adamo-Garcia S.R., Arang N., Lubrano S., De Francesco E.M., Belfiore A., Gutkind J.S., Maggolini M.: Focal Adhesion Kinase (FAK)-Hippo/YAP transduction signaling mediates the stimulatory effects exerted by S100A8/A9–RAGE system in triple-negative breast cancer (TNBC). *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2022, 41(1), 193. DOI: 10.1186/s13046-022-02396-0.
86. Chan K.T., Cortesio C.L., Huttenlocher A.: FAK alters invadopodia and focal adhesion composition and dynamics to regulate breast cancer invasion. *Journal of Cell Biology*, 2009, 185(2), 357–370.
87. Mucha J., Motyl T., Król M.: Wpływ limfocytów T i mieloidalnych komórek supresorowych na hamowanie odpowiedzi antynowotworowej organizmu. *Medycyna Weterynaryjna*, 2016, 72(12), 735–739.
88. Chen X., Eksioğlu E.A., Zhou J., Zhang L., Djeu J., Fortenberry N., Epling-Burnette P., Van Bijnen S., Dolstra H., Cannon J., Youn J.I., Donatelli S.S., Qin D., De Witte T., Tao J., Wang H., Cheng P., Gabrilovich D.I., List A., Wei S.: Induction of myelodysplasia by myeloid-derived suppressor cells. *Journal of Clinical Investigation*, 2013, 123(11), 4595–4611.
89. Cormier K., Harquail J., Ouellette R.J., Tessier P.A., Guerrette R., Robichaud G.A.: Intracellular Expression of Inflammatory Proteins S100A8 and S100A9 Leads to Epithelial-mesenchymal Transition and Attenuated Aggressiveness of Breast Cancer Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2014, 14(1), 35–45.
90. Mendonsa A.M., Na T.Y., Gumbiner B.M.: E-cadherin in Contact Inhibition and Cancer. *Oncogene*, 2018, 37(35), 4769–4780.
91. Ortega F.J., Sabater M., Moreno-Navarrete J.M., Pueyo N., Botas P., Delgado E., Ricart W., Frühbeck G., Fernández-Real J.M.: Serum and urinary concentrations of calprotectin as markers of insulin resistance and type 2 diabetes. *European Journal of Endocrinology*, 2012, 167(4), 569–578.
92. Omes C., Tomasoni V., De Amici M., Testa G., Torre C., Nappi R.E.: Calprotectin as a novel diagnostic approach to screen male infertility risk: A pilot study. *Immunobiology*, 2022, 227(6), 152291. Doi: 10.1016/j.imbio.2022.152291.
93. Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A.: Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*, 2004, 303(5663), 1532–1535.
94. Urban C.F., Ermer D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., Brinkmann V., Jungblut P.R., Zychlinsky A.: Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(10), e1000639. Doi: 10.1371/journal.ppat.1000639.
95. Nirmala J.G., Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Biology and Toxicology*, 2020, 36(2), 145–164.
96. Kotsiou O.S., Papagiannis D., Papadopoulou R., Gourgoulis K.I. Calprotectin in Lung Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(4), 1706. Doi: 10.3390/ijms22041706.
97. Kalla R., Kennedy N.A., Ventham N.T., Boyapati R.K., Adams A.T., Nimmo E.R., Visconti M.R., Drummond H., Ho G.T., Pattenden R.J., Wilson D.C., Satsangi J. Serum Calprotectin: A Novel Diagnostic and Prognostic Marker in Inflammatory Bowel Diseases. *American Journal of Gastroenterology*, 2016, 111(12), 1796–1805.
98. Huang L., Li J., Han Y., Zhao S., Zheng Y., Sui F., Xin X., Ma W., Jiang Y., Yao Y., Li W.: Serum Calprotectin Expression as a Diagnostic Marker for Sepsis in Postoperative Intensive Care Unit Patients. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 2016, 36(10), 607–616.
99. Jensen L.J., Kistorp C., Bjerre M., Raymond I., Flyvbjerg A.: Plasma calprotectin levels reflect disease severity in patients with chronic heart failure. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2012, 19(5), 999–1004.
100. Shi H., Zuo Y., Yalavarthi S., Gockman K., Zuo M., Madison J.A., Blair C., Woodward W., Lezak S.P., Lugogo N.L., Woods R.J., Lood C., Knight J.S., Kanthi Y.: Neutrophil calprotectin identifies severe pulmonary disease in COVID-19. *Journal of Leukocyte Biology*, 2021, 109(1), 67–72.
101. Kharbada A.B., Rai A.J., Cosme Y., Liu K., Dayan P.S.: Novel Serum and Urine Markers for Pediatric Appendicitis. *Academic Emergency Medicine*, 2012, 19(1), 56–62.
102. Pergialiotis V., Prodromidou A., Pappa E., Vlachos G.D., Perrea D.N., Papanitoniou N.: An evaluation of calprotectin as serum marker of preeclampsia: a systematic review of observational studies. *Inflammation Research*, 2016, 65(2), 95–102.
103. Yurtsever Kum N., Kum R.O., Candar T., Baklaci D., Guler I., Kuzucu I., Ozcan K.M., Ozcan M., Dere H.: Elevated serum calprotectin as an inflammatory marker in obstructive sleep apnea. *Cranio*, 2020, 1–7. Doi: 10.1080/08869634.2020.1839721.
104. Yang Y., Shen L., Xu M., Chen L., Lu W., Wang W.: Serum calprotectin as a prognostic predictor in severe traumatic brain injury. *Clinica Chimica Acta*, 2021, 520, 101–107.
105. Cengiz H., Demirci T., Varim C., Gönüllü E.: The relationship between serum calprotectin levels and disease activity in patients with subacute thyroiditis. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2021, 25(10), 3745–3751.
106. Ikemoto M., Tanaka T., Takai Y., Murayama H., Tanaka K., Fujita M.: New ELISA system for myeloid-related protein complex (MRP8/14) and its clinical significance as a sensitive marker for inflammatory responses associated with transplant rejection. *Clinical Chemistry*, 2003, 49(4), 594–600.
107. Altwegg L.A., Neidhart M., Hersberger M., Müller S., Eberli F.R., Corti R., Roffi M., Sütsch G., Gay S., von Eckardstein A., Wischnowsky M.B., Lüscher T.F., Maier W.: Myeloid-related protein 8/14 complex is released by monocytes and granulocytes at the site of coronary occlusion: a novel, early, and sensitive marker of acute coronary syndromes. *European Heart Journal*, 2007, 28(8), 941–948.
108. Lamot M., Miler M., Nikolac Gabaj N., Lamot L., Milošević M., Harjaček M., Abdović S.: Serum Calprotectin Is a Valid Biomarker in Distinction of Bacterial Urinary Tract Infection From Viral Respiratory Illness in Children Under 3 Years of Age. *Frontiers in Pediatrics*, 2022, 10, 768260. Doi: 10.3389/fped.2022.768260.
109. Herrera O.R., Christensen M.L., Helms R.A. Calprotectin: Clinical Applications in Pediatrics. *Journal of Pediatric Pharmacology and Therapeutics*, 2016, 21(4), 308–321.
110. Heller F., Frischmann S., Grünbaum M., Zidek W., Westhoff T.H.: Urinary Calprotectin and the Distinction between Prerenal and Intrinsic Acute Kidney Injury. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2011, 6(10), 2347–2355.
111. Ebbing J., Seibert F.S., Pagonas N., Bauer F., Miller K., Kempkensteffen C., Günzel K., Bachmann A., Seifert H.H., Rentsch C.A., Ardel P., Wetterauer C., Amico P., Babel N., Westhoff T.H.: Dynamics of Urinary Calprotectin after Renal Ischaemia. *PLoS One*, 2016, 11(1), e0146395. Doi: 10.1371/journal.pone.0146395.
112. Ebbing J., Mathia S., Seibert F.S., Pagonas N., Bauer F., Erber B., Günzel K., Kilic E., Kempkensteffen C., Miller K., Bachmann A., Rosenberger C., Zidek W., Westhoff T.H.: Urinary calprotectin: a novel diagnostic marker in urothelial carcinoma of the bladder. *World Journal of Urology*, 2014, 32(6), 1485–1492.
113. Bausch K., Roth E., Heinz S., Horst D., Mathia S., Vlainich T., Bubendorf L., Westhoff T., Wetterauer C., Seifert H.H., Ebbing J.: Urinary



- Calprotectin loses specificity as tumour marker due to sterile leucocyturia associated with bladder cancer. *PLoS One*, 2019, 14(3), e021354. Doi: 10.1371/journal.pone.0213549.
114. Racovitan D., Hogeweg M., Doevelaar A.A., Seidel M., Rohn B., Bettag S., Rieckmann S., Babel N., Seibert F.S., Westhoff T.H.: Urinary biomarkers to predict acute kidney damage and mortality in COVID-19. *Clinical Nephrology*, 2023, In Press. Doi: 10.5414/CN110952.
  115. Ruacho G., Lira-Junior R., Gunnarsson I., Svenungsson E., Boström E.A.: Inflammatory markers in saliva and urine reflect disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus Science and Medicine*, 2022, 9(1), e000607. Doi: 10.1136/lupus-2021-000607.
  116. Rezniczek G.A., Förster C., Hilal Z., Westhoff T., Tempfer C.B.: Calprotectin in pregnancy and pregnancy-associated diseases: a systematic review and prospective cohort study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 2019, 299(6), 1567–1577.
  117. Tominaga T., Ma S., Sugama K., Kanda K., Omae C., Choi W., Hashimoto S., Aoyama K., Yoshikai Y., Suzuki K.: Changes in Urinary Biomarkers of Organ Damage, Inflammation, Oxidative Stress, and Bone Turnover Following a 3000-m Time Trial. *Antioxidants*, 2021, 10(1), 79. Doi: 10.3390/antiox10010079.
  118. Vavricka S.R., Heinrich H., Buetikofer S., Breitenmoser F., Burri E., Schneider-Yin X., Barman-Aksoezen J., Biedermann L., Scharl M., Zeitz J., Rogler G., Misselwitz B., Sauter M.: The Vampire Study: Significant elevation of faecal calprotectin in healthy volunteers after 300 ml blood ingestion mimicking upper gastrointestinal bleeding. *United European Gastroenterology Journal*, 2018, 6(7), 1007–1014.
  119. Lin J.F., Chen J.M., Zuo J.H., Yu A., Xiao Z.J., Deng F.H., Nie B., Jiang B.: Meta-analysis: Fecal Calprotectin for Assessment of Inflammatory Bowel Disease Activity. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2014, 20(8), 1407–1415.
  120. Kyle B.D., Agbor T.A., Sharif S., Chauhan U., Marshall J., Halder S.L.S., Ip S., Khan W.I.: Fecal Calprotectin, CRP and Leucocytes in IBD Patients: Comparison of Biomarkers With Biopsy Results. *Journal of the Canadian Association of Gastroenterology*, 2021, 4(2), 84–90.
  121. D'Haens G., Ferrante M., Vermeire S., Baert F., Noman M., Moortgat L., Geens P., Iwens D., Aerden I., Van Assche G., Van Olmen G., Rutgeerts P.: Fecal Calprotectin is a Surrogate Marker for Endoscopic Lesions in Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2012, 18(12), 2218–2224.
  122. Sipponen T., Savilahti E., Kärkkäinen P., Kolho K.L., Nuutinen H., Turunen U., Färkkilä M.: Fecal calprotectin, lactoferrin, and endoscopic disease activity in monitoring anti-TNF-alpha therapy for Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2008, 14(10), 1392–1398.
  123. Hibbard J., Jiang Z.D., DuPont H.L.: Fecal calprotectin and fecal indole predict outcome of fecal microbiota transplantation in subjects with recurrent *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, 2019, 56, 102–105.
  124. Trzepizur M., Toporowska-Kowalska E.: Application of faecal calprotectin as marker of gastrointestinal tract disorders. *Pediatrics Polska*, 2021, 96(3), 198–206.
  125. Mulak A., Koszewicz M., Panek-Jeziorna M., Kozirowska-Gawron E., Budrewicz S.: Fecal Calprotectin as a Marker of the Gut Immune System Activation Is Elevated in Parkinson's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 2019, 13, 992. Doi: 10.3389/fnins.2019.00992.
  126. Lehmann F.S., Trapani F., Fueglistaler I., Terracciano L.M., von Flüe M., Cathomas G., Zettl A., Benkert P., Oertli D., Beglinger C.: Clinical and histopathological correlations of fecal calprotectin release in colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20(17), 4994–4999.
  127. Shastri Y.M., Bergis D., Povse N., Schäfer V., Shastri S., Weindel M., Ackermann H., Stein J.: Prospective Multicenter Study Evaluating Fecal Calprotectin in Adult Acute Bacterial Diarrhea. *American Journal of Medicine*, 2008, 121(12), 1099–1106.
  128. Wen B.J., Te L.G., Liu X.X., Zhao J.H. The value of fecal calprotectin in *Clostridioides difficile* infection: A systematic review. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13, 881816. Doi: 10.3389/fphys.2022.881816.
  129. Lawson P.A., Citron D.M., Tyrrell K.L., Finegold S.M.: Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 2016, 40, 95–99.
  130. Farid Z., Nichols J.H., Bassily S., Schuler A.R.: Blood Loss in Pure *Ancylostoma duodenale* Infection in Egyptian Farmers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1965, 14(3), 375–378.
  131. Kalkofen U.P.: Attachment and feeding behavior of *Ancylostoma caninum*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 1970, 33(4), 339–354.
  132. Patel C., Keller L., Welsche S., Hattendorf J., Sayasone S., Ali S.M., Ame S.M., Coulbaly J.T., Hürlimann E., Keiser J.: Assessment of fecal calprotectin and fecal occult blood as point-of-care markers for soil-transmitted helminth attributable intestinal morbidity in a case-control substudy conducted in Côte d'Ivoire, Lao PDR and Pemba Island, Tanzania. *EclinicalMedicine*, 2021, 32, 100724. Doi: 10.1016/j.eclinm.2021.100724.
  133. de Gier B., Pita-Rodríguez G.M., Campos-Ponce M., van de Bor M., Chamnan C., Junco-Díaz R., Doak C.M., Fiorentino M., Kuong K., Angel-Núñez F., Parker M.E., Perignon M., Rojas-Rivero L., Berger J., Polman K., Wieringa F.T.: Soil-transmitted helminth infections and intestinal and systemic inflammation in schoolchildren. *Acta Tropica*, 2018, 182, 124–127.
  134. Loukas A., Prociw P. Immune Responses in Hookworm Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14(4), 689–703.
  135. Hanevik K., Hausken T., Morken M.H., Strand E.A., Mørch K., Coll P., Helgeland L., Langeland N.: Persisting symptoms and duodenal inflammation related to *Giardia duodenalis* infection. *Journal of Infection*, 2007, 55(6), 524–530.
  136. Aykur M., Armagan G., Vardar R., Dagci H.: Fecal calprotectin as a factor that supports the pathogenicity of *Dientamoeba fragilis*. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 139, 103868. Doi: 10.1016/j.micpath.2019.103868.
  137. Seo S.C., Ahn S.H., Ri S., Yoon Y., Byeon J.H., Kim S.H., Yoon W., Yoo Y.: Elevated fecal calprotectin levels are associated with severity of atopic dermatitis in children. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 2018, 36(2), 82–87.
  138. Kim M.J., Kim J.Y., Kang M., Won M.H., Hong S.H., Her Y.: Reduced Fecal Calprotectin and Inflammation in a Murine Model of Atopic Dermatitis Following Probiotic Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(11), 3968. Doi: 10.3390/ijms21113968.
  139. Heilmann R.M., Jergens A.E., Ackermann M.R., Barr J.W., Suchodolski J.S., Steiner J.M.: Serum calprotectin concentrations in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *American Journal of Veterinary Research*, 2012, 73(12), 1900–1907.
  140. Heilmann R.M., Grützner N., Handl S., Suchodolski J.S., Steiner J.M.: Preanalytical validation of an in-house radioimmunoassay for measuring calprotectin in feline specimens. *Veterinary Clinical Pathology*, 2018, 47(1), 100–107.
  141. Enderle L.L., Köller G., Heilmann R.M.: Verification of the fCAL turbo immunoturbidimetric assay for measurement of the fecal calprotectin concentration in dogs and cats. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2022, 34(5), 813–824.
  142. Grellet A., Heilmann R.M., Lecoindre P., Feugier A., Day M.J., Peeters D., Freiche V., Hernandez J., Grandjean D., Suchodolski J.S., Steiner J.M.: Fecal calprotectin concentrations in adult dogs with chronic diarrhea. *American Journal of Veterinary Research*, 2013, 74(5), 706–711.
  143. Heilmann R.M., Berghoff N., Mansell J., Grützner N., Parnell N.K., Gurtner C., Suchodolski J.S., Steiner J.M.: Association of fecal calprotectin concentrations with disease severity, response to treatment, and other biomarkers in dogs with chronic inflammatory enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2018, 32(2), 679–692.
  144. Heilmann R.M., Steiner J.M.: Clinical utility of currently available biomarkers in inflammatory enteropathies of dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2018, 32(5), 1495–1508.
  145. Xenoulis P.G., Heilmann R.M., Stavroulaki E.M., Riggers D.S., Gneipel L.J., Suchodolski J.S., Steiner J.M.: Associations among serum insulin, calprotectin, and C-reactive protein concentrations in Miniature Schnauzers with idiopathic hyperlipidemia before and after feeding an ultra-low-fat diet. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2022, 36(3), 910–918.
  146. Thames B.E., Barr J.W., Suchodolski J.S., Steiner J.M., Heilmann R.M.: Prospective evaluation of S100A12 and S100A8/A9 (calprotectin) in dogs with sepsis or the systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2019, 31(4), 645–651.
  147. Grellet A., Mila H., Heilmann R.M., Feugier A., Gruetzner N., Suchodolski J.S., Steiner J.M., Chastant-Maillard S.: Effect of age, gestation and lactation on faecal IgA and calprotectin concentrations in dogs. *Journal of Nutritional Science*, 2014, 3, e41. Doi: 10.1017/jns.2014.44.
  148. Riggers D.S., Gurtner C., Protschka M., Böttcher D., von Bomhard W., Alber G., Winter K., Steiner J.M., Heilmann R.M.: Intestinal S100/Calgranulin Expression in Cats with Chronic Inflammatory Enteropathy and Intestinal Lymphoma. *Animals*, 2022, 12(16), 2044. Doi: 10.3390/ani12162044.
  149. Ziółkowska N., Paździor-Czapula K., Lewczuk B., Mikulska-Skupień E., Przybylska-Gornowicz B., Kwiecińska K., Ziółkowski H.: Feline Infectious Peritonitis: Immunohistochemical Features of Ocular Inflammation and the Distribution of Viral Antigens in Structures of the Eye. *Veterinary Pathology*, 2017, 54(6), 933–944.
  150. Dandrieux J.R., Martinez Lopez L.M., Stent A., Jergens A., Allenspach K., Nowell C.J., Firestone S.M., Kimpton W., Mansfield C.S.: Changes in duodenal CD163-positive cells in dogs with chronic enteropathy after successful treatment. *Innate Immunity*, 2018, 24(7), 400–410.