

Фекальный кальпротектин — новый количественный биомаркер острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина» с вовлечением кишечника после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток

О.В. Голощанов¹, В.Н. Вавилов^{1,2}, Л.С. Зубаровская^{1,2},
И.В. Казанцев^{1,2}, Ю.Г. Васильева^{1,2}, Р.В. Клементьева¹, А.Л. Алянский¹,
В.В. Байков^{1,2}, О.В. Паина¹, Е.В. Семенова^{1,2}, Б.В. Афанасьев^{1,2}

РЕФЕРАТ

Fecal calprotectin — new quantity biomarker of acute and chronic gut «graft versus host disease» after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

O.V. Goloschapov¹, V.N. Vavilov^{1,2}, L.S. Zubarovskaya^{1,2},
I.V. Kazantsev^{1,2}, Y.G. Vasilieva^{1,2}, R.V. Klementeva¹,
A.L. Aljanasky¹, V.V. Baikov^{1,2}, O.V. Paina¹,
E.V. Semenova^{1,2}, B.V. Afanasyev^{1,2}

SUMMARY

Aim. To assess the role of fecal calprotectin (FC) as a biomarker for early diagnosis of gut acute and chronic «graft versus host disease» (GVHD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT).

Methods. After allo-HSCT 46 patients were investigated, the level of FC was estimated in 171 stool samples. For FC assay IFA method was used by Human Calprotectin ELISA kit (Hycult biotech).

Results. The level of FC was higher in patients with gut acute and chronic GVHD, median of FC level ($n = 18$) at the moment of diagnosis was 210.5 (4.0–653.9) $\mu\text{g/g}$. In patients with another reasons of diarrhea ($n = 16$) median of FC level was $< 13 \mu\text{g/g}$. In patients before conditioning regimen level of FC was $< 4 \mu\text{g/g}$, at the moment of leukocytes recovery $> 1.0 \times 10^9/\text{L}$ median of FC level was 7.7 (4.0–72.7) $\mu\text{g/g}$ with reduction $< 4 \mu\text{g/g}$. Correlation between stool volume and level of FC was $r = 0.76$ ($p < 0.01$). Specificity of method — 100 %, sensibility — 83.3 %.

Conclusion. Fecal calprotectin may be a quantity biomarker of acute and chronic GVHD with involvement of gut to be used for diagnosis and correction of immunosuppressive therapy of these complications.

Keywords: fecal calprotectin, quantity biomarker, hematopoietic stem cell transplantation, acute «graft versus host disease», chronic «graft versus host disease».

¹ R. Gorbacheva Memorial Institute of Children Hematology and Transplantation, St. Petersburg's State Pavlov Medical University

² Chair of Hematology, Transfusiology and Transplantation, St. Petersburg's State Pavlov Medical University

Контакты: golocht@yandex.ru

Принято в печать: 16 февраля 2011 г.

Цель исследования — определить диагностическую ценность фекального кальпротектина как биомаркера РТПХ (реакция «трансплантат против хозяина») ЖКТ после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК).

Обследовано 46 пациентов после аллоТГСК. Проведено 171 исследование образцов стула для определения уровня фекального кальпротектина (ФК). Для выявления кальпротектина в стуле использован метод иммуноферментного анализа. ФК определяли с помощью коммерческих наборов Human Calprotectin ELISA kit (Hycult biotech).

Уровень ФК был значительно выше в образцах стула у пациентов с острой и хронической РТПХ ЖКТ. У пациентов с РТПХ ЖКТ ($n = 18$) медиана уровня ФК на момент диагностики составила 210,5 мкг/г (диапазон 4,0–653,9 мкг/г). У пациентов без РТПХ ЖКТ с изолированной острой РТПХ кожи и диареей другой этиологии ($n = 16$) медиана уровня ФК была не более 13 мкг/г. Уровень ФК у пациентов в контрольной группе до режима кондиционирования составлял менее 4 мкг/г, после аллоТГСК в момент восстановления уровня лейкоцитов — от $1,0 \times 10^9/\text{л}$ и выше при медиане 7,7 мкг/г (диапазон 4,0–72,7 мкг/г) с последующим снижением до менее 4 мкг/г. Коэффициент корреляции между объемом стула и уровнем ФК равнялся 0,76 ($p < 0,01$). Специфичность метода составила 100 %, чувствительность — 83,3 %.

Кальпротектин может быть количественным биомаркером острой и хронической РТПХ ЖКТ, позволяющим проводить диагностику и коррекцию иммуносупрессивной терапии у пациентов после аллоТГСК.

Ключевые слова

фекальный кальпротектин, количественный биомаркер, трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, диагностика острой и хронической реакции «трансплантат против хозяина».

ВВЕДЕНИЕ

Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) — осложнение, развивающееся у 40–80 % пациентов после различных видов аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК), которое в зависимости от сроков возникновения подразделяется на острую и хроническую РТПХ. В патогенезе острой РТПХ основную роль играет отсутствие полной совместимости

клеток донора и реципиента по НЛС-системе и реакция зрелых Т-лимфоцитов донора на клетки реципиента. Индукция острой РТПХ — многоступенчатый процесс, в основе которого лежит активация антигенпредставляющих клеток (АПК) реципиента в ответ на повреждение тканей, вызванное назначением режима кондиционирования. Далее под действием провоспалительных цитокинов — интерлейкинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8), фактора некроза опухолей α

¹ Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

² Кафедра гематологии, трансфузиологии и трансплантологии ФПО СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург

(ФНО- α) — происходит экспрессия HLA-антигенов I и II классов, молекул адгезии на клетках реципиента и донора. Провоспалительные цитокины и АПК индуцируют активацию Т-лимфоцитов и НК-клеток (естественные киллеры) донора, что влечет за собой выделение цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-2, ФНО- α , интерферон- γ) и дальнейшее повреждение тканей реципиента. Основными органами-мишенями при острой РТПХ служат кожа, печень и ЖКТ [1].

Развитие хронической РТПХ наблюдается в отдаленные сроки после трансплантации и по патогенезу близко аутоиммунным заболеваниям.

Одним из основных клинических проявлений острой РТПХ служит поражение органов ЖКТ различной степени выраженности — от инфильтрации слизистой оболочки желудка и кишечника лимфоцитами до развития обширных некротически-язвенных поверхностей. Выраженность реакции классифицируется от I до IV степени в соответствии с международными критериями на основании диспептических проявлений, наличия болевого синдрома, объема стула в течение суток и патологических примесей [2]. При развитии острой РТПХ III–IV степени летальность пациентов составляет 70–90 %.

Эффективность лечения острой РТПХ зависит от быстроты начала иммуносупрессивной терапии, что зачастую происходит несвоевременно ввиду отсутствия специфических симптомов со стороны ЖКТ на фоне мукозита, развития инфекционных осложнений. При хронической РТПХ вовлечение органов ЖКТ также сопровождается неспецифическими клиническими проявлениями: отсутствие аппетита, тошнота, рвота, потеря массы тела, диарея.

До настоящего времени не существует адекватных лабораторных методов диагностики РТПХ с вовлечением органов ЖКТ, что существенно снижает возможность раннего распознавания этого состояния. Предложенные маркеры — растворимые рецепторы интерлейкина-2 (ИЛ-2R), фактора некроза опухолей (ФНО-R1), ИЛ-8, ИЛ-12, ИЛ-18, фактор роста гепатоцитов (HGF) — практического применения до настоящего времени не нашли [3–9]. Основные недостатки связаны с отсутствием специфичности для острой или хронической РТПХ, многие из этих факторов служат маркерами острого воспаления, и их уровень повышается при инфекционном процессе.

Ввиду схожести клинической картины РТПХ с группой заболеваний, объединенных термином «воспалительные заболевания кишечника» (ВЗК), нами рассмотрена возможность применения маркера — фекального кальпротектина, определяющего активность течения и вероятность рецидива таких заболеваний, как неспецифический язвенный колит и болезнь Крона, для диагностики и коррекции иммуносупрессивной терапии РТПХ с вовлечением ЖКТ.

Фекальный кальпротектин (ФК) — белок, открытый в 1980 г. М.К. Fagerhol и соавт. [10], присутствует в большом количестве в цитоплазме нейтрофилов. Изначально был назван L1-протеином или L1-антигеном, в последующем получил название кальпротектин ввиду наличия гетерокомплекса с молекулярной массой 36,6 кДа, связанного с кальцием [11]. Позже в макрофагах пациентов с ревматоидным артритом К. Odink и соавт. клонировали два связанных с кальцием белка (MRP-8 и MRP-14) [12], которые были идентифицированы как легкая (MRP-8) и тяжелая (MRP-14) цепи комплекса L1 с молекулярной массой 10 и 14 кДа соответственно [13]. Таким образом, кальпротектин — гетерокомплекс, состоящий из двух тяжелых (L1H) и одной легкой (L1L) цепей [14], нековалентно связанных

между собой [15]. Кальпротектин имеет ряд синонимов: MRP8/14, S100A8/A9 и миелоидно-связанный белок 8 и 14. Гены, кодирующие белки S-100, выявлены на хромосоме 1q21 [16].

Кальпротектин обнаружен в клетках миелоидного ростка кроветворения (нейтрофилах, моноцитах, макрофагах) и не найден в эозинофилах и неактивированных В- и Т-лимфоцитах [17].

Функции кальпротектина различны и зависят от многих факторов. Одно из основных биологических свойств белка — участие в процессе воспаления. Кальпротектин высвобождается при гибели гранулоцитов, во время активации анафилаксом (C5a — белок комплемента), формил-пептидом [18]. Кальпротектин имеет выраженную функцию хемоаттрактанта [19–21] для макрофагов и моноцитов, вызывая их трансэпителиальное перемещение [22], уменьшает бактериальную адгезию на эпителиальных клетках слизистой оболочки [23]. Для некоторых видов микроорганизмов (*Candida albicans*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*) [24] найдены минимальные ингибирующие концентрации кальпротектина (антифунгальный, антибактериальный эффект) [25, 26]. Кальпротектин проявляет и непосредственную антимикробную активность за счет конкуренции с микроорганизмами за ионы цинка [27, 28].

Противоопухолевая и антипролиферативная активность белка заключаются в индукции апоптоза [29–32], иммунорегуляция осуществляется посредством влияния на синтез уровня иммуноглобулинов [33]. Основные функции кальпротектина представлены в табл. 1.

Таблица 1. Функции кальпротектина, по данным разных исследований

Функция	Исследование
Уменьшение бактериальной адгезии на эпителии слизистой оболочки	M. Steinbakk et al., 1990
	K. Mahnke et al., 1995
	P.A. Clohessy, B.E. Golden, 1995
	R.A. Newton, N. Hogg, 1998
Подобно антибиотикам, найдены минимальные ингибирующие концентрации самого кальпротектина для <i>Candida albicans</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i>	K. Nisapakultorn et al., 2001
	I. Eue et al., 2002
Роль в воспалительном процессе, регулирует взаимодействие миелоидных клеток с эндотелием, участвует в процессах заживления раны	M. Steinbakk et al., 1990
	P. Brandtzaeg et al., 1995
Противоопухолевый эффект против широкого диапазона клеточных линий опухоли	I. Striz et al., 2004
	S. Yui et al., 1995
	S. Yui et al., 1997
	S. Yui et al., 2002
	S. Ghavami et al., 2004
	H. Zali et al., 2007
Индукция апоптоза	S. Yui et al., 1995
	S. Yui et al., 1997
	S. Yui et al., 2002
	S. Ghavami et al., 2004
	H. Zali et al., 2007
Имунорегуляция	J.G. Brun et al., 1994

Кальпротектин обнаружен во многих биологических жидкостях: сыворотке [34–36] и плазме крови [37], слюне [38], ликворе [39], синовиальной жидкости [40], слизистой оболочке и тканях [41, 42], выпоте при перитоните [43].

До недавнего времени «золотым стандартом» контроля активности ВЗК было определение фекального выделения меченных индием-111 (^{111}In) гранулоцитами [44]. Однако сложность выполнения, высокая стоимость и необходимость ионизированного облучения пациентов ограничивали использование этого метода. А.Г. Roseth и соавт. предложили метод количественного определения кальпротектина в экскрементах и выявили прямую корреляцию между средним ежедневным выделением кальпротектина и мечеными радиоактивным ^{111}In гранулоцитами [45].

Уровень кальпротектин в кале (фекальный кальпротектин), отражая миграцию гранулоцитов через слизи-

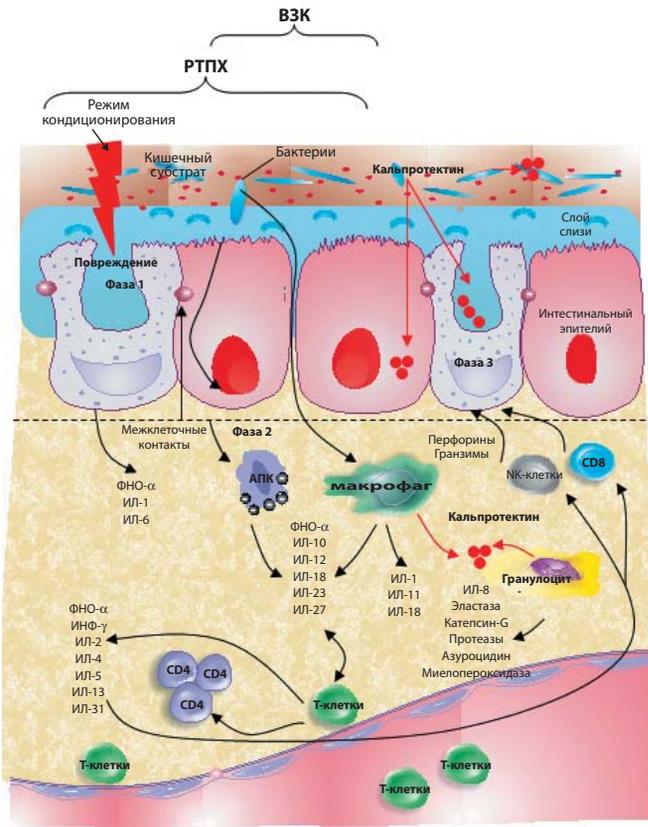


Рис. 1. Роль кальпротектина в патогенезе воспалительных заболеваний кишечника и реакции «трансплантат против хозяина». Пунктирной линией представлены общие механизмы патогенеза РТПХ ЖКТ и ВЗК. Апоптоз клеток индуцируется CD4+ и CD8+ Т-клетками, ФНО-α, ИЛ-1, окисью азота, активированными макрофагами. Возможно, кальпротектин, как и ИЛ-8, служит хемоаттрактантом, который способствует прямому перемещению клеток к органам-мишеням. Фаза 1 — фаза повреждения, фаза 2 — фаза «цитокинового шторма», фаза 3 — эффекторная

стую оболочку кишки у пациентов с ВЗК, служит альтернативой специфичному исследованию интестинальных лейкоцитов, меченных ¹¹¹In, будучи простым и недорогим методом [46].

ФК как воспалительный маркер полезен для дифференциации функциональных и органических заболеваний кишечника, синдрома раздраженной кишки, ВЗК (болезни Крона и неспецифического язвенного колита) [47–50].

ФК устойчив в экскрементах во время хранения в течение 7 дней при комнатной температуре и не подвержен воздействию протеолитических ферментов. Несмотря на отсутствие различия между пред- и постэндоскопическим забором материала на ФК, предпочтительно анализировать фекалии перед эндоскопией [51].

У здоровых лиц концентрация ФК имеет ежедневные колебания, но не превышает 50 мкг/г [52].

Определение ФК было использовано в качестве основного воспалительного и/или маркера острого отторжения аллотрансплантата тонкой кишки [53]. Уровень кальпротектина в кишечном содержимом (из илеостомы) у пациентов с реакцией отторжения был значительно выше, чем у пациентов с вирусным энтеритом и при отсутствии гистологических изменений в кишке, характерных для реакции отторжения трансплантата, составляя 198, 7 и 19 мг/кг соответственно.

Таким образом, определение ФК в образцах стула используется для диагностики отторжения трансплантата при аллогенной трансплантации кишки. Патофизиология отторжения имеет общие черты с РТПХ при аллотГСК. В развитии реакции отторжения цитотоксические лимфоциты реципиента посредством цитокинов активируют нейтрофилы и макрофаги против трансплантируемого

органа-мишени. При острой РТПХ цитотоксические лимфоциты донора активируют нейтрофилы и макрофаги против собственных тканей реципиента.

Патогенез, клинические проявления и терапия ВЗК и РТПХ ЖКТ, двух не связанных патологий, имеют много общего (табл. 2 и 3; рис. 1).

Цель работы — определить клиническое значение уровня ФК при острой и хронической РТПХ для диагностики вовлечения ЖКТ.

Таблица 2. Патогенез воспалительных заболеваний кишечника и реакции «трансплантат против хозяина» ЖКТ

Фактор патогенеза	ВЗК	РТПХ ЖКТ
Бактериальные и тканевые антигены вызывают стимуляцию Т- и В-лимфоцитов	+	+
Дефицит Т-супрессоров	+	+
Цитотоксическое действие лимфоцитов	+	+
Стимуляция хемотаксиса нейтрофилов и фагоцитов	+	+
Участие медиаторов воспаления	+	+
Повреждающее действие на ткани оказывают активный кислород и протеазы	+	+
Деструкция эпителиальных клеток — апоптоз	+	+
Иммунокомпетентные клетки в составе воспалительного инфильтрата в собственной пластинке толстой кишки	+	+
Сочетание с другими иммунными поражениями органов и тканей	+	+
Нарушения клеточного и гуморального иммунитета	+	+
Хороший ответ на кортикостероидные гормоны и цитостатики	+	+

Таблица 3. Клинические проявления воспалительных заболеваний кишечника и реакции «трансплантат против хозяина» ЖКТ

Симптом	ВЗК	РТПХ ЖКТ
Боль в животе	+	+
Диарея с примесью крови и слизи 10–15 раз в сутки	+	+
Дегидратация	+	+
Метеоризм	+	+
Анемия	+	+

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

В период с марта по ноябрь 2010 г. обследовано 46 пациентов (табл. 4) после аллотГСК.

Показаниями для исследования стула были клинические признаки острой и хронической РТПХ с вовлечением кишечника, острая РТПХ со стороны кожи, диарея иной этиологии, подозрение на инфекции ЖКТ (вирусной, грибковой, бактериальной этиологии). В контрольную группу вошли пациенты без каких-либо проявлений РТПХ и осложнений со стороны ЖКТ.

В зависимости от клинических симптомов и гистологической верификации диагноза все пациенты были разделены на четыре группы.

1. Пациенты с острой и хронической РТПХ с вовлечением ЖКТ (из них 13 пациентов имели сочетание РТПХ ЖКТ и РТПХ кожи). День начала РТПХ ЖКТ в группе 1 считался первоначальным днем исследования на ФК, далее уровень ФК определяли 1 раз в 7 дней в течение 8 нед.
2. Пациенты с острой РТПХ с поражением кожи (без клинических проявлений со стороны ЖКТ). Первым днем исследования на ФК в группе 2 считалось начало клинической картины острой РТПХ кожных покровов. Исследование выполняли до двух отрицательных значений ФК с интервалом 1 нед.
3. Пациенты, имевшие диарею другой этиологии, с неподтвержденным по данным биопсии диагнозом острой РТПХ толстой кишки. Первым днем исследования на ФК в группе 3 было начало диареи. Исследование выполняли до колоноскопии с биопсией слизистой оболочки, до двух отрицательных значений ФК с интервалом 1 нед.

Таблица 4. Характеристика пациентов (n = 46)

Показатель	Группа 1, n = 18, медиана (диапазон)	Группа 2, n = 7, медиана (диапазон)	Группа 3, n = 9, медиана (диапазон)	Группа 4, n = 12, медиана (диапазон)
Возраст, лет	18 (2–47)	19 (6–39)	16 (2–53)	21 (3–38)
Пол, М/Ж	11/7	4/3	4/5	10/2
Диагноз				
Злокачественные*	16	7	7	12
Другие**	2	0	2	0
Донор				
Родственный	6	1	2	2
Неродственный	9	4	5	7
Гаплоидентичный	3	2	2	3
Режим кондиционирования				
МАК	9	2	5	4
РКСИД	9	5	4	8
Профилактика острой РТПХ				
ЦА, МТХ, ММФ	10	2	5	4
Тх, МТХ, АЛГ	8	5	4	8
РТПХ	Да	Да	Нет	Нет
РТПХ ЖКТ	Да	Нет	Нет	Нет
РТПХ кожи	Да/нет	Да	Нет	Нет
Начало острой РТПХ ЖКТ, день	35-й (15–66-й)	0	0	0
Степень острой РТПХ ЖКТ				
I–II	6	0	0	0
III–IV	7	0	0	0
Начало острой РТПХ кожи, день	26-й (12–61-й)	34-й (9–78-й)	0	0
Степень острой РТПХ кожи				
I–II	7	7	0	0
III–IV	2	0	0	0
Начало хронической РТПХ ЖКТ, день	144-й (114–223-й)	0	0	0
Хроническая РТПХ ЖКТ	5	0	0	0
Начало хронической РТПХ кожи, день	157-й (111–202-й)	0	0	0
Хроническая РТПХ кожи	4	0	0	0
Колоноскопия с биопсией, всего 24 исследования	18	0	6	0
Количество исследований ФК, всего 171	107	14	18	32

Сокращения: АЛГ — антилимфоцитарный глобулин; МАК — миелоаблятивное кондиционирование; ММФ — микофенолата мофетил; МТХ — метотрексат; РКСИД — режим кондиционирования со сниженной интенсивностью доз; Тх — такролимус; ЦА — циклоспорин А.

* Миелодиспластический синдром — 4, неходжкинские лимфомы — 3, острый лимфобластный лейкоз — 13, острый миелоидный лейкоз — 15, хронический лимфолейкоз — 1, хронический миелолейкоз — 6.

** Апластическая анемия — 1, синдром Вискотта—Олдрича — 1, анемия Фанкони — 1, синдром Гурлер — 1.

4. У пациентов контрольной группы уровень ФК определяли до режима кондиционирования и после аллотГСК в момент восстановления уровня лейкоцитов более $1,0 \times 10^9/\text{л}$. Пациентам с повышенным уровнем ФК на момент восстановления лейкоцитов выполняли повторные исследования до снижения ФК < 4 мкг/г (минимальная чувствительность метода).

24 из 27 пациентов, имевших диарею после аллотГСК, выполнена колоноскопия с последующим гистологическим исследованием слизистой оболочки толстой кишки из 3–5 мест с целью верификации диагноза. Всем пациентам из группы 1 и 6 — из группы 3 выполнена колоноскопия, у 3 пациентов из группы 3 колоноскопия не проводилась ввиду доказанной причины диареи и в связи с хорошим ответом на антибактериальную терапию. Колоноскопию выполняли в срок до 36 ч от начала диареи. Уровень ФК во всех случаях определяли до колоноскопии.

В день определения ФК всем пациентам выполняли следующие исследования: клинический анализ крови, биохимический анализ крови с определением уровня электролитов, анализ каловых масс на скрытую кровь, яйца глистов и исключения других паразитов, вирусологическое исследование стула, анализ на клостридиальные токсины А и В.

Гистологический анализ препаратов проведен в клиничко-анатомической лаборатории СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова (проф. В.В. Байков).

Для количественного определения ФК осуществлено 171 исследование образцов стула методом иммуноферментного анализа. Исследование проводили в Научно-исследовательской лаборатории «Диагностика», Санкт-Петербург (руководитель М.А. Суворова). ФК определяли с помощью коммерческих наборов Human Calprotectin ELISA kit (Hycult Biotech, Нидерланды). Маркер использовали для дифференциальной диагностики острой или хронической РТПХ ЖКТ различной степени тяжести с другими осложнениями со стороны ЖКТ, проявляющимися диареей (мукозит, инфекция), а также в качестве контроля за эффективностью лечения острой и хронической РТПХ с помощью комбинации иммуносупрессивных препаратов. Минимальная чувствительность метода составляла менее 4 мкг/г. Норма для ФК установлена до 50 мкг/г [52].

Профилактику острой РТПХ во всех группах проводили препаратами циклоспорин А или такролимус в комбинации с метотрексатом или микофенолата мофетилом. У пациентов с острой РТПХ ЖКТ лечение начинали с глюкокортикоидов в дозе 1 мг/кг. При отсутствии эффекта терапия была продолжена препаратами второй линии (моноклональные антитела — инфликсимаб, алемтузумаб, этанерцепт, абатацепт) или экстракорпоральным фотоферезом (этанерцепт).

Полученные данные обработаны непараметрическими методами статистики (U-критерий Манна—Уитни) с помощью программы Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США). Анализ клинических и лабораторных данных осуществляли с использованием коэффициента Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В момент диагностики (рис. 2) острой и хронической РТПХ с вовлечением ЖКТ (n = 18) медиана уровня ФК составила 210,5 мкг/г (диапазон 4,0–653,9 мкг/г).

У всех пациентов группы 1 одновременно выполнена колоноскопия с биопсией слизистой оболочки, которые подтвердили поражение толстой кишки, характерное для РТПХ ЖКТ. В ответ на терапию острой РТПХ уровень ФК в течение 8 нед. наблюдения нормализовался у 13 (72,2 %) пациентов (рис. 3), у 5 — оставался выше 50 мкг/г.

У пациентов в группе 2 (острая РТПХ с вовлечением кожи) и группе 3 медиана уровня ФК была в пределах 4 (диапазон 4,0–5,3 мкг/г) и 4 мкг/г (диапазон 4–13 мкг/г) соответственно.

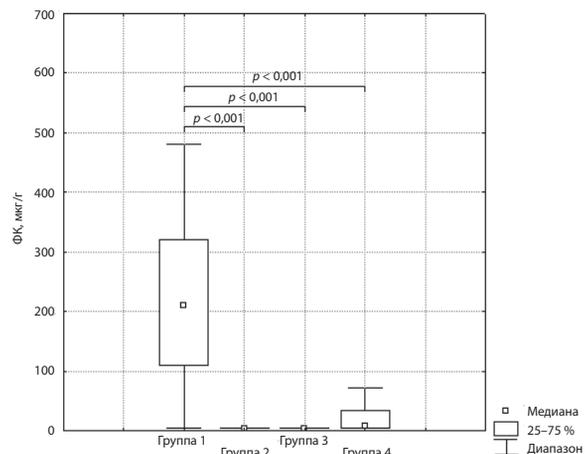


Рис. 2. Медиана значений фекального кальпротектина в группах на момент диагностики реакции «трансплантат против хозяина» ЖКТ

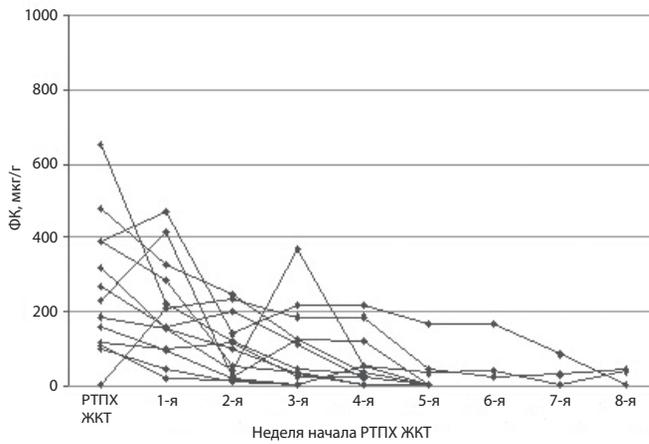


Рис. 3. Уровень фекального кальпротектина при ответе на терапию в течение 8 нед. от начала реакции «трансплантат против хозяина» ЖКТ

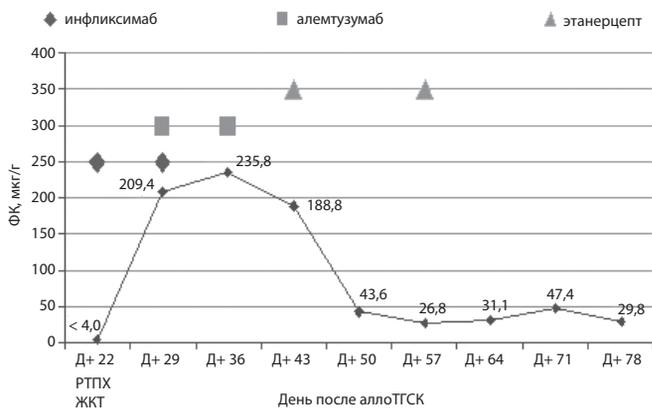


Рис. 5. Динамика фекального кальпротектина в ответ на комбинированную терапию у пациента с острой реакцией «трансплантат против хозяина» ЖКТ. Клинический пример № 1

У пациентов в группе 3 были выявлены следующие причины энтеропатии: 1 — энтеровирусная инфекция, 1 — *Lambliа intestinalis*, 1 — клостридиальная инфекция. У 6 пациентов причина диареи не установлена. Колоноскопия с биопсией слизистой оболочки толстой кишки выполнена у 6 пациентов в группе 3, при этом гистологическое исследование не подтвердило наличия острой РТПХ ни у одного из них. Все пациенты группы 3 ответили на комбинированную эмпирическую антибактериальную, противовирусную и противогрибковую терапию, используемую обычно в ранний период после аллотГСК.

У пациентов из группы 4 (рис. 4) уровень ФК до аллотГСК не превышал 4 мкг/г. При восстановлении лейкоцитов более $1,0 \times 10^9/\text{л}$ медиана уровня ФК в группе составила 7,7 мкг/г (диапазон 4,0–72,7 мкг/г). Восстановление лейкоцитов более $1,0 \times 10^9/\text{л}$ на 18-й день (диапазон 11–25 дней) не увеличивало уровень ФК у 6 пациентов, который составил менее 4 мкг/г. У других 6 пациентов медиана уровня ФК была более 4 мкг/г и составила 33,6 мкг/г (11,2–72,7 мкг/г). Повторное определение ФК через 7 дней у 4 из них выявило снижение ФК до значения менее 4 мкг/г. У 2 пациентов ФК достиг уровня менее 4 мкг/г еще через 7 дней.

У 2 больных из группы 1 наблюдали рост ФК на день восстановления и далее, что сопровождалось развитием острой РТПХ ЖКТ (см. рис. 4, а и б). Из них у 1 пациента (см. рис. 4, а) уровень ФК на Д+ 20, за 4 дня до начала клинических проявлений острой РТПХ с поражением кишечника, составил 11,2 мкг/г. Последующее исследование, проведенное на Д+ 25 в момент начала диареи, выявило увеличение уровня ФК (ФК 151 мкг/г) в 13 раз.

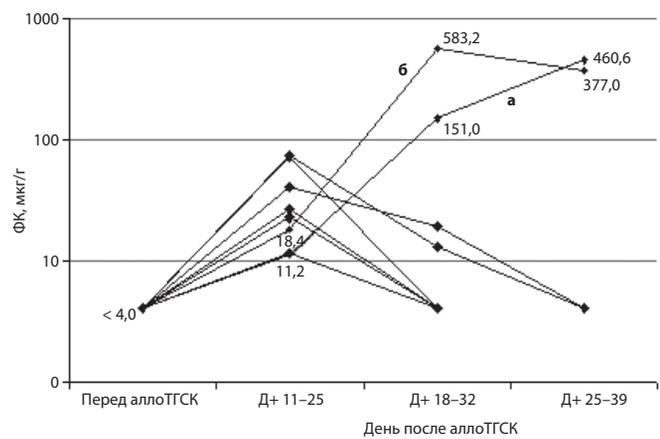


Рис. 4. Уровень фекального кальпротектина на момент восстановления лейкоцитов после аллотГСК: а и б — пациенты, с развившейся острой реакцией «трансплантат против хозяина» ЖКТ после восстановления уровня лейкоцитов Engraftment — день восстановления уровня лейкоцитов более $1,0 \times 10^9/\text{л}$; Д+ — день после ГСК.

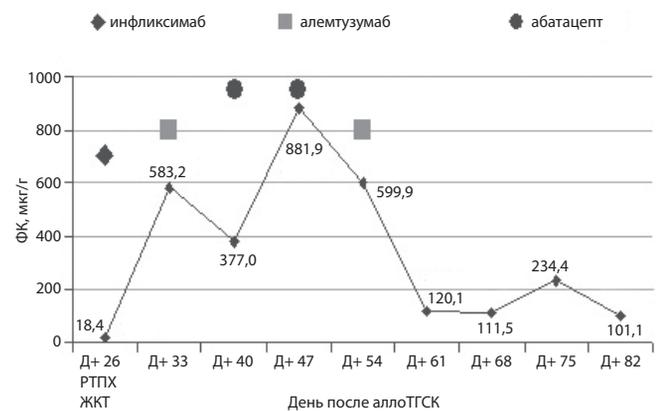


Рис. 6. Динамика уровня фекального кальпротектина в ответ на комбинированную терапию пациента с острой реакцией «трансплантат против хозяина» ЖКТ. Клинический пример № 2

В группе 1 коэффициент корреляции по Спирмену между объемом стула и уровнем ФК равнялся 0,76 ($p < 0,01$). Для объема стула до 999 мл медиана ФК составила 120,1 мкг/г (диапазон 4,0–417,0 мкг/г), для объема стула более 1000 мл — 274,8 мкг/г (диапазон 56,6–881,9 мкг/г).

Определение уровня ФК использовали в качестве маркера эффективности иммуносупрессивной терапии у пациентов с острой и хронической РТПХ. У пациентов с РТПХ ЖКТ мы отмечали снижение уровня ФК в ответ на лечение кортикостероидами, инфликсимабом, этанерцептом, абатацептом, алемтузумабом и терапию с использованием экстракорпорального фотофереза (рис. 5 и 6).

На рис. 5. показана динамика ФК у пациента с острой РТПХ с поражением кишечника, возникшая на Д+ 22 после аллотГСК в ответ на комбинированную терапию инфликсимабом, алемтузумабом и этанерцептом, проводимую на фоне базовой терапии циклоспорином А (с поддержанием терапевтической концентрации) и кортикостероидами. На фоне терапии наблюдали снижение ФК с 235,8 до 29,8 мкг/г, уменьшение клинических проявлений острой РТПХ.

На рис. 6 показана динамика уровня ФК в ответ на комбинированную иммуносупрессивную терапию (инфликсимаб, алемтузумаб и абатацепт) у пациента с острой РТПХ ЖКТ. Терапия привела к снижению уровня ФК, сопровождалась исчезновением болевого синдрома, диспептических проявлений, уменьшением кратности и объема стула.

Таким образом, ФК в нашем исследовании рассмотрен в качестве потенциального диагностического количественного биомаркера РТПХ при вовлечении органов ЖКТ.

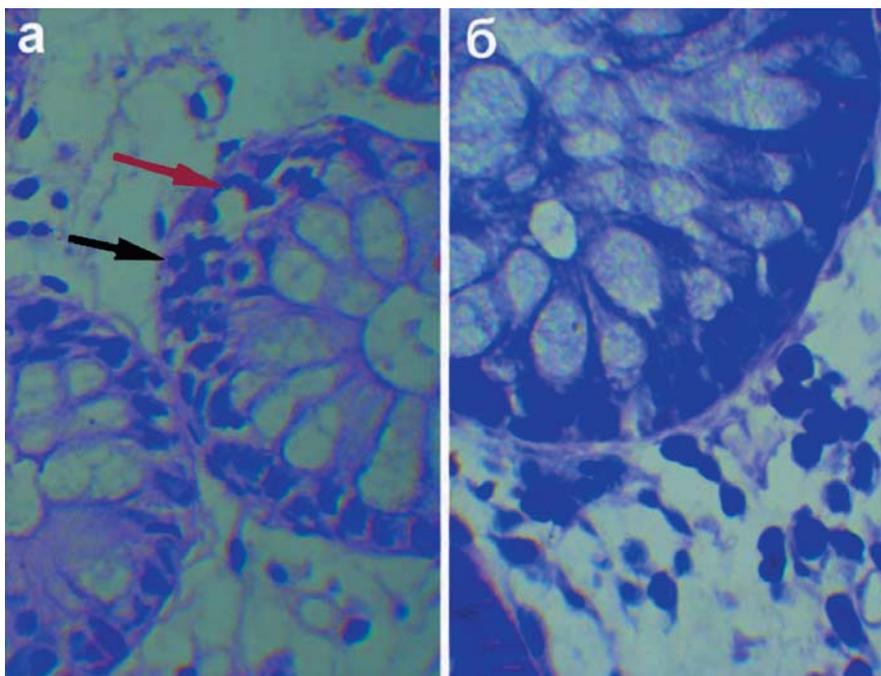


Рис. 7. Зависимость между уровнем кальпротектина и степенью выраженности гистологической картины острой реакции «трансплантат против хозяина» толстой кишки:

а — гистологические изменения толстой кишки при острой РТПХ, $\times 400$. Избыток интраэпителиальных лимфоцитов, признаки повреждения эпителия с вакуолизацией цитоплазмы (черная стрелка), апоптотные тельца в эпителии крипт (красная стрелка). Биопсия на Д+ 33; **б** — гистологические изменения при нормализации клинической картины острой РТПХ, $\times 400$. В строме интенсивная плазмоцитарная инфильтрация с примесью лимфоцитов. Биопсии на Д+ 82. Признаки повреждения эпителия, описанные в биоптате от Д+ 33, отсутствуют

Чувствительность метода была равна 83,3 %. Из 18 пациентов с РТПХ ЖКТ у 3 на момент диагностики показатель уровня ФК был отрицательным (< 50 мкг/г). Специфичность метода в группе пациентов с диареей (группы 1 и 3, $n = 27$) составила 100 %: у всех пациентов с РТПХ ЖКТ уровень ФК был более 50 мкг/г.

При повторных гистологических исследованиях выявлена зависимость между высоким уровнем кальпротектина и степенью выраженности гистологической картины острой РТПХ ЖКТ. Гистологическая картина у пациента на Д+ 33 после аллотГСК при уровне ФК 583,2 мкг/г показана на рис. 7, *а*; на Д+ 82 при ФК 101,1 мкг/г — на рис. 7, *б*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие острой и хронической РТПХ с вовлечением ЖКТ, особенно в начале клинических проявлений, достаточно сложно дифференцировать от диареи другой этиологии. Основными критериями ответа на терапию РТПХ с вовлечением кишечника служат улучшение общего самочувствия пациента, уменьшение болевого синдрома, кратности и объема стула за сутки, отсутствие крови в фекалиях. В то же время возможными факторами, способствующими возникновению диареи после аллотГСК, бывают энтеропатия вследствие нарушения диеты, диарея, связанная с антибактериальной терапией, развитием панкреатита, как результат действия препаратов с прокинетиическим эффектом (метоклопрамид, эритромицин), псевдомембранозным колитом, на фоне вирусной, бактериальной и грибковой инфекции, лямблиоза, гельминтозов и т. д.

До сих пор не существует лабораторных методов, позволяющих верифицировать РТПХ на ранних стадиях, провести дифференциальную диагностику, а также осуществлять контроль за эффективностью проводимой терапии.

Наряду с этим зачастую клинические проявления РТПХ не коррелируют с эндоскопической картиной при выполнении колоноскопии и гистологическим исследованием слизистой оболочки толстой кишки.

Таким образом, актуальность разработки и внедрения лабораторных методов, особенно скрининг-диагностики, острой или хронической РТПХ с поражением кишечника не вызывает сомнения. Эти тесты должны иметь высокую специфичность и чувствительность, что необходимо для прогно-

зирования рецидива РТПХ и контроля за эффективностью иммуносупрессивной терапии, для проведения дифференциальной диагностики РТПХ ЖКТ с диареей другой этиологии. В дополнение к этому важные факторы метода диагностики — неинвазивность исследования, скорость выполнения, невысокая стоимость, стабильность собранного материала, рутинное использование в повседневной практике, возможность применения в амбулаторных условиях.

Определение ФК имело не только диагностическое, но и прогностическое значение, особенно для группы пациентов при восстановлении лейкоцитов после аллотГСК или синдроме острого приживления. Для этой группы, по нашим данным, в 50 % случаев характерно повышение кальпротектина в стуле с дальнейшим снижением уровня ФК без терапии в течение 7–14 дней (см. рис. 4). Однако у 2 пациентов, у которых ФК был повышен в момент приживления и далее не снижался, развилась острая РТПХ ЖКТ (см. рис. 4, *а* и *б*). Таким образом, повторно определяя ФК в момент восстановления гемопоэза, можно говорить о прогностическом значении ФК в диагностике острой РТПХ ЖКТ.

Наше исследование показало снижение ФК в ответ на иммуносупрессивную терапию, и мы предполагаем, что с помощью этой методики можно получить данные о длительности действия и эффективности иммуносупрессивных препаратов, что может быть использовано не только для диагностики острой или хронической РТПХ, но и для коррекции терапии.

К факторам, повышающим уровень ФК, относятся бактериальная и грибковая инфекции ЖКТ. В связи с этим при трактовке данных по ФК эти состояния должны быть исключены. На уровень ФК также может влиять наличие сопутствующих заболеваний: болезнь Крона, неспецифический язвенный колит, колоректальный рак, полипоз толстой кишки. Возможно, для более корректной трактовки результатов анализа на ФК и исключения предшествующей аллотГСК патологии кишечника (ВЗК, полипоз кишечника) первый тест по определению его уровня необходимо проводить до аллотГСК.

Таким образом, ФК — стабильный количественный биомаркер острой и хронической РТПХ с поражением ЖКТ. ФК может применяться для скрининг-диагностики РТПХ, а также в качестве контроля за эффективностью иммуносупрессивной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Paczesny S., Hanauer D., Sun Y., Reddy P. New perspectives on the biology of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 2010; 45(1): 1–11.
2. Glucksberg H., Storb R., Fefer A. et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 1974; 18(4): 295–304.
3. Grimm J., Zeller W., Zander A. et al. Soluble interleukin-2 receptor serum levels after allogeneic bone marrow transplantation as marker for GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 1998; 21(1): 29–32.
4. Nakamura H., Komatsu K., Ayaki M. et al. Serum levels of soluble IL-2 receptor, IL-12, IL-18, and IFN-gamma in patients with acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000; 106: S45–50.
5. Or R., Kalinkovich A., Nagler et al. Soluble tumor necrosis factor (sTNF) receptors: a possible prognostic marker for bone marrow transplantation-related complications. *Cytokines Mol. Ther.* 1996; 2(4): 243–50.
6. Okamoto T., Takatsuka H., Fujimori Y. et al. Increased hepatocyte growth factor in serum in acute graft-versus host disease. *Bone Marrow Transplant.* 2001; 28(2): 197–200.
7. Ugucioni M., Malconi R., Nesci S. et al. Elevated interleukin-8 serum concentrations in beta-thalassemia and graft-versus host disease. *Blood* 1993; 81(9): 2252–6.
8. Piper K.P., Horlock C., Curnow S.J. et al. CXCL 10-CXCR3 interactions play an important role in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease in the skin following allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2007; 110(12): 3827–32.
9. Hori T., Naishiro Y., Sohma H. et al. CCL8 is a potential molecular candidate for the diagnosis of graft-versus-host disease. *Blood* 2008; 111(8): 4403–12.
10. Fagerhol M.K., Dale I., Anderson T. Release and quantitation of a leucocyte derived protein (L1). *Scand. J. Hematol.* 1980; 24: 393–8.
11. Dale I., Magne K., Fagerhol M.K., Naesgaard I. Purification and partial characterization of a highly immunogenic human leucocyte protein, the L1 antigen. *Eur. J. Biochem.* 1983; 134: 1–6.
12. Odink K., Cerletti N., Bruggen J. et al. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature* 1987; 330(6143): 80–2.
13. Andersson K.B., Sletten K., Berntzen H.B., Fagerhol M.K. Leucocyte L1 protein and the cystic fibrosis antigen. *Nature* 1988; 332(6166): 688.
14. Fagerhol M.K., Andersson K.B., Naess-Andresen C.F. et al. Calprotectin (the L1 leucocyte protein). In: Stimulus response coupling: the role of intracellular calcium-binding proteins. Ed. by V.L. Smith, J.R. Dedman. Boca Raton: CRC Press, 1990: 187–210.
15. Naess-Andresen C.F., Egelanddal B., Fagerhol M.K. Calcium binding and concomitant changes in the structure and heat stability of calprotectin (L1 protein). *Clin. Mol. Pathol.* 1995; 48(5): M278–M84.
16. Marenholz I., Lovering R.C., Heizmann C.W. An update of the S100 nomenclature. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006; 1763(11): 1282–3.
17. Dale I., Brandtzaeg P., Fagerhol M.K., Scott H. Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. Immunofluorescence and immunoperoxidase staining features in comparison with lysozyme and lactoferrin. *Am. J. Clin. Pathol.* 1985; 84(1): 24–34.
18. Hetland G., Talgo G.J., Fagerhol M.K. Chemotaxis C5a and fMLP induce release of calprotectin (leucocyte L1 protein) from polymorphonuclear cells in vitro. *Mol. Pathol.* 1998; 51(3): 143–8.
19. Hu S.P., Harrison C., Xu K., Cornish C.J. Induction of the chemotactic S100 protein, CP-10, in monocyte/macrophages by lipopolysaccharide. *NSW* 1996; 87(9): 3919–28.
20. Ryckman C., Vandal K., Rouleau P. et al. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis. *J. Immunol.* 2003; 170: 3233–42.
21. Vandal K., Rouleau P., Boivin A. et al. Blockade of S100A8 and S100A9 suppresses neutrophil migration in response to lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 2003; 171(5): 2602–9.
22. Raquil M.A., Anceriz N., Rouleau P., Tessier P.A. Blockade of antimicrobial proteins S100A8 and S100A9 inhibits phagocyte migration to the alveoli in streptococcal pneumonia. *J. Immunol.* 2008; 180(5): 3366–74.
23. Nisapakultorn K., Karen F., Ross M., Herzberg C. Calprotectin expression inhibits bacterial binding to mucosal epithelial cells. *Infect. Immunity* 2001; 69(6): 3692–6.
24. Urban C.F., Ermert D., Schmid M. et al. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Path.* 2009; 5(10): e1000639.
25. Steinbakk M., Naess-Andresen C.F., Lingaas E. et al. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet* 1990; 336(8718): 763–5.
26. Brandtzaeg P., Gabrielsen T.O., Dale I. et al. The leucocyte protein L1 (calprotectin): a putative nonspecific defense factor at epithelial surfaces. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995; 371A: 201–6.
27. Sohnle P.G., Hunter M.J., Hahn B., Chazin W.J. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J. Infect. Dis.* 2000; 182(4): 1272–5.
28. Sohnle P.G., Hahn B.L., Karmarkar R. Effect of metals on *Candida albicans* growth in the presence of chemical chelators and human abscess fluid. *J. Lab. Clin. Med.* 2001; 137(4): 284–9.
29. Satoru Yui, Yuichi Nakatani, Hunter M.J. et al. Implication of extracellular zinc exclusion by recombinant human calprotectin (MRP8 and MRP14) from target cells in its apoptosis-inducing activity. *Mediators Inflamm.* 2002; 11(3): 165–72.
30. Ghavami S., Kerkhoff C., Los M. et al. Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J. Leuk. Biol.* 2004; 76(1): 169–75.
31. Satoru Yui, Masaaki Mikami, Kazusa Tsurumaki, Masatoshi Yamazaki. Growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of calprotectin derived from inflammatory exudate cells on normal fibroblasts: regulation by metal ions. *J. Leuk. Biol.* 1997; 61(1): 50–7.
32. Zali H., Marashi S.A., Rezaei-Tavirani M. et al. On the mechanism of apoptosis-inducing activity of human calprotectin: zinc sequestration, induction of a signaling pathway, or something else? *Med. Hypoth.* 2007; 68(5): 1012–5.
33. Brun J.G., Ulvestad E., Fagerhol M.K., Jonsson R. Effects of human calprotectin (L1) on in vitro immunoglobulin synthesis. *Scand. J. Immunol.* 1994; 40(6): 675–80.
34. Muller F., Froland S.S., Aukrust P. et al. Elevated serum calprotectin levels in HIV-infected patients: the calprotectin response during ZDV treatment is associated with clinical events. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 1994; 7(9): 931–9.
35. Leach S.T., Yang Z., Messina I. et al. Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2007; 42(11): 1321–31.
36. Jung S.Y., Park Y.B., Ha Y.J. et al. Serum calprotectin as a marker for disease activity and severity in adult-onset Still's disease. *J. Rheumatol.* 2010; 37(5): 1029–34.
37. Dale I. Plasma levels of the calcium-binding L1 leukocyte protein: standardization of blood collection and evaluation of reference intervals in healthy controls. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1990; 50(8): 837–41.
38. Cuida M., Brun J.G., Tynning T., Jonsson R. Calprotectin levels in oral fluids: the importance of collection site. *Eur. J. Oral Sci.* 1995; 103(1): 8–10.
39. Dunlop O., Bruun J.N., Myrvang B., Fagerhol M.K. Calprotectin in cerebrospinal fluid of the HIV infected: a diagnostic marker of opportunistic central nervous system infection? *Scand. J. Infect. Dis.* 1991; 23(6): 687–9.
40. Berntzen H.B., Olmez U., Fagerhol M.K., Munthe E. The leucocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand. J. Rheumatol.* 1991; 20(2): 74–82.
41. Leach S.T., Yang Z., Messina I. et al. Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 2007; 42(11): 1321–31.
42. Reyes L., Alvarez S., Allam A. et al. Complicated urinary tract infection is associated with uroepithelial expression of proinflammatory protein S100A8. *Infect. Immun.* 2009; 77(10): 4265–74.
43. van Zoelen M.A., Vogl T., Foell D., Van Veen S.Q. Expression and role of myeloid-related protein-14 in clinical and experimental sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2009; 180(11): 1098–106.
44. Roseth A.G., Fagerhol M.K., Aadland E., Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand. J. Gastroenterol.* 1992; 27: 793–8.
45. Roseth A.G., Schmidt P.N., Fagerhol M.K. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 1999; 34: 50–4.
46. Roseth A.G., Aadland E., Jahnsen J., Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58(2): 176–80.
47. Tibble J., Teahon K., Thjodleifsson B. et al. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47: 506–13.
48. Summerton C.B., Longlands M.G., Wiener K., Shreeve D.R. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002; 14(8): 823–5.
49. Costa F., Mumolo M.G., Bellini M. et al. Role of faecal calprotectin as non-invasive marker of intestinal inflammation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2003; 37: 468–72.
50. Berni Canani R., Rapacciuolo L., Romano M.T. et al. Diagnostic value of faecal calprotectin in paediatric gastroenterology clinical practice. *Ann. Clin. Biochem.* 2004; 41(Pt. 3): 230–2.
51. Summerton C.B., Longlands M.G., Wiener K., Shreeve D.R. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2002; 14(8): 823–5.
52. Husebye E., Ton H., Johne B. Biological variability of fecal calprotectin in patients referred for colonoscopy without colonic inflammation or neoplasm. *Am. J. Gastroenterol.* 2001; 96(9): 2683–7.
53. Sudan D., Vargas L., Sun Y., Bok L. et al. Calprotectin: a novel noninvasive marker for intestinal allograft monitoring. *Ann. Surg.* 2007; 246(2): 311–5.

