

УДК 616.155.3-008.13+616.155.3

*Т. М. ДОРОШЕНКО¹, С. Т. АКАЛОВИЧ¹, В. А. БАКЕРОВА¹, Е. Н. АВТОНОМОВА²,
Т. В. ШМАН², Ю. Е. МАРЕЙКО², А. С. НЕВМЕРЖИЦКАЯ², Н. В. МИНАКОВСКАЯ²,
М. В. БЕЛЕВЦЕВ², О. В. АЛЕЙНИКОВА², Н. Н. ВОЙТЕНОК³*

**РАСТВОРИМЫЙ РЕЦЕПТОР ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ПЕРВОГО ТИПА
КАК ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ МАРКЕР РАЗВИТИЯ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ
«ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ПЕРЕСАДКИ
ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

¹*Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий,
Минск, Беларусь,*

²*Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии,
Минск, Беларусь,*

³*Фонд развития молекулярной гематологии и иммунологии, Москва, Россия*

(Поступила в редакцию 18.12.2013)

Введение. Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) в настоящее время – один из наиболее перспективных методов лечения множества онкологических и гематологических заболеваний (апластическая анемия, острый миелолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, хронический миелолейкоз и др.). Ежегодно в мире выполняется около 50 тыс. ТГСК, причем количество операций постоянно увеличивается [1]. Реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) является одним из наиболее тяжелых осложнений аллогенной ТГСК и продолжает оставаться одной из главных причин смертности в посттрансплантационном периоде [2]. Выделяют острую РТПХ (оРТПХ), которая развивается до 100-го дня после трансплантации, и хроническую РТПХ (после 100-го дня). В развитии оРТПХ можно выделить три последовательные фазы: 1) активацию антиген-презентирующих клеток; 2) активацию, пролиферацию, дифференцировку и миграцию Т-клеток донора; 3) поражение органов-мишеней [3].

Острая РТПХ развивается примерно у половины пациентов, получающих терапию аллогенной ТГСК, и, учитывая, что в ближайшей перспективе прогнозируют удвоение количества проводимых ежегодно трансплантаций от неродственных доноров, количество пациентов с оРТПХ значительно увеличится [1]. Диагностика оРТПХ базируется на клинических критериях, которые могут подтверждаться биопсией одного из трех органов-мишеней РТПХ (кожа, желудочно-кишечный тракт и печень). Использование для диагностики оРТПХ биопсии кожи, слизистой прямой кишки, печени не всегда информативно, особенно в ранний посттрансплантационный период, когда изменения в коже и слизистых связаны с токсическим эффектом химиотерапии и зачастую сопряжены с риском осложнений процедуры.

Известно, что в развитии и поддержании РТПХ участвует каскад цитокинов, включая фактор некроза опухолей альфа (ФНО- α), интерлейкин-10, интерлейкин-2, интерферон- γ [4]. Провоспалительный цитокин ФНО- α , основной медиатор апоптоза, воспаления и иммунного ответа, вовлекается на трех стадиях развития оРТПХ, начиная с повышения уровня экспрессии антигенов главного комплекса гистосовместимости и минорных антигенов клетками реципиента, что усиливает их распознавание зрелыми Т-клетками донора, и заканчивая индукцией синтеза хемокинов, которые привлекают лейкоциты в органы-мишени РТПХ [4]. Сам выделяющийся фактор быстро сорбируется на клетках и тканях. Вместе с тем участие ФНО- α в патологии легко можно определить благодаря тому, что его связывание со специфическими рецепторами, в основном с рецептором

ФНО- α первого типа (ФНОР1, р55), приводит к их отщеплению с поверхности клеток и переходу в растворимую форму [5]. Растворимый ФНОР1 (рФНОР1) циркулирует в крови не менее суток и является стабильным маркером системных и локальных реакций, опосредованных ФНО- α [5]. У пациентов после аллогенной ТГСК уровень ФНО- α повышается после повреждения тканей, вызванного кондиционированием, и в случае отсутствия осложнений, возвращается к норме в течение недели. У пациентов с развившейся оРТПХ повышенный уровень ФНО- α сохраняется вплоть до клинического проявления осложнения [6]. Результаты клинических испытаний показали эффективность ингибирования ФНО- α как в качестве начальной, так и в качестве основной терапии оРТПХ [7]. Также показано, что у пациентов с оРТПХ уровень рФНОР1 в плазме значительно повышается и коррелирует с содержанием ФНО- α [8].

Интерлейкин-8 (ИЛ-8), белок с молекулярной массой 8,3 кДа, является основным хемотактическим фактором, вызывающим миграцию нейтрофильных лейкоцитов в ткани при воспалении. Он относится к суперсемейству хемокинов, главной функцией которых является обеспечение направленной миграции различных клеток, главным образом лейкоцитов, в организме. Предполагают, что ИЛ-8, будучи мощным хемоаттрактантом, направляет эффекторные клетки в органы-мишени оРТПХ и, таким образом, его повышенный уровень в крови связан с риском развития РТПХ [9].

На сегодняшний день в клинической трансплантологии нет общепринятых серологических маркеров, позволяющих не только диагностировать, но и прогнозировать развитие у реципиентов иммунопатологических осложнений. Поэтому разработка новых подходов к ранней диагностике развития РТПХ с целью своевременной и эффективной терапии данного осложнения остается актуальной.

Цель работы – установить значимость определения уровней рФНОР1 и ИЛ-8 в плазме крови пациентов детского возраста после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток для диагностики острой реакции «трансплантат против хозяина».

Материалы и методы исследования. В работе исследована плазма крови пациентов ($n = 21$), которым проводилась терапия трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток на базе РНПЦ ДОГИ в 2010–2013 гг. У 9 пациентов установлен первичный диагноз ОЛЛ, у 4 – ОМЛ, у 4 – апластическая анемия, у 2 – лимфома, у 1 – врожденная нейтропения тяжелой степени, у 1 – хроническая гранулематозная болезнь. Пациентам проводилась аллогенная ТГСК – как родственная (совместимость по Human Leucocyte Antigens (HLA) локусам), так и не родственная (донор и реципиент либо совместимы по HLA локусам, либо не совместимы). Средний возраст пациентов составил 9,5 (1,8–17,0) года. Обследуемые были разделены на три группы: без развития оРТПХ («ТГСК без оРТПХ», $n = 12$), с развитием оРТПХ I–III стадии («ТГСК, осложненная оРТПХ», $n = 7$) и с инфекционными осложнениями после трансплантации («ТГСК, осложненная инфекцией», $n = 2$) (табл. 1). Группа контроля включала 24 здоровых ребенка (возраст от 8 мес. до 16 лет, средний возраст – 8,1 года). Концентрацию рФНОР1 и ИЛ-8 определяли в плазме детей до начала кондиционирования (0-й день, К0) и в нескольких контрольных точках после ТГСК (14, 21, 30 или 60-й день).

Концентрации рФНОР1 и ИЛ-8 определяли с помощью «сендвич»-ИФА на основе моноклональных антител по методикам, разработанным ранее в лаборатории биотехнологии антител и цитокинов РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий [10, 11]. В качестве стандартов ИФА использовали рекомбинантные рФНОР1 (Invitrogen) и ИЛ-8 (Peprotech). Чувствительность определения рФНОР1 составила 50 пкг/мл, ИЛ-8 – 2 пкг/мл. Статистический анализ результатов проводили с использованием пакета прикладных программ «Статистика 6.0» с помощью U -теста Манна–Уитни для непараметрических данных.

Результаты и их обсуждение. Работа по поиску эффективных серологических маркеров развития оРТПХ активно ведется во многих крупных лабораториях мира. В скрининговых исследованиях предложены панели, состоящие из нескольких серологических маркеров оРТПХ, включая цитокины, их растворимые рецепторы, факторы роста и др. Панель, разработанная N. Paczesny и соавт. [9], включает рФНОР1, растворимый рецептор интерлейкина-2 (ИЛ-2R α), ИЛ-8, фактор роста гепатоцитов (HGF) и позволяет выявлять оРТПХ у 85 % пациентов при отсутствии у них других осложнений. Предложены педиатрическая панель предикторов оРТПХ, включающая рФНОР1,

ИЛ-2Р α , HGF, ИЛ-8, интерлейкин-12 (ИЛ-12p70) и MCP-2 (monocyte chemo-attractant protein-2) [12], а также панель из 6 маркеров, включающая дополнительно специфические маркеры повреждения желудочно-кишечного тракта (regenerating islet-derived 3- α , REG3 α) и кожи (элафин) [13].

Проведенное нами определение уровня рФНОР1 показало, что его концентрация в плазме пациентов группы «ТГСК без оРТПХ» до начала кондиционирования составила $3,8 \pm 1,4$ нг/мл, что выше ($p = 0,002$) уровня контрольной группы ($2,5 \pm 0,8$ нг/мл). У пациентов группы «ТГСК, осложненная оРТПХ» содержание рФНОР1 ($2,9 \pm 1,6$ нг/мл) достоверно не отличалось от аналогичного показателя в контрольной группе.

Т а б л и ц а 1. Характеристика групп пациентов

Показатель	ТГСК без оРТПХ (n = 12)	ТГСК, осложненная оРТПХ (n = 7)	ТГСК, осложненная инфекцией (n = 2)
Возраст, лет (медиана)	8,5 (1,0–17,0)	8,0 (1,8–14)	15 и 17
Пол:			
М	5	4	2
Ж	7	3	–
Первичный диагноз:			
ОЛЛ	4	3	2
ОМЛ	2	2	–
АА	2	2	–
Лимфома	2	–	–
Врожденная нейтропения тяжелой степени	1	–	–
Хроническая гранулематозная болезнь	1	–	–
Тип ТКМ:			
HLA-identical sibling	7	3	–
HLA matched unrelated	3	3	2
HLA mismatched unrelated	2	1	–
Степень оРТПХ:			
I	–	4	1
II	–	1	–
III	–	2	–

П р и м е ч а н и е. ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз, ОМЛ – острый миелобластный лейкоз, АА – апластическая анемия.

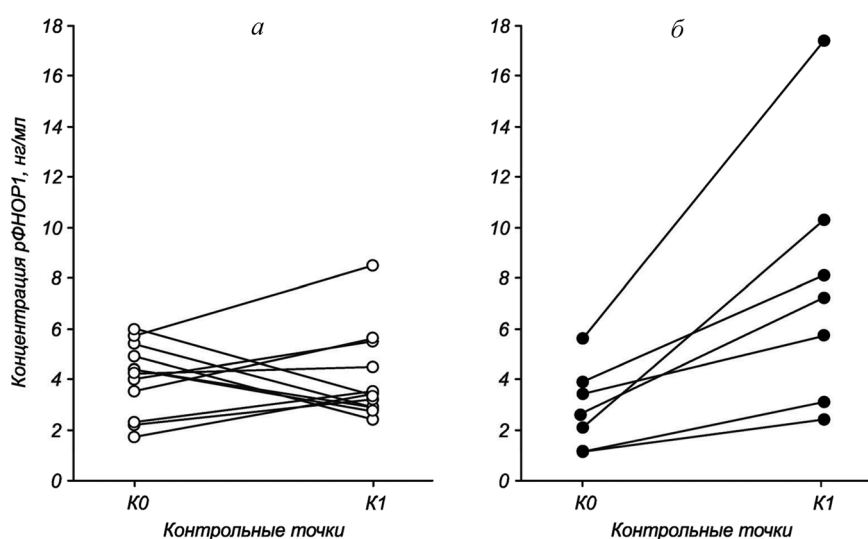


Рис. 1. Концентрация рФНОР1 в плазме крови в контрольных точках после ТГСК в группах пациентов «ТГСК без оРТПХ» (а) и «ТГСК, осложненная оРТПХ» (б)

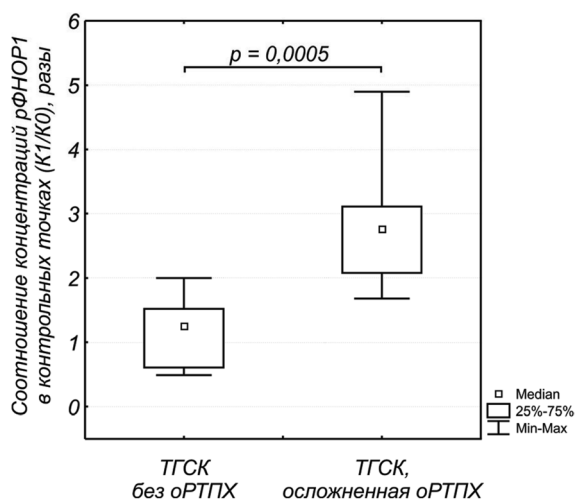


Рис. 2. Изменение уровня рФНОР1 в плазме крови пациентов в контрольной точке К1 по сравнению с точкой К0

В группе пациентов, у которых не развилась оРТПХ в ходе терапии ТГСК, концентрация рФНОР1 существенно не изменялась (рис. 1, а). При развитии оРТПХ на 9–30-е сутки после ТГСК было выявлено значительное увеличение концентрации рФНОР1 в плазме в ближайшей к началу оРТПХ контрольной точке забора крови (К1) по сравнению с К0 у каждого пациента (рис. 1, б). В следующей контрольной точке в группе «ТГСК, осложненная оРТПХ» уровень маркера падал и составил $2,6 \pm 0,6$ нг/мл ($p = 0,0037$).

Статистический анализ данных показал, что при развитии оРТПХ уровень рФНОР1 в точке К1 увеличивается более чем в 2 раза по сравнению с точкой К0 (среднее значение – 2,8 раза, диапазон 1,7–4,9; $p = 0,0005$), тогда как в группе пациентов без оРТПХ концентрация рФНОР1 в ближайшей контрольной точке изменяется в 0,5–2,0 раза (среднее значение – 1,2; $p = 0,13$) (рис. 2).

У пациентов с инфекционными осложнениями концентрация рФНОР1 может увеличиваться в десятки раз при отсутствии оРТПХ и, наоборот, почти не изменяться при развитии оРТПХ на фоне инфекционного осложнения (табл. 2).

Таблица 2. Концентрация рФНОР1 в плазме крови пациентов группы «ТГСК, осложненная инфекцией»

Пациент	оРТПХ	Начало оРТПХ	Инфекционные осложнения	Начало инфекционных осложнений	Концентрация рФНОР1 в плазме в контрольных точках, нг/мл		
					К0	К1	К2
1	Нет	–	Грамотрицательный сепсис	6-е сутки	2,9	113,0	–
2	I стадия	13-е сутки	<i>St. epidermidis</i>	3-и сутки	3,3	3,9	2,8

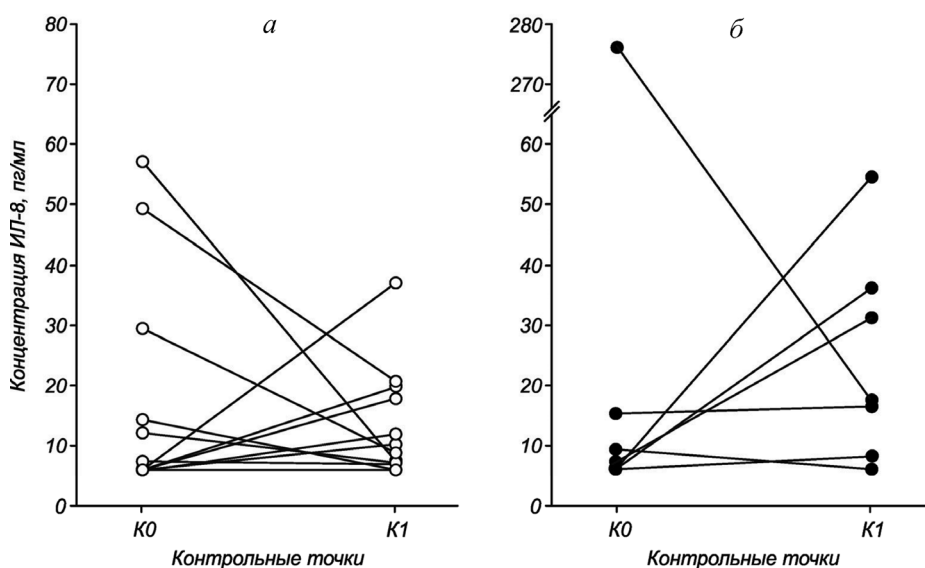


Рис. 3. Концентрация ИЛ-8 в плазме крови в контрольных точках после ТГСК в группах пациентов «ТГСК без оРТПХ» (а) и «ТГСК, осложненная оРТПХ» (б)

Результаты исследований по поиску универсальных, в частности серологических, маркеров РТПХ часто противоречат друг другу, но в ряде крупномасштабных исследований с большим числом включенных в исследование пациентов с ТГСК, была продемонстрирована высокая диагностическая и даже прогностическая ценность измерения рФНОР1.

Полученные нами данные согласуются с данными S. Choi и соавт. [14], которые в исследовании, включавшем 438 пациентов, показали, что повышение концентрации рФНОР1 в 2,5 раза и более на 7-е сутки терапии коррелирует с высокой частотой развития оРТПХ (стадия II–IV) и смертностью, связанной с терапией, а также с данными других авторов, включившими рФНОР1 в состав панелей серологических маркеров оРТПХ [9, 12, 13].

Анализ содержания ИЛ-8 показал, что в плазме пациентов обеих групп до терапии ТГСК концентрация хемокина была сопоставима с показателем в группе здоровых детей ($9,2 \pm 3,7$ пкг/мл). В ходе ответа на терапию у пациентов обеих групп не наблюдалось общей закономерности в изменении уровня ИЛ-8 (рис. 3). Соотношение концентраций хемокина в контрольной точке К1 и точке К0 значимо не отличалось у пациентов обеих групп (рис. 4).

По литературным данным, концентрация ИЛ-8 может являться предиктором развития оРТПХ в составе панели маркеров [12, 13] и позволяет оценить риск развития хронической РТПХ у пациентов после ТГСК [13]. Однако в качестве основного маркера для оценки развития оРТПХ ИЛ-8 не обладает достаточной диагностической ценностью, что согласуется с результатами нашего исследования.

Заключение. Полученные нами данные показали, что увеличение концентрации рФНОР1 более чем в 2 раза в плазме крови детей в раннем периоде после аллогенной ТГСК при отсутствии инфекционных осложнений указывает на развитие оРТПХ. Определение рФНОР1 в плазме крови пациентов с ТГСК можно предложить в качестве дополнительного серологического метода диагностики развития острой реакции «трансплантат против хозяина» к имеющемуся методу, основанному на клинических критериях.

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения РБ (договор 01.18 ГНТП «Новые технологии диагностики и лечения», подпрограмма «Трансплантология и регенеративная медицина»).

Литература

1. Ferrara J. L., Levine J. E., Reddy P. et al. // *Lancet*. 2009. Vol. 373, N 2. P. 1550–1561.
2. Goker H., Haznedaroglu I. C., Chao N. J. // *Exp. Hematol*. 2001. Vol. 29, N 3. P. 259–277.
3. Ferrara J. L., Levy R., Chao N. J. // *Biol. Blood Marrow Transplant*. 1999. Vol. 5, N 6. P. 347–356.
4. Krenger W., Hill G. R., Ferrara J. L. // *Transplantation*. 1997. Vol. 64, N 4. P. 553–558.
5. Redl H., Schlag G., Adolf G. R. et al. // *Infect. Immun*. 1995. Vol. 63, N 1. P. 297–300.
6. Piguet P. F., Grau G. E., Allet B. et al. // *J. Exp. Med*. 1987. Vol. 166, N 5. P. 1280–1289.
7. Couriel D., Saliba R., Hicks K. et al. // *Blood*. 2004. Vol. 104, N 3. P. 649–654.
8. Or R., Kalinkovich A., Nagler A. et al. // *Cytokines Mol. Ther*. 1996. Vol. 2, N 4. P. 243–250.
9. Paczesny S., Krijanovski O. I., Braun T. M. et al. // *Blood*. 2009. Vol. 113, N 2. P. 273–279.
10. Акалович С. Т., Нашкевич Н. Н., Кудин А. П. и др. // *Мед. иммунология*. 2005. Т. 7, № 5–6. С. 575–578.
11. Shichkin V. P., Lon A. D., Yuginova L. G. et al. // *J. Immunotoxicol*. 2009. Vol. 6, N 4. P. 235–242.
12. Berger M., Signorino E., Muraro M. et al. // *Bone Marrow Transplant*. 2013. Vol. 48, N 9. P. 1230–1236.
13. Levine J. E., Logan B. R., Wu J. et al. // *Blood*. 2012. Vol. 119, N 16. P. 3854–3860.
14. Choi S. W., Kitko C. L., Braun T. et al. // *Blood*. 2008. Vol. 112, N 4. P. 1539–1542.

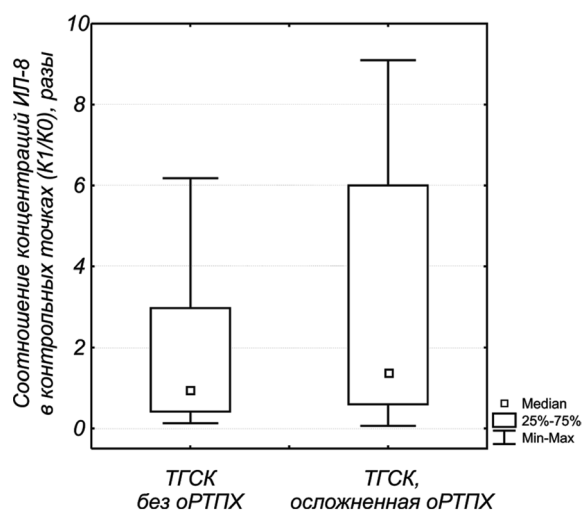


Рис. 4. Изменение уровня ИЛ-8 в плазме крови пациентов в контрольной точке К1 по сравнению с точкой К0

*T. M. DOROSHENKO, S. T. AKALOVICH, V. A. BAKERAVA, E. N. AVTONOMOVA, T. V. SHMAN,
Y. E. MAREIKA, A. S. NEVMERZHITSKAYA, N. V. MINAKOVSKAYA, M. V. BELEVTSSEV,
O. V. ALENIKOVA, N. N. VOITENOK*

**SOLUBLE TUMOR NECROSIS FACTOR RECEPTOR-1 AS A DIAGNOSTIC MARKER
OF THE ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE IN CHILDREN AFTER
THE HEMOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION**

Summary

We investigated a diagnostic value of plasma levels of soluble tumor necrosis factor receptor-1 (sTNFR1) and interleukin-8 (IL-8) in children after the hemopoietic stem cell transplantation as biomarkers for acute graft-versus-host disease (GVHD). The results showed that the level IL-8 had no diagnostic value for acute GVHD. We identified that the plasma level of sTNFR1 in patients with acute GVHD increased more than twice as compared to the level before conditioning ($p = 0.0005$), while in patients without GVHD the level of sTNFR1 did not change significantly. The definition of sTNFR1 can be used for the clinical management of patients undergoing the hemopoietic stem cell transplantation to confirm the diagnosis of acute GVHD.