

**МЕДИЦИНА****MEDICINE**

УДК 57.083.324:616.155

<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2025-69-1-48-56>

Поступило в редакцию 24.10.2024

Received 24.10.2024

**Е. А. Примакова, С. И. Кривенко, А. А. Сыманович, Е. Г. Юркина, Е. А. Назарова,  
Е. А. Янушевская, Н. И. Дедюля, И. А. Романова, А. Ю. Старцева, Н. Ф. Миланович,  
А. Л. Усс, академик О. О. Руммо**

*Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии,  
Минск, Республика Беларусь  
(ул. Семашко, 8, 220045, Минск, Республика Беларусь)*

**ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА ЛИМФОЦИТОВ И ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ  
ПЛАЗМЫ РЕЦИПИЕНТОВ АЛЛОГЕННЫХ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КАК ФАКТОРЫ РИСКА РАЗВИТИЯ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ  
«ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА»**

**Аннотация.** Показано, что для идентификации пациентов, входящих в группу риска по развитию иммунологических осложнений после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоГСК), целесообразно проводить количественную оценку пролиферативной активности лимфоцитов реципиентов аллоГСК в спланированных экспериментальных условиях в день трансплантации. Высокий индекс стимуляции лимфоцитов донора и реципиента ( $>11,55$ ) является неблагоприятным фактором с точки зрения развития реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) в раннем посттрансплантационном периоде. В ходе работы было установлено, что исследование цитокинового профиля плазмы крови реципиентов аллоГСК в раннем посттрансплантационном периоде может быть использовано в качестве дополнительного метода диагностики РТПХ. Уровни интерлейкинов ИЛ-8 и ИЛ-21 в плазме крови реципиентов аллоГСК могут выступать потенциальными биомаркерами острой РТПХ.

**Ключевые слова:** аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, острая реакция «трансплантат против хозяина», цитокины плазмы, индекс стимуляции лимфоцитов, факторы риска

**Для цитирования.** Функциональные свойства лимфоцитов и цитокиновый профиль плазмы реципиентов аллогенных гемопоэтических стволовых клеток как факторы риска развития острой реакции «трансплантат против хозяина» / Е. А. Примакова, С. И. Кривенко, А. А. Сыманович [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2025. – Т. 69, № 1. – С. 48–56. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2025-69-1-48-56>

**Evgeniya A. Prymakova, Svetlana I. Krivenko, Alla A. Symanovich, Ekaterina G. Yurkina, Ekaterina A. Nazarova,  
Ekaterina A. Yanushevskaya, Natalya I. Dedyulya, Iryna A. Romanova, Hanna Yu. Startsva, Natalya F. Milanovich,  
Anatoly L. Uss, Academician Oleg O. Rummo**

*Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus  
(8, Semashko Str., 220045, Minsk, Republic of Belarus)*

**FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF LYMPHOCYTES AND PLASMA CYTOKINE PROFILE  
OF ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL RECIPIENTS AS RISK FACTORS  
FOR THE DEVELOPMENT OF ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE**

**Abstract.** It has been shown that in order to identify patients with high risk for developing immunological complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (alloHSCT), it is advisable to measure quantitatively the proliferative activity of lymphocytes in alloHSCT recipients on the day of transplantation. A high donor and recipient lymphocyte stimulation index ( $>11.55$ ) is an unfavorable factor in terms of development of a graft-versus-host disease (GVHD) in the early post-transplant period. In the course of the work, it was found that the study of the cytokine profile of blood plasma of alloHSC recipients in the early posttransplant period can be used as an additional method for diagnosing GVHD. The levels of IL-8 and IL-21 in the blood plasma of alloHSC recipients can act as potential biomarkers of acute GVHD.

**Keywords:** allogeneic hematopoietic stem cell transplantation, acute graft-versus-host disease, plasma cytokines, lymphocyte stimulation index, risk factors

**For citation.** Prymakova E. A., Krivenko S. I., Symanovich A. A., Yurkina E. G., Nazarova E. A., Yanushevskaya E. A., Dedyulya N. I., Romanova I. A., Startava N. Yu., Milanovich N. F., Uss A. L., Rummo O. O. Functional characteristics of lymphocytes and plasma cytokine profile of allogeneic hematopoietic stem cell recipients as risk factors for the development of acute graft-versus-host disease. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2025, vol. 69, no. 1, pp. 48–56 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2025-69-1-48-56>

**Введение.** Несмотря на появление большого числа новых эффективных препаратов для лечения гемобластозов, трансплантация аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК) остается единственным методом лечения для многих пациентов с онкогематологическими заболеваниями. Однако аллоТГСК связана с развитием тяжелых осложнений, одно из ведущих мест среди которых занимает реакция «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [1].

РТПХ, особенно ее резистентная форма, остается основной причиной смерти реципиентов после аллоТГСК [2; 3]. Около 50 % пациентов с резистентными к лечению формами РТПХ погибают, как правило, вследствие ассоциированных с этим процессом инфекций [4–6].

Острая форма РТПХ (ОРТПХ) обусловлена активацией системы адаптивного иммунитета и специфическим распознаванием Т-клетками донора антигенов реципиента, в результате которого активированные донорские Т-лимфоциты атакуют ткани реципиента. Иммуный ответ при ОРТПХ возникает на антигены реципиента, аллогенные для донора, и обусловлен естественными физиологическими причинами. Во-первых, Т-лимфоциты донора не проходили отбор на неспособность распознавать уникальные антигены реципиента (отсутствие центральной толерантности), а во-вторых, предтрансплантационная химио- и/или радиотерапия вызывает массивное повреждение тканей, что приводит к повышенному уровню экспрессии провоспалительных цитокинов и системной активации АПК, которые предоставляют аллореактивным Т-клеткам необходимый костимуляторный сигнал (срыв периферической толерантности). Сочетание этих двух факторов приводит к запуску острой формы РТПХ [7].

Одним из основных ограничений в исследовании и терапии РТПХ является то, что зачастую диагноз и прогноз почти полностью зависят от наличия клинических симптомов. В настоящее время не существует валидированных лабораторных тестов для прогнозирования риска развития ОРТПХ. Отчасти это связано с тем, что РТПХ – это патологическое состояние, затрагивающее многие системы организма.

В последнее время исследователями ведется поиск наиболее информативных и значимых биомаркеров РТПХ, которые бы позволили идентифицировать пациентов группы высокого риска. Секреция большого количества цитокинов, вызывающая активацию аллореактивных Т-лимфоцитов в ранние сроки после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), является важным этапом в патогенезе ОРТПХ. По этой причине изучение профиля цитокинов (особенно при неродственной ТГСК) могло бы применяться для прогнозирования возникновения ОРТПХ.

РТПХ может возникать даже при совпадении донора и реципиента по 8/8 или 10/10 аллелям [8]. Поскольку ОРТПХ при HLA-идентичных трансплантациях вызывается исключительно ответом на минорные антигены, определение несовпадений по ним является актуальной задачей. Хотя количество клонов наивных Т-лимфоцитов, специфичных к каждому конкретному минорному антигену, невелико, быстрая экспансия клеток, распознавших свой антиген, вызывает клинические проявления ОРТПХ. Кроме того, возникает синергия иммунного ответа за счет того, что донор и реципиент различаются сразу по многим минорным антигенам.

Существующие на сегодняшний день технологии высокопроизводительного секвенирования позволяют относительно быстро получить информацию о всех генетических различиях между донором и реципиентом. Однако на данный момент невозможно достоверно предсказать, какие из несинонимичных полиморфизмов могут приводить к потенциально иммуногенным изменениям в иммунопептиде. Предварительная оценка функциональных свойств лимфоцитов донора и реципиента в смешанной культуре до аллоТГСК может позволить определить тех пациентов, у которых высока вероятность развития ОРТПХ в раннем посттрансплантационном периоде (в том числе за счет несовпадения по минорным антигенам гистосовместимости).

Так как решающую роль в развитии РТПХ играют цитотоксические лимфоциты донора (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-лимфоциты) в присутствии Т-хелперов (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>-лимфоциты), целесообразно использовать пролиферативный тест в смешанной культуре лимфоцитов в качестве метода определения функциональных свойств Т-лимфоцитов после аллогенной ТГСК.

Количественная оценка пролиферативной активности лимфоцитов реципиента и донора в смоделированных экспериментальных условиях позволяет определить степень их реактивности в посттрансплантационном периоде. Высокая пролиферация в смешанной культуре лимфоцитов пары донор/реципиент может являться следствием различий по антигенам гистосовместимости I и II класса (в том числе минорных).

Данная гипотеза послужила основанием для исследования клеточной пролиферации в смешанной культуре лимфоцитов для выявления реципиентов аллоГСК с высоким риском развития оРТПХ в раннем посттрансплантационном периоде.

Цель работы – на основании оценки функциональных свойств лимфоцитов пар донор–реципиент в смешанной культуре разработать способ прогнозирования риска развития острой РТПХ, а также определить потенциальные биомаркеры оРТПХ на ранних этапах после трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

**Материалы и методы исследования.** Материалом исследования послужила периферическая кровь реципиентов аллоГСК ( $n = 10$ ) и их доноров ( $n = 10$ ) в день трансплантации, а также плазма крови реципиентов аллоГСК без проявлений РТПХ ( $n = 21$ ) и с клиническими проявлениями РТПХ ( $n = 19$ ) в раннем посттрансплантационном периоде.

*Выделение и культивирование лимфоцитов периферической крови.* Выделение лимфоцитов периферической крови проводили по общепринятой методике: 5–10 мл периферической крови смешивали с равным объемом стерильного PBS и наслаивали на градиент плотности Ficoll-Paque ( $\rho = 1,077$ ) в соотношении 3 : 1. Центрифугировали 30 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре. Кольцо мононуклеаров переносили в пробирку объемом 15 мл, содержащую стерильный фосфатный буфер. Мононуклеарные клетки отмывали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин при комнатной температуре. Клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл полной среды RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 1 % антибиотика и 1 % L-глутамин. Подсчет клеток производили по стандартной методике с уксусной кислотой, подкрашенной метиленовым синим. Оценку жизнеспособности клеток проводили по стандартной методике по исключению трипанового синего. Клеточную суспензию помещали в стерильный культуральный флакон для суспензионных культур с газопроницаемой крышкой. Флакон с культурой помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % влажность).

*Метод оценки клеточной пролиферации в смешанной культуре лимфоцитов.* Выбранный метод является разновидностью иммуноферментного анализа и основан на включении 5-бромо-2-дезоксинуридина (BrdU) – функционального аналога тимидина – в ДНК пролиферирующих клеток. После включения в ДНК BrdU детектируется по образованию окрашенного продукта в результате иммуноферментной реакции. Результат теста оценивают по оптической плотности, измеренной при длине волны, равной 450 нм.

*Этапы пролиферативного теста.* Лимфоциты реципиента и донора ( $(100–200)10^3$  на лунку) культивировали в отсутствие и в присутствии митогена (ФГА) в 96-луночном планшете в CO<sub>2</sub>-инкубаторе в течение 1–5 дней. Все эксперименты ставились в 2–4 повторах. Далее к клеткам добавляли реагент BrdU из расчета 10 мкмоль на 100 мкл культуральной среды и реинкубировали планшет 2–24 ч. Для суспензионных культур – планшет центрифугировали при 300g 10 мин и удаляли среду пипетированием. Планшет высушивали при 60 °C 1 ч. В каждую лунку добавляли по 200 мкл реагента FixDenat для фиксации клеток и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. После инкубации тщательно удаляли FixDenat и добавляли по 100 мкл на лунку рабочего раствора anti-BrdU-POD (избирательно связывается с BrdU с образованием иммунных комплексов). Инкубировали 90 мин при комнатной температуре. Удаляли конъюгат антител пипетированием и трижды промывали лунки 200–300 мкл промывочного буфера. Добавляли 100 мкл субстрата (ТМВ) в каждую лунку планшета и инкубировали в темноте при комнатной температуре 5–30 мин до появления специфического окрашивания (образования продукта ферментативной реакции). В каждую лунку закапывали по 25 мкл стоп-реагента (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) и измеряли оптическую плотность, предварительно встряхнув планшет 1 мин на шейкере, при длине волны, равной 450 нм.

*Методика определения уровня цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-17A, ИЛ-21 в плазме крови.* Определение уровня цитокинов проводили методом мультиплексного анализа MILLIPLEX® MAP на анализаторе Luminex® 200TM (США) с использованием набора Human

High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel (Merk, Германия). Анализ результатов измерения проводился с помощью программного обеспечения Luminex® xPONENT®. Методика включала в себя следующие этапы: добавляли 200 мкл аналитического буфера в каждую лунку 96-луночного планшета. Планшет накрывали герметичной пленкой и тщательно перемешивали содержимое на планшетном шейкере в течение 10 мин при комнатной температуре. После удаления буфера в соответствующие лунки добавляли по 25 мкл каждого стандарта и контроля. Аналитический буфер использовался в качестве стандарта 0. Добавляли по 25 мкл аналитического буфера в каждую лунку, предназначенную для образцов, затем по 25 мкл соответствующего матричного раствора в лунки, содержащие стандарты и контроли, и по 12,5 мкл образцов в соответствующие лунки 96-луночного планшета с последующим добавлением к каждому образцу по 12,5 мкл матричной среды. Вносили по 25 мкл *mix*-частиц в каждую лунку планшета. Планшет накрывали герметичной пленкой и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Осторожно удаляли содержимое лунок, после чего следовала трехкратная промывка планшета буфером. По 50 мкл антител вносили в каждую лунку. Планшет накрывали фольгой и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и постоянном помешивании без последующей аспирации. Затем добавляли 50 мкл Streptavidin-Phycoerythrin в каждую лунку, содержащую специфические антитела. Планшет накрывали фольгой и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Осторожно удаляли содержимое лунок, после чего следовала трехкратная промывка планшета буфером. После добавления 150 мкл Sheath Fluid во все лунки 96-луночного планшета содержимое перемешивали в течение 5 мин на планшетном шейкере. Помещали планшет в Luminex 200TM для проведения мультиплексного анализа. Определяли MFI и строили стандартную кривую, с помощью которой производился расчет концентрации цитокинов.

Статистическую обработку результатов исследования выполняли с помощью программы Microsoft Excel 2010 и пакета прикладных программ Statistica (Version 6.0, StatSoft Inc.) для медико-биологических исследований. Числовые значения представляли в виде медианы [минимум; максимум]. Определение диагностической значимости проводили с использованием ROC-анализа в программе MedCalc v. 20.218 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Бельгия). В качестве оптимального порога отсечения (cut-off) выбиралось значение, обладающее наибольшим показателем чувствительности и специфичности. В качестве меры диагностической значимости развития РТПХ использовали показатель площади под ROC-кривой – AUC. Различия считали достоверными при значении  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** *Оценка функциональных свойств лимфоцитов пар донор–реципиент в смешанной культуре лимфоцитов.* Смешанные культуры лимфоцитов, выделенных из периферической крови реципиентов аллоГСК и их доноров в день трансплантации ГСК ( $n = 10$ ), культивировались в течение 4 суток. В качестве митогена использовали ФГА, который вызывает митотическое деление преимущественно Т-лимфоцитов, индуцируя переход клеток из стадии G2 в митоз. На 4-е сутки в культуру добавляли BrdU.

Через 24 ч проводили оценку результатов теста, которые выражали в виде индекса стимуляции (отношение уровня (оптическая плотность) включения метки в культуре с ФГА к уровню включения метки клетками, культивировавшимися без ФГА) с учетом интенсивности пролиферации клеток в контрольных лунках (культуральная среда с ФГА и без ФГА). Формула для расчета индекса стимуляции (ИС) представлена ниже:

$$ИС = \frac{OD(ФГА) - OD_{фон}(ФГА)}{OD(без ФГА) - OD_{фон}(без ФГА)},$$

где  $OD(ФГА)$  – оптическая плотность в культуре с добавлением ФГА;  $OD(без ФГА)$  – оптическая плотность в культуре без добавления ФГА;  $OD_{фон}(ФГА)$  – оптическая плотность культуральной среды с добавлением ФГА;  $OD_{фон}(без ФГА)$  – оптическая плотность культуральной среды без добавления ФГА.

При анализе данных, полученных при проведении пролиферативного теста, было установлено, что у 7 из 10 реципиентов индекс стимуляции был равен 1, что свидетельствовало об эффективности проведения режима кондиционирования и отсутствия у этих пациентов функционально

активных Т-лимфоцитов. У 3 реципиентов аллоГСК показатели индекса стимуляции равнялись или превышали 1,5 (табл. 1). Стоит отметить тот факт, что именно у этих реципиентов впоследствии развилась более тяжелая оРТПХ в раннем посттрансплантационном периоде (до 30 дней) с преимущественным поражением кожи.

Таблица 1. Индексы стимуляции лимфоцитов донора и реципиента в смешанной культуре *in vitro*

Table 1. Stimulation indices of donor and recipient lymphocytes in a mixed culture *in vitro*

Реципиент	Донор	Донор + Реципиент	оРТПХ
1,61	22,48	151,69	да
1,5	25,6	30,23	да
1,65	33,94	51,37	да
1	19,67	8,26	да
1	64,0	171,0	да
1	7,38	4,7	нет
1	9,2	11,55	нет
1	3,11	6,48	нет
1	10,02	40,39	да
1	13,5	13,94	да

Индекс стимуляции лимфоцитов доноров ( $n = 10$ ) варьировал в широких пределах и составил 16,59 [3,11; 64]. Данный показатель был значительно ниже (от 3,11 до 9,2,  $n = 3$ ) у тех доноров, чьи реципиенты на момент выписки не имели признаков оРТПХ, по сравнению с аналогичным показателем в группе реципиентов, у которых впоследствии развилась оРТПХ (от 10 до 64,  $n = 7$ ).

В смешанных культурах лимфоцитов донора и реципиента ( $n = 10$ ) индекс стимуляции составил 22,1 [4,7; 171], достигая наибольших значений (от 50 до 171) в культурах клеток реципиентов с ранней и более тяжелой оРТПХ ( $n = 3$ ).

Для определения диагностической значимости индекса стимуляции в смешанной культуре лимфоцитов донора и реципиента была построена ROC-кривая с определением AUC и оптимального порога отсечения (cut-off) (рис. 1). Для индекса стимуляции донор/реципиент оптимальным порогом отсечения было значение 11,55. Чувствительность и специфичность для cut-off составили 85,7 % (95 % ДИ 42,1–99,6 %) и 100 % (95 % ДИ 29,2–100,0 %) соответственно. Площадь под кривой для данного показателя составила 0,952 (95 % ДИ 0,622–1,000), стандартная ошибка оценки 0,0673 при уровне статистической значимости  $p < 0,0001$ .

В табл. 2 приведены пять наиболее значимых с точки зрения диагностической ценности порогов отсечения для индекса стимуляции донор/реципиент.

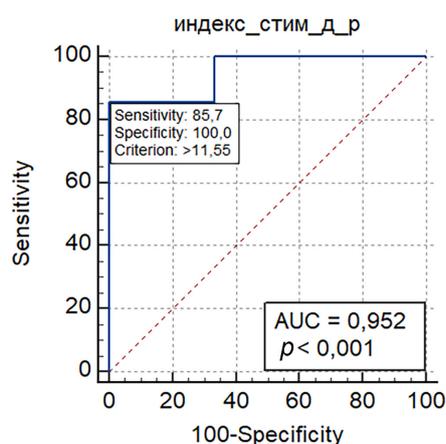


Рис. 1. ROC-кривая индекса стимуляции донор/реципиент

Fig. 1. ROC curve of donor/recipient stimulation index

Таким образом, индекс стимуляции донор/реципиент  $>11,55$  может выступать дополнительным фактором риска развития оРТПХ у реципиентов аллоГСК в раннем посттрансплантационном периоде.

*Оценка содержания цитокинов ФНО- $\alpha$ , ИЛ-10, ИЛ-17А, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8, ИЛ-21 в плазме крови реципиентов аллоГСК.* Основываясь на литературных данных о роли цитокинов в патофизиологии РТПХ, нами была выбрана следующая панель цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-10, ИЛ-17А, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-8, ИЛ-21). Уровень данных цитокинов анализировали в плазме крови реципиентов аллоГСК, а также у здоровых доноров. В одноцентровое сравнительное проспективное исследование были включены 29 реципиентов аллоГСК, находившихся на лечении в отделении трансплантации костного мозга ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии».

Так как основные иммунологические процессы, ведущие к развитию РТПХ, происходят в течение первых не-

Т а б л и ц а 2. Чувствительность и специфичность для наиболее значимых порогов отсечения индекса стимуляции донор/реципиент, % (95 % ДИ)

T a b l e 2. Sensitivity and specificity for the most significant cutoff thresholds of the donor/recipient stimulation index, % (95 % CI)

Порог отсечения	Чувствительность, %	Специфичность, %
>6,48	100,0 (59,0–100,0)	66,67 (9,4–99,2)
>8,26	85,71 (42,1–99,6)	66,67 (9,4–99,2)
>11,55	85,71 (42,1–99,6)	100,0 (29,2–100,0)
>13,94	71,43 (29,0–96,3)	100,0 (29,2–100,0)
>30,23	57,14 (18,4–90,1)	100,0 (29,2–100,0)

скольких недель после трансплантации, нами были выбраны следующие контрольные точки: день «0» (день трансплантации), 15–30-е сутки после трансплантации (отстройка кроветворения), а также в сроки появления первых клинических симптомов РТПХ.

Проведенный сравнительный анализ концентрации ФНО- $\alpha$  в плазме крови пациентов с РТПХ (13,53 [3,38; 106,15] пг/мл,  $n = 19$ ) и пациентов с отстройкой кроветворения (9,47 [2,38; 26,81] пг/мл,  $n = 21$ ) без клинических проявлений РТПХ показал отсутствие статистически достоверных различий между данными группами ( $p = 0,119$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни).

В ходе исследования также изучали роль ИЛ-10 в развитии РТПХ. ИЛ-10 имеет большое значение в контроле иммунных реакций при системном воспалении. В некоторых работах показана корреляция между концентрацией ИЛ-10 в крови и клиническими проявлениями оРТПХ [9; 10]. Несмотря на противовоспалительную функцию ИЛ-10, большинство исследователей сообщают о взаимосвязи высоких уровней данного цитокина после аллогенной трансплантации ГСК и развития оРТПХ.

Нами не было установлено статистически значимых различий в уровне ИЛ-10 в группе пациентов с РТПХ (17,51 [2,66; 617,04] пг/мл,  $n = 19$ ) и в группе пациентов без проявлений РТПХ (11,1 [0; 96,14] пг/мл,  $n = 21$ ) в период отстройки кроветворения ( $p = 0,38$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни). Вероятно, это обусловлено разнонаправленным действием данного цитокина (как провоспалительным, так и противовоспалительным) в зависимости от микроокружения и состава клеточной популяции, его высвобождающей.

Однако более высокие концентрации ИЛ-10 в плазме крови пациентов с оРТПХ (концентрация варьировала в данной группе от 2,66 до 617,04 пг/мл) по сравнению с аналогичным показателем в группе пациентов без признаков РТПХ (от 0 до 96,14 пг/мл) могут быть отражением острого системного воспаления, что согласуется с большинством литературных данных [11].

Нет единого мнения также и о роли ИЛ-17 в развитии РТПХ. ИЛ-17 ассоциируется с иммунорегуляцией, аутоиммунными заболеваниями, играет роль во взаимодействии с Т-регуляторными клетками. Однако участие ИЛ-17 в патогенезе РТПХ недостаточно изучено.

Так, в публикации D. Dlubek с соавт. исследовалась взаимосвязь между наличием ИЛ-17-продуцирующих клеток в периферической крови пациентов после трансплантации аллоГСК и развитием РТПХ в посттрансплантационном периоде. У всех пациентов в период отстройки кроветворения увеличивалось количество ИЛ-17-продуцирующих клеток по сравнению со здоровыми донорами. Однако у 8 пациентов, имевших клинические проявления оРТПХ, отмечалось снижение количества ИЛ-17-продуцирующих CD4<sup>+</sup>-клеток в периферической крови в динамике, что возможно объясняется их миграцией в очаги воспаления [12].

При анализе уровня ИФН- $\gamma$  у реципиентов с отстройкой кроветворения без признаков РТПХ (10,02 [0; 157,89] пг/мл,  $n = 21$ ) и с проявлениями РТПХ (11,19 [0; 85,76] пг/мл,  $n = 19$ ) не было выявлено статистически значимых различий между данными группами ( $p = 0,94$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни).

Отмечено, что концентрация ИЛ-21 в плазме крови реципиентов с РТПХ (1,25 [0; 15,63] пг/мл,  $n = 19$ ) была достоверно выше ( $p = 0,035$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни) по сравнению с таковой у реципиентов аллоГСК без признаков РТПХ (0,22 [0; 11,07] пг/мл,  $n = 21$ ).

Продукция ИЛ-8 также статистически значимо отличалась ( $p = 0,047$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни) в плазме крови реципиентов аллоГСК с клиническими проявлениями РТПХ (9,5 [1,49; 228,6] пг/мл,  $n = 19$ ) и реципиентов аллоГСК без признаков РТПХ (5,25 [1,74; 112,12] пг/мл,  $n = 21$ ).

Данные результаты во многом согласуются с исследованием М. Ugucioni с соавт., в котором концентрации ИЛ-8 в крови реципиентов аллоГСК прямо коррелировали с развитием оРТПХ [13].

Следует отметить, что в нашем исследовании концентрация ИЛ-8 постепенно увеличивалась от дня трансплантации – 4,09 [1,8; 16,75] пг/мл ( $n = 12$ ) до манифестации РТПХ – 9,52 [1,49; 228,56] пг/мл ( $n = 19$ ). В связи с этим представляется целесообразным оценивать уровень данного цитокина в динамике в раннем посттрансплантационном периоде.

Так как статистически достоверные различия по уровню цитокинов в плазме крови в группах реципиентов с отстройкой кроветворения без проявлений и с проявлениями РТПХ отмечались только для ИЛ-8 ( $p = 0,047$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни) и ИЛ-21 ( $p = 0,035$ ,  $U$ -тест Манна–Уитни), была проведена оценка их диагностической значимости в качестве маркеров развития РТПХ.

Клиническое применение потенциальных биомаркеров развития РТПХ – уровня цитокинов ИЛ-8 и ИЛ-21 в плазме крови реципиентов аллоГСК – обусловлено, во-первых, необходимостью максимально точно идентифицировать пациентов с высоким риском развития РТПХ после ТГСК (порог отсека). Во-вторых, диагностические характеристики биомаркера в виде чувствительности, специфичности, прогностической ценности должны быть достаточно высокими. Поэтому определение диагностической значимости проводили с использованием ROC-анализа.

Для каждого маркера была построена ROC-кривая с определением AUC и оптимального порога отсека (cut-off). Оптимальным порогом отсека считалась концентрация цитокинов, которая обладала наибольшей суммой показателей чувствительности и специфичности в распределении пациентов.

Так, для ИЛ-8 оптимальным порогом отсека был уровень 5,56 пг/мл. Чувствительность и специфичность для cut-off составили 88,9 % (95 % ДИ 65,3–98,6 %) и 57,14 % (95 % ДИ 34,0–78,2 %) соответственно, что можно охарактеризовать как удовлетворительные значения. Площадь под кривой для биомаркера равнялась 0,688 (95 % ДИ 0,520–0,826), стандартная ошибка оценки 0,088 и уровень статистической значимости  $p = 0,034$  (рис. 2, *a*). Полученные данные свидетельствуют о том, что уровень ИЛ-8 в плазме крови после трансплантации аллоГСК можно применять в качестве биомаркера развития РТПХ.

Для ИЛ-21 оптимальным порогом отсека был определен уровень данного цитокина в плазме крови реципиентов аллоГСК 0,218 пг/мл. Чувствительность и специфичность для cut-off составили 83,33 % (95 % ДИ 58,6–96,4 %) и 57,14 % (95 % ДИ 34,0–78,2 %) соответственно. Площадь под ROC-кривой для уровня ИЛ-21 в качестве маркера РТПХ составила 0,726 (95 % ДИ 0,560–0,856) при стандартной ошибке 0,084 и уровне значимости  $p = 0,007$  (рис. 2, *b*). Данные показатели характеризуют хорошее качество предложенной модели.

Таким образом, исследование цитокинового профиля плазмы крови реципиентов аллоГСК в раннем посттрансплантационном периоде может быть использовано в качестве дополнитель-

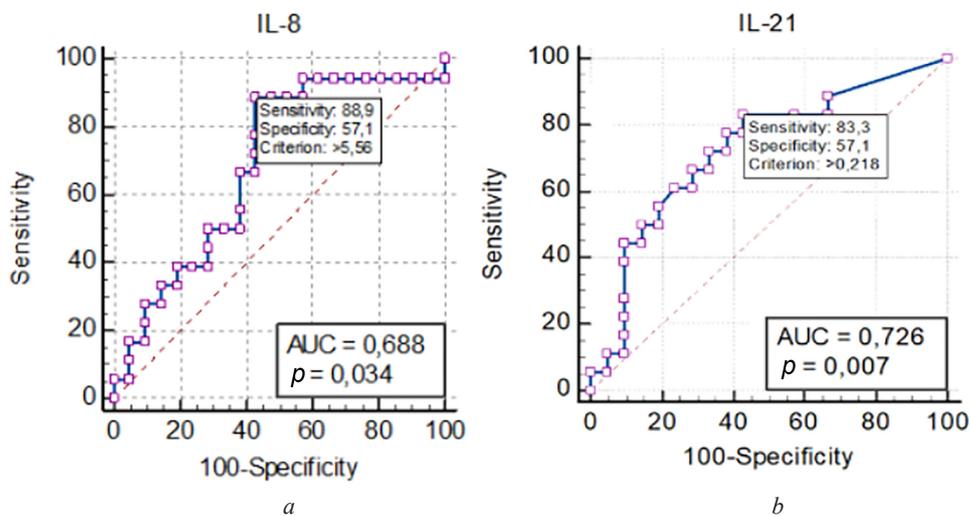


Рис. 2. ROC-кривые уровней ИЛ-8 (*a*) и ИЛ-21 (*b*) в плазме крови реципиентов аллоГСК  
Fig. 2. ROC curves of IL-8 (*a*) and IL-21 (*b*) levels in plasma of alloHSC recipients

ного метода диагностики оРТПХ. Концентрация ИЛ-8 более 5,6 пг/мл и ИЛ-21 более 0,218 пг/мл в раннем посттрансплантационном периоде являются дополнительными факторами риска развития оРТПХ.

### Выводы

1. Количественная оценка пролиферативной активности в смешанной культуре лимфоцитов *in vitro* отражает их иммунологическую реактивность в организме пациента в посттрансплантационном периоде и может быть использована в качестве критерия прогноза риска развития оРТПХ. Показатели индекса стимуляции лимфоцитов донора и реципиента в смешанной культуре выше 11,55 позволяют отнести данных пациентов в группу риска развития иммунологических осложнений после трансплантации аллоГСК.

2. Уровни ИЛ-8 и ИЛ-21 в плазме крови реципиентов аллоГСК могут выступать потенциальными биомаркерами оРТПХ. Концентрация ИЛ-8 более 5,6 пг/мл и ИЛ-21 более 0,218 пг/мл в раннем посттрансплантационном периоде является дополнительным фактором риска развития оРТПХ.

### Список использованных источников

1. Применение мультипотентных мезенхимных стромальных клеток для лечения острой реакции «трансплантат против хозяина» / Л. А. Кузьмина, Н. А. Петинати, В. А. Васильева [и др.] // Терапевтический архив. – 2020. – Т. 92, № 7. – С. 23–30. <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.07.000757>
2. Mesenchymal stromal cells for treatment of acute steroid-refractory graft versus host disease: clinical responses and long-term outcome / F. von Dalowski, M. Kramer, M. Wermke [et al.] // Stem Cells. – 2016. – Vol. 34, N 2. – P. 357–366. <https://doi.org/10.1002/stem.2224>
3. Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management / D. Couriel, H. Caldera, R. Champlin, K. Komanduri // Cancer. – 2004. – Vol. 101, N 9. – P. 1936–1946. <https://doi.org/10.1002/cncr.20613>
4. Poor outcome in steroid-refractory graft-versus-host disease with antithymocyte globulin treatment / S. Arai, J. Margolis, M. Zahurak [et al.] // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2002. – Vol. 8, N 3. – P. 155–160. <https://doi.org/10.1053/bbmt.2002.v8.pm11939605>
5. Graft-versus-host disease treatment: predictors of survival / J. E. Levine, B. Logan, J. Wu [et al.] // Biology of Blood and Marrow Transplantation. – 2010. – Vol. 16, N 12. – P. 1693–1699. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.05.019>
6. Steroid-refractory acute GVHD: predictors and outcomes / J. R. Westin, R. M. Saliba, M. De Lima [et al.] // Advances in Hematology. – 2011. – Vol. 2011. – Art. 601953. <https://doi.org/10.1155/2011/601953>
7. Иммунобиология острой реакции «трансплантат против хозяина» / Г. А. Ефимов, А. С. Вдовин, А. А. Григорьев [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 6. – С. 499–516. <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-499-516>
8. How to improve the search for an unrelated haematopoietic stem cell donor. Faster is better than more! / M. B. Heemskerk, S. M. van Walraven, J. J. Cornelissen [et al.] // Bone Marrow Transplantation. – 2005. – Vol. 35. – P. 645–652. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704865>
9. Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): interleukin 10 and interferon gamma may be critical mediators for the development of autologous GVHD / Y. Miura, C. J. Thoburn, E. C. Bright [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 100, N 7. – P. 2650–2658. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0176>
10. Kinetics of T helper subsets and associated cytokines correlate well with the clinical activity of graft-versus-host disease / S. P. Yeh, Y.-M. Liao, W.-J. Lo [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, N 9. – Art. e44416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044416>
11. Hedrich, C. M. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease / C. M. Hedrich, J. H. Bream // Immunologic Research. – 2010. – Vol. 47. – P. 185–206. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8150-5>
12. Interleukin-17-producing cells increase among CD4+ lymphocytes before overt manifestation of acute graft-versus-host disease / D. Dlubek, E. Turlej, M. Sedzimirska [et al.] // Transplantation Proceedings. – 2010. – Vol. 42, N 8. – P. 3277–3279. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.07.026>
13. Elevated interleukin-8 serum concentrations in beta-thalassemia and graft-versus-host disease / M. Ugucconi, R. Meliconi, D. Nesci [et al.] // Blood. – 1993. – Vol. 81, N 9. – P. 2252–2256. <https://doi.org/10.1182/blood.v81.9.2252.2252>

### References

1. Kuzmina L. A., Petinati N. A., Vasilyeva V. A., Dovydenko M. V., Drovok M. Yu., Davydova Yu. O., Kapranov N. M., Sats N. V., Chabaeva Yu. A., Kulikov S. M., Gaponova T. V., Drize N. I., Parovichnikova E. N., Savchenko V. G. Multipotent mesenchymal stromal cells application for acute graft versus host disease treatment. *Terapevticheskii arkhiv = Therapeutic archive*, 2020, vol. 92, no. 7, pp. 23–30 (in Russian). <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.07.000757>
2. von Dalowski F., Kramer M., Wermke M., Wehner R., Röllig C., Alakel N., Stölzel F., Parmentier S., Sockel K., Krech M., Schmitz M., Platzbecker U., Schetelig J., Bornhäuser M., von Bonin M. Mesenchymal stromal cells for treatment of acute steroid-refractory graft versus host disease: clinical responses and long-term outcome. *Stem Cells*, 2016, vol. 34, no. 2, pp. 357–366. <https://doi.org/10.1002/stem.2224>
3. Couriel D., Caldera H., Champlin R., Komanduri K. Acute graft-versus-host disease: pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Cancer*, 2004, vol. 101, no. 9, pp. 1936–1946. <https://doi.org/10.1002/cncr.20613>

4. Arai S., Margolis J., Zahurak M., Anders V., Vogelsang G. B. Poor outcome in steroid-refractory graft-versus-host disease with antithymocyte globulin treatment. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2002, vol. 8, no. 3, pp. 155–160. <https://doi.org/10.1053/bbmt.2002.v8.pml1939605>

5. Levine J. E., Logan B., Wu J., Alousi A. M., Ho V., Bolaños-Meade J., Weisdorf D. Graft-versus-host disease treatment: predictors of survival. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2010, vol. 16, no. 12, pp. 1693–1699. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.05.019>

6. Westin J. R., Saliba R. M., De Lima M., Alousi A., Hosing C., Qazilbash M. H., Khouri I. F., Shpall E. J., Anderlini P., Rondon G., Andersson B. S., Champlin R., Couriel D. R. Steroid-refractory acute GVHD: predictors and outcomes. *Advances in Hematology*, 2011, vol. 2011, art. 601953. <https://doi.org/10.1155/2011/601953>

7. Efimov G. A., Vdovin A. S., Grigoryev A. A., Filkin S. Yu., Bykova N. A., Savchenko V. G. Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology*, 2015, vol. 17, no. 6, pp. 499–516 (in Russian). <https://doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-499-516>

8. Heemskerk M. B., van Walraven S. M., Cornelissen J. J., Barge R. M. Y., Bredius R. G. M., Egeler R. M., Tj Lie J. L., Révész T., Sintnicolaas K., Wulfraat N. M., Donker A. E., Hoogerbrugge P. M., van Rood J. J., Claas F. H. J., Oudshoorn M. How to improve the search for an unrelated haematopoietic stem cell donor. Faster is better than more! *Bone Marrow Transplant*, 2005, vol. 35, pp. 645–652. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704865>

9. Miura Y., Thoburn C. J., Bright E. C., Chen W., Nakao S., Hess A. D. Cytokine and chemokine profiles in autologous graft-versus-host disease (GVHD): interleukin 10 and interferon gamma may be critical mediators for the development of autologous GVHD. *Blood*, 2002, vol. 100, no. 7, pp. 2650–2658. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-01-0176>

10. Yeh S. P., Liao Y. M., Lo W. J., Lin C. L., Bai L. Y., Lin C. Y., Hsieh C. Y., Chang Y. C., Huang Y. T., Chiu C. F. Kinetics of T helper subsets and associated cytokines correlate well with the clinical activity of graft-versus-host disease. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 9, art. e44416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044416>

11. Hedrich C. M., Bream J. H. Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease. *Immunologic Research*, 2010, vol. 47, pp. 185–206. <https://doi.org/10.1007/s12026-009-8150-5>

12. Dlubek D., Turlej E., Sedzimirska M., Lange J., Lange A. Interleukin-17-producing cells increase among CD4<sup>+</sup> lymphocytes before overt manifestation of acute graft-versus-host disease. *Transplantation Proceedings*, 2010, vol. 42, no. 8, pp. 3277–3279. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2010.07.026>

13. Ugucioni M., Meliconi R., Nesci S., Lucarelli G., Ceska M., Gasbarrini G., Facchini A. Elevated interleukin-8 serum concentrations in beta-thalassemia and graft-versus-host disease. *Blood*, 1993, vol. 81, no. 9, pp. 2252–2256. <https://doi.org/10.1182/blood.v81.9.2252.2252>

## Информация об авторах

Примакова Евгения Алексеевна – врач. E-mail: gane\_sel@mail.ru. ORCID: 0000-0002-3011-2287.

Кривенко Светлана Ивановна – д-р мед. наук, профессор, заместитель директора по научной работе. E-mail: svtl\_kr@tut.by. ORCID: 0000-0002-6813-4465.

Сыманович Алла Александровна – канд. биол. наук, врач. E-mail: aleftyna@tut.by. ORCID: 0000-0003-1521-1620.

Юркина Екатерина Геннадьевна – ст. науч. сотрудник. E-mail: ekatherina999@mail.ru. ORCID: 0000-0002-0966-7456.

Назарова Екатерина Александровна – канд. биол. наук, врач. E-mail: k.nazarova-86@mail.ru. ORCID: 0000-0001-7147-4834.

Янушевская Екатерина Андреевна – врач. E-mail: 9gkbhla@mail.ru. ORCID: 0009-0003-1174-4179.

Дедюля Наталья Ивановна – канд. биол. наук, доцент, заведующий лабораторией. E-mail: nata\_2010@tut.by. ORCID: 0000-0001-9807-2093.

Романова Ирина Александровна – науч. сотрудник. E-mail: romirina1978@gmail.com. ORCID: 0000-0001-6577-9738.

Старцева Анна Юрьевна – заведующий лабораторией. E-mail: 9gkbhla@mail.ru. ORCID: 0009-0004-5040-9768.

Миланович Наталья Феодосьевна – канд. мед. наук, доцент, заведующий отделением. E-mail: nataly.milanovich@gmail.com.

Усс Анатолий Леонидович – д-р мед. наук, профессор, заместитель директора. E-mail: bmtc@mail.ru.

Руммо Олег Олегович – академик, д-р мед. наук, профессор, директор. E-mail: olegrumm@tut.by. ORCID: 0000-0001-7023-4767.

## Information about the authors

Prymakova Evgeniya A. – Doctor. E-mail: gane\_sel@mail.ru. ORCID: 0000-0002-3011-2287.

Krivenko Svetlana I. – D. Sc. (Medicine), Professor, Deputy Director. E-mail: svtl\_kr@tut.by. ORCID: 0000-0002-6813-4465.

Symanovich Alla A. – Ph. D. (Biology), Doctor. E-mail: aleftyna@tut.by. ORCID: 0000-0003-1521-1620.

Yurkina Ekaterina G. – Senior Researcher. E-mail: ekatherina999@mail.ru. ORCID: 0000-0002-0966-7456.

Nazarova Ekaterina A. – Ph. D. (Biology), Doctor. E-mail: k.nazarova-86@mail.ru. ORCID: 0000-0001-7147-4834.

Yanushevskaya Ekaterina A. – Doctor. E-mail: 9gkbhla@mail.ru. ORCID: 0009-0003-1174-4179.

Dedyulya Natalya I. – Ph. D. (Biology), Associate Professor, Head of the Laboratory. E-mail: nata\_2010@tut.by. ORCID: 0000-0001-9807-2093.

Romanova Iryna A. – Researcher. E-mail: romirina1978@gmail.com. ORCID: 0000-0001-6577-9738.

Startsava Hanna Y. – Head of the Laboratory. E-mail: 9gkbhla@mail.ru. ORCID: 0009-0004-5040-9768.

Milanovich Natalya F. – Ph. D. (Medicine), Associate Professor, Head of the Department. E-mail: nataly.milanovich@gmail.com.

Uss Anatoly L. – D. Sc. (Medicine), Professor, Deputy Director. E-mail: bmtc@mail.ru.

Rummo Oleg O. – Academician, D. Sc. (Medicine), Professor, Director. E-mail: olegrumm@tut.by. ORCID: 0000-0001-7023-4767.