

## Исследование субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативных Т-лимфоцитов у пациентов после трансплантации почки

С.В. Зыблева\*, С.Л. Зыблев

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека»,  
246040, Республика Беларусь, Гомель, ул. Ильича, д. 290

\* Контактная информация: Светлана Валерьевна Зыблева, канд. мед. наук, врач-иммунолог, ученый секретарь  
Республиканского научно-практического центра радиационной медицины и экологии человека,  
e-mail: zyb-svetlana@yandex.ru

**Введение.** CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> являются одной из субпопуляций Т-регуляторных лимфоцитов. Согласно данным литературы, обнаружено увеличение содержания графт-инфильтрирующих CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> в тканях ксенотрансплантата сердца экспериментальной модели с длительной выживаемостью трансплантата. Описана эффективность инфузии CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> с целью индуцирования толерантности трансплантата кожи. Показано также, что снижение уровня CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> в периферической крови у пациентов при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток ассоциировалось с развитием реакции трансплантат против хозяина.

**Цель исследования.** Изучить изменения показателей CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативных Т-лимфоцитов в периферической крови у реципиентов почечного трансплантата.

**Материал и методы.** В исследование включены 165 реципиентов, которым выполнена трансплантация почки. Определяли концентрацию в крови креатинина и мочевины перед операцией, на 7-е и 360-е сутки после трансплантации. Содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> лимфоцитов изучали перед операцией, на 3-и, 7-е, 30-е, 90-е, 180-е и 360-е сутки после операции. Ранняя функция трансплантата оценивалась на 7-е сутки после операции. При уровне креатинина ниже 300 мкмоль/л функция считалась первичной. Дисфункция трансплантата считалась установленной при значениях креатинина равных или превышающих 300 мкмоль/л и необходимости в диализе на первой неделе после операции. Удовлетворительная функция трансплантата через год характеризовалась уровнем креатинина в крови ниже 150 мкмоль/л, отсутствием эпизодов отторжения трансплантата и необходимостью в диализе на первом году наблюдения. Сформированы четыре группы реципиентов. Первая группа – пациенты с первичной и удовлетворительной поздней функцией трансплантата. Вторая группа – с первичной функцией и поздней дисфункцией трансплантата. Третья группа – с первичной дисфункцией и поздней удовлетворительной функцией. Четвертая группа – с первичной и поздней дисфункцией трансплантата.

**Результаты.** В первой и второй группах статистически значимых различий по уровню CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> в крови в течение года выявлено не было. Через год отмечено статистически значимое снижение содержания CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> в группе с поздней дисфункцией трансплантата. В третьей и четвертой группах была выявлена похожая тенденция. В четвертой группе (с поздней дисфункцией трансплантата) уровень CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> был статистически значимо ниже только через год наблюдения по сравнению с показателем в третьей группе. Отмечены отрицательные корреляционные связи между показателями CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> и уровнем креатинина и мочевины. Таким образом, высокие значения содержания CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> у реципиентов почечного трансплантата через год ассоциировались с удовлетворительной функцией трансплантата.

**Выводы.** 1. Для стабильной годовой удовлетворительной функции почечного трансплантата характерно повышение уровня в крови CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов. 2. Дисфункция почечного трансплантата в позднем посттрансплантационном периоде характеризуется снижением уровня в крови CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов.

**Ключевые слова:** CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, Т-лимфоциты, дисфункция почечного трансплантата, трансплантация почки

**Конфликт интересов** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов  
**Финансирование** Исследование проводилось без спонсорской поддержки

Зыблева С.В., Зыблев С.Л. Исследование субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативных Т-лимфоцитов у пациентов после трансплантации почки. Трансплантология. 2020;12(1):20–27. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2020-12-1-20-27>

## Research of subpopulation CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T lymphocytes in kidney transplant recipients

S.V. Zybleva\*, S.L. Zyblev

Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology,  
290 Il'ich St., Gomel 246040 Republic of Belarus

\* Correspondence to: Svetlana V. Zybleva, Cand. Med. Sci., Immunologist, Academic Secretary, Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, e-mail: zyb-svetlana@yandex.ru

**Introduction.** CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> cells represent one of the subpopulations of T-regulatory lymphocytes. According to literature reports, an increase in the content of graft-infiltrating CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T cells was detected in the heart xenograft tissues of an experimental model with a long-term graft survival. The efficacy of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> infusion to induce skin graft tolerance was described. Some studies have shown that a decrease in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> content in peripheral blood of patients undergoing to hematopoietic stem cell transplantation was associated with the development of a graft-versus-host reaction.

**Objectives.** To study changes in the values of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T lymphocytes in peripheral blood in kidney transplant recipients.

**Material and methods.** The study included 165 recipients who underwent kidney transplantation. The creatinine and urea concentrations in blood were determined before surgery, on day 7, and day 360 after transplantation. The content of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> lymphocytes was studied before surgery, on the 3rd, 7th, 30th, 90th, 180th and 360th days after surgery. Early graft function was assessed on day 7 after transplantation. The function was defined as a primary one at creatinine levels below 300 μmol/L. The graft dysfunction was defined as creatinine values equal to or greater than 300 μmol/L and the need for dialysis in the first week after surgery. The satisfactory graft function after a year was characterized by the blood creatinine level below 150 μmol/L, absent episodes of graft rejection, and no need for dialysis in the first year of follow-up. There were 4 groups of recipients formed. The first group included patients with the primary graft function and satisfactory late graft function. The second group included patients with the primary function and late graft dysfunction. The third group included patients with the primary dysfunction and late satisfactory function. The fourth group included patients with the primary and late graft dysfunction.

**Results.** In the first and second groups, there were no significant differences in the blood level of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> during the year. After a year, a significant CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> decrease was noted in the group with late graft dysfunction. A similar tendency was revealed in the third and fourth groups. In the fourth group (with late graft dysfunction), the level of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> was significantly lower only after a year of observation compared with the levels in the third group. A negative correlation was noted between the CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> values and the creatinine and urea levels. Thus, high CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> values in kidney transplant recipients after a year were associated with a satisfactory graft function.

**Conclusions.** 1. A stable 1-year satisfactory kidney graft function is characterized by an increase in the blood level of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T lymphocytes. 2. A kidney graft dysfunction in the late post-transplant period is characterized by a decrease in the blood level of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> T lymphocytes.

**Keywords:** CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>, T lymphocytes, kidney graft dysfunction, kidney transplantation

**CONFLICT OF INTERESTS** Authors declare no conflict of interest  
**FINANCING** The study was performed without external funding

Zybleva SV, Zyblev SL. Research of subpopulation CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T lymphocytes in kidney transplant recipients. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2020;12(1):20–27. (In Russ.). <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2020-12-1-20-27>

ДН Т-лимфоциты – даблнегативные CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоциты  
ДФТ – дисфункция почечного трансплантата  
ПФТ – первичная функция почечного трансплантата  
РПТ1 – первая группа реципиентов почечного трансплантата

РПТ2 – вторая группа реципиентов почечного трансплантата  
РПТ3 – третья группа реципиентов почечного трансплантата  
РПТ4 – четвертая группа реципиентов почечного трансплантата  
РТПХ – реакция «трансплантат против хозяина»

### Введение

Регуляторные Т-лимфоциты играют важную роль при различных заболеваниях [1, 2]. Одной

из субпопуляций Т-регуляторных лимфоцитов являются даблнегативные CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоциты (ДН Т-лимфоциты). Данная субпопуляция составляет 1–3% от периферических

T-клеток [3]. ДН T-лимфоциты могут быть вовлечены в системное воспаление и повреждение тканей при аутоиммунных/воспалительных состояниях, включая системную красную волчанку, синдром Шегрена и псориаз [4]. ДН T-лимфоциты обладают способностью подавлять антиген-специфические ауто-, алло- или ксенореактивные CD8<sup>+</sup>T-лимфоциты [3, 5, 6], CD4<sup>+</sup>T-лимфоциты [6–9] или B-лимфоциты [10, 11].

Рядом авторов было обнаружено увеличение количества ДН T-лимфоцитов при алло- и ксенотрансплантации сердца, посттрансплантационный период которых протекал без эпизодов острого отторжения [12]. Адаптивный перенос Ag-активированных ДН T-лимфоцитов, по данным некоторых исследований, может увеличивать выживание алло- или ксенотрансплантатов кожи и сердца [3, 8, 13]. В отличие от аллогенных CD4<sup>+</sup> или CD8<sup>+</sup> T-клеток инфузия аллогенных ДН T-лимфоцитов индуцирует толерантность аллотрансплантата кожи, не вызывая реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) [14]. Ранние исследования показали, что доля и общее количество ДН T-лимфоцитов значительно снижались у пациентов при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, у которых развилась РТПХ, и что соотношение CD8/ДН T-лимфоцитов напрямую коррелировало с тяжестью РТПХ [15]. Также было установлено, что ДН T-лимфоциты вовлечены в противоопухолевый иммунитет [16]. Учитывая вышеизложенное, становится ясно, что роль, которую ДН T-лимфоциты играют при различных заболеваниях, важна и малоизучена.

Механизмы, с помощью которых CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs опосредуют иммунную супрессию, широко изучены [17], а механизмы, с помощью которых ДН T-лимфоциты опосредуют антиген-специфическую супрессию, остаются малоизученными. Предыдущие исследования показали, что ДН T-лимфоциты могут подавлять иммунные ответы посредством прямого цитолиза активированных антиген-специфических T-эффекторных клеток [3, 7, 8, 18, 19]. Также одним из механизмов супрессии иммунного ответа является подавление ДН T-лимфоцитами экспрессии костимулирующих молекул CD80 и CD86 на аллогенных дендритных клетках, индуцированных липополисахаридом [1]. Помимо этого, ДН T-лимфоциты посредством Fas-FasL-взаимодействия способны вызывать гибель антиген-специфических дендритных клеток [1].

В данной статье представлены результаты изучения динамики ДН T-лимфоцитов при раз-

личных вариантах течения посттрансплантационного периода у пациентов после трансплантации почки.

**Цель исследования.** Изучить изменения показателей CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативных T-лимфоцитов в периферической крови у реципиентов почечного трансплантата.

## Материал и методы

Настоящая работа выполнена на базе ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (ГУ «РНПЦ РМиЭЧ») Гомеля.

В исследование были включены 165 реципиентов почечного аллотрансплантата с терминальной стадией хронической болезни почек, которым выполнена трансплантация аллогенной почки в хирургическом отделении (трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии) ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». Срок посттрансплантационного наблюдения составил 12 месяцев. Клиническое исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и одобрено комитетом по этике ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» (протокол № 5 от 02.12.2013).

Всем пациентам проведено динамическое определение концентрации в сыворотке крови креатинина и мочевины на предоперационном этапе, на 7-е и 360-е сутки после трансплантации. Содержание CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> лимфоцитов изучали перед операцией, на 3-и, 7-е, 30-е, 90-е, 180-е и 360-е сутки после операции. Ранняя функция почечного трансплантата оценивалась на 7-е сутки после операции по уровню креатинина крови. При показателях ниже 300 мкмоль/л функция считалась первичной (ПФТ), при значениях, равных или превышающих 300 мкмоль/л, а также при возникновении необходимости в диализе на первой неделе после трансплантации, состояние классифицировалось как дисфункция почечного трансплантата (ДФТ) [20]. Удовлетворительная функция почечного трансплантата через год характеризовалась уровнем креатинина крови ниже 150 мкмоль/л, отсутствием эпизодов отторжения почечного трансплантата и необходимости в диализе на первом году наблюдения [21].

Основными критериями включения в группу исследования являлись:

1. Первичная почечная трансплантация.
2. Индукционная терапия моноклональными анти-CD25-антителами.

3. Трехкомпонентная иммуносупрессивная терапия в течение первых 12 месяцев наблюдения.

Мужчин было 100 (60,6%), женщин – 65 (39,4%). Возраст составил от 19 до 71 лет, средний возраст был  $45,95 \pm 0,94$  [95% ДИ 44,9; 47,81] года. До трансплантации 81,21% пациентов находились на программном гемодиализе и 18,79% – на перитонеальном диализе. Медианный уровень креатинина в крови до проведения трансплантации почки составлял  $705,0$  [579,0; 920,0] мкмоль/л, а мочевины –  $17,0$  [13,9; 20,2] ммоль/л. Средняя длительность холодовой ишемии трансплантата почки равнялась  $12,14 \pm 0,32$  часа [95% ДИ 11,50; 12,77]. Отрицательный результат прямой перекрестной пробы (cross-match) наблюдали в 100% случаев.

Средняя длительность нахождения на диализе составила  $32,9 \pm 2,45$  [95% ДИ 28,06; 37,76] месяца. По продолжительности диализа отмечалось следующее распределение: 5 лет и более – 23 пациента (13,94%), от 1 года до 5 лет – 103 (62,42%) и до 1 года – 39 (23,64%).

Из 165 реципиентов с учетом состояния первичной и поздней функции трансплантата были сформированы четыре группы реципиентов почечного трансплантата. В первую группу (РПТ1) были включены пациенты, имеющие удовлетворительную первичную и позднюю функции почечного трансплантата ( $n=76$ ), во вторую (РПТ2) – имеющие первичную удовлетворительную функцию и позднюю дисфункцию трансплантата ( $n=17$ ), в третью (РПТ3) – первичную дисфункцию и позднюю удовлетворительную функцию ( $n=44$ ), а в четвертую (РПТ4) вошли пациенты с первичной и поздней дисфункцией трансплантата ( $n=28$ ).

Все пациенты получали иммуносупрессивную терапию согласно клиническим протоколам трансплантации почки (Приложение 1 к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.01.2010 № 6). Пациенты из обследуемой группы получали индукционную терапию моноклональными анти-CD25-антителами. Схема иммуносупрессивной терапии включала: ингибиторы кальциневрина в сочетании с микофенолатом (87,35%) или азатиоприном (12,65%), а также кортикостероиды. Моноклональные анти-CD25-антитела вводили дважды в дозе 20 мг в 0-е и 4-е сутки. Кроме того, 72,89% пациентов получали в качестве ингибитора кальциневрина циклоспорин, а 27,11% – такролимус.

Для определения иммунологических особенностей реципиентов почечного трансплантата применяли методику проточной цитометрии, используя проточный цитофлуориметр FacsCanto II (Becton Dickinson and Company, BD Biosciences, США) в комплекте со станцией пробоподготовки с применением моноклональных антител CD4PC7, CD8FITC, CD3PC5.5 (Beckman Coulter и BD, США) с использованием моно-, двух- и шестипараметрического анализа согласно инструкции производителя с применением многократного поступательного гейтирования. Иммунологическое обследование пациентов проводили перед операцией и на 3-и, 7-е, 30-е, 90-е, 180-е и 360-е сутки после операции.

#### Методика определения относительного и абсолютного количества субпопуляции лимфоцитов

Забор крови производили из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтом (этилендиаминтетрауксусная кислота). Для определения экспрессии поверхностных маркеров ДН Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии производили пробоподготовку по безотмывочной технологии в панели оценки активационной способности Т-лимфоцитов. К 100 мкл крови добавляли моноклональные антитела CD4PC7, CD8FITC, CD38PE, CD3PC5.5, Anti-HLADR APC (Beckman Coulter и BD, США) в объемах, рекомендуемых фирмой-производителем. Инкубировали 15 минут в темноте при комнатной температуре. Для лизиса эритроцитов использовали лизирующий раствор OptiLyse В. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (BD, США). Накапливали не менее 10 000 событий. Популяцию Т-лимфоцитов определяли как CD3<sup>+</sup> клетки в гейте SSClowCD45<sup>bright</sup>, характерной для лимфоцитов. Оценку даблнегативной популяции производили по гистограмме, гейтированной по CD3<sup>+</sup> Т-лимфоцитам по соотношению CD4<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> клеток. В квадранте CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> определялись ДН Т-лимфоциты. Необходимо отметить, что популяция ДН Т-лимфоцитов не подлежала иммунофенотипической дифференцировке на субпопуляции и могла включать в себя ДН Т-лимфоциты с экспрессией TCRαβ-, так и TCRγδ-клетки. Для вычисления абсолютного содержания ДН Т-лимфоцитов использовали результаты общего анализа крови, выполнявшегося из данной пробирки в тот же день.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Statistica 10,0. Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами, а количественных признаков – в формате: среднее (доверительный интервал) – М [Confidence -95%; +95%] и медиана (интерквартильный размах) – Me [Q25; Q75]. Для сравнения значений использовали метод числовых характеристик (Mann–Whitney U Test, Wilcoxon Matched Pairs Test) с оценкой распределения переменных. Связь показателей с помощью корреляционного анализа оценивали с использованием определения ранговой корреляции Спирмана (Spearman Rank Order Correlations). Результаты считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости, равной или менее 0,05.

**Результаты и обсуждение**

Результаты биохимического обследования пациентов изучаемых групп представлены в табл. 1.

Сравнительный анализ четырех групп по изучаемым показателям выявил статистически значимые различия при динамическом наблюдении в послеоперационном периоде. Перед операцией отмечено только статистически значимое превышение уровня мочевины в группе РПТ1 по сравнению с показателем в группе РПТ2 ( $p_{0Mann-Whitney U Test} = 0,020$ ). На 7-е сутки обследования статистически значимых различий уровня мочевины в группах РПТ1 и РПТ2 выявлено не было ( $p_{7Mann-Whitney U Test} = 0,758$ ). На 360-е сутки в группе РПТ2 уровень мочевины был статистически значимо выше, чем в группе РПТ1 ( $p_{360Mann-Whitney U Test} = 0,0003$ ). На 7-е сутки в группе РПТ1 креатинин был статистически значимо ниже, чем в группе РПТ2, хотя по критериям оценки функ-

ции почечного трансплантата функция считалась удовлетворительной ( $p_{7Mann-Whitney U Test} = 0,039$ ). На 360-е сутки наблюдения уровень креатинина в группе РПТ2 соответствовал критериям ДФТ и был статистически значимо выше, чем в группе РПТ1 ( $p_{360Mann-Whitney U Test} = 0,001$ ). На 7-е сутки обследования уровень креатинина в группе РПТ4 был статистически значимо выше по сравнению с показателем в группе РПТ3 ( $p_{7Mann-Whitney U Test} = 0,005$ ). Сравнение содержания мочевины в крови групп РПТ3 и РПТ4 не выявило статистически значимых различий ни на 7-е, ни на 360-е сутки обследования ( $p_{0Mann-Whitney U Test} = 0,477$  и  $p_{360Mann-Whitney U Test} = 0,167$  соответственно). Уровень креатинина в группе РПТ3 через год наблюдения снизился и соответствовал критериям удовлетворительной функции трансплантата, а в группе РПТ4 был статистически значимо выше, чем в группе РПТ3 ( $p_{360Mann-Whitney U Test} = 0,007$ ).

Результаты определения содержания ДН Т-лимфоцитов в группах реципиентов почечного трансплантата с различными вариантами течения посттрансплантационного периода представлены в табл. 2.

При сравнении двух групп пациентов РПТ1 и РПТ2 статистически значимых различий по уровню субпопуляции ДН Т-лимфоцитов в течение года не было выявлено ( $p_{0Mann-Whitney U Test} = 0,402$ ,  $p_{3Mann-Whitney U Test} = 0,471$ ,  $p_{7Mann-Whitney U Test} = 0,721$ ,  $p_{30Mann-Whitney U Test} = 0,191$ ,  $p_{90Mann-Whitney U Test} = 0,85$ ,  $p_{180Mann-Whitney U Test} = 0,347$ ). Через 1 год наблюдения отмечено статистически значимое снижение уровня данной субпопуляции в группе РПТ2 (с поздней дисфункцией трансплантата) ( $p_{360Mann-Whitney U Test} = 0,001$ ).

При анализе динамики уровня CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> лимфоцитов в группах РПТ3 и РПТ4 была выявлена похожая тенденция. В группе РПТ4 (с поздней дисфункцией трансплантата) дан-

**Таблица 1. Биохимические показатели крови пациентов изучаемых групп, Me (Q25; Q75)**  
**Table 1. Biochemical parameters of patients in the studied groups, Me (Q25; Q75)**

Показатель	Сутки	Группы пациентов			
		РПТ1	РПТ2	РПТ3	РПТ4
Креатинин, мкмоль/л	0	649,5 (569,0; 927,5)	705,0 (596,0; 920,0)	745,0 (566; 864,0)	818,0 (615,0; 1005,0)
	7	148,0 (114,0; 196,5)	192,0 (146,0; 197,0)	500,0* (352,0; 638,0)	545,0* (426,0; 738,0)
	360	107,0 (96,0; 121,0)	204,0* (152,0; 277,0)	109,0* (97,0; 126,0)	201,0*,** (169,5; 260,0)
Мочевина, ммоль/л	0	19,2 (16,8; 22,2)	16,8* (14,3; 18,6)	15,2* (10,2; 17,3)	15,8* (11,5; 17,55)
	7	10,35 (7,8; 14,5)	10,3 (7,8; 16,5)	21,5* (17,4; 36,05)	23,45* (16,9; 36,7)
	360	7,2 (5,9; 10,6)	11,2* (10,3; 14,0)	7,65 (6,4; 15,9)	12,3* (6,7; 17,9)

Примечания: \* –  $p < 0,05$  при сравнении с РПТ1; \*\* –  $p < 0,05$  при сравнении с РПТ3

Таблица 2. Показатели абсолютного и относительного содержания CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> даблнегативных Т-лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата, Ме (Q25; Q75)

Table 2. Absolute and relative count of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> double-negative T lymphocytes in kidney transplant recipients, Me (Q25; Q75)

Сутки	Ед. изм.	CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> даблнегативные Т-лимфоциты			
		РПТ1	РПТ2	РПТ3	РПТ4
0	отн х %	3,8 (2,98; 4,5)	4,09 (3,4; 4,57)	4,93 (2,51; 5,42)	3,64 (2,51; 5,4)
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,015 (0,013; 0,028)	0,02 (0,014; 0,045)	0,017 (0,015; 0,023)	0,022 (0,013; 0,057)
3	отн х %	1,89 (1,54; 2,16)	1,71 (1,48; 2,22)	4,3* (3,27; 5,05)	3,75* (2,95; 4,5)
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,12 (0,007; 0,019)	0,011 (0,004; 0,023)	0,025* (0,016; 0,029)	0,019* (0,012; 0,043)
7	отн х %	1,93 (1,47; 2,43)	1,85 (1,22; 2,43)	4,6* (2,9; 6,13)	4,19* (3,06; 5,0)
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,03 (0,02; 0,048)	0,024 (0,017; 0,032)	0,061* (0,034; 0,105)	0,063* (0,041; 0,072)
30	отн х %	1,93 (1,8; 2,11)	2,08 (1,9; 2,28)	5,12* (1,4; 7,71)	5,77* (3,8; 6,74)
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,031 (0,02; 0,048)	0,033 (0,021; 0,04)	0,06 (0,012; 0,082)	0,078* (0,043; 0,115)
90	отн х %	5,56 (3,56; 6,92)	5,56 (2,92; 7,32)	6,12* (4,66; 7,89)	5,15 (4,05; 6,12)
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,116 (0,061; 0,16)	0,1 (0,047; 0,176)	0,124* (0,101; 0,169)	0,101 (0,069; 0,124)
180	отн х %	4,49 (3,28; 5,52)	3,59 (3,3; 3,77)	3,5 (2,66; 4,4)	3,71 (2,66; 4,4)
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,09 (0,052; 0,125)	0,082 (0,048; 0,084)	0,072 (0,043; 0,096)	0,09 (0,048; 0,102)
360	отн х %	4,58 (3,33; 5,8)	2,76* (2,22; 3,33)	3,94 (2,48; 7,44)	2,5*, ** (1,6; 3,43)
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,1 (0,071; 0,128)	0,04* (0,036; 0,071)	0,099 (0,044; 0,161)	0,049 (0,02; 0,099)

Примечания: \* – p<0,05 при сравнении с РПТ1; \*\* – p<0,05 при сравнении с РПТ3

ная субпопуляция была статистически значимо ниже только через 1 год наблюдения по сравнению с показателем в группе РПТ3 ( $p_{0\text{Mann-Whitney U Test}}=0,589$ ,  $p_{3\text{Mann-Whitney U Test}}=0,163$ ,  $p_{7\text{Mann-Whitney U Test}}=0,502$ ,  $p_{30\text{Mann-Whitney U Test}}=0,407$ ,  $p_{90\text{Mann-Whitney U Test}}=0,222$ ,  $p_{180\text{Mann-Whitney U Test}}=0,993$ ,  $p_{360\text{Mann-Whitney U Test}}=0,039$ ). Динамика и различия абсолютных значений данной субпопуляции Т-лимфоцитов в группах РПТ1 и РПТ2, РПТ3 и РПТ4 соответствовали относительным ( $p_{0\text{Mann-Whitney U Test}}=0,397$ ,  $p_{3\text{Mann-Whitney U Test}}=0,612$ ,  $p_{7\text{Mann-Whitney U Test}}=0,2$ ,  $p_{30\text{Mann-Whitney U Test}}=0,734$ ,  $p_{90\text{Mann-Whitney U Test}}=0,99$ ,  $p_{180\text{Mann-Whitney U Test}}=0,567$ ,  $p_{360\text{Mann-Whitney U Test}}=0,025$ ).

Исходя из полученных данных, можно отметить, что в дотрансплантационном периоде различий по содержанию ДН Т-лимфоцитов между изучаемыми субпопуляциями не было. В группах с ранней ПФТ показатели данной субпопуляции лимфоцитов прогрессивно снижались, возможно, в ответ на проводимую иммуносупрессивную терапию и сохранялись на стабильно низком уровне в течение первого месяца. В группах с первичной ДФТ статистически значимой динамики ДН Т-лимфоцитов в течение первого месяца выявлено не было. На 90-е сутки выявлен рост данной субпопуляции во всех группах, причем в

группах ПФТ прирост был более значительным, чем в группах с ДФТ.

Исходя из полученных данных, более высокие значения ДН Т-лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата на 360-е сутки наблюдения ассоциировались с удовлетворительной функцией трансплантата, причем как в группе РПТ1 со стабильной на всем протяжении наблюдения функцией, так и в группе РПТ3, в которой первоначально на 7-е сутки была отмечена дисфункция трансплантата.

Учитывая полученные результаты, мы провели корреляционный анализ между значениями субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов и показателями биомаркеров функции почечного трансплантата (табл. 3).

Как следует из табл. 3, на 360-е сутки появляются отрицательные корреляционные связи между показателями CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов и биомаркерами функции почечного трансплантата. Таким образом, рост уровня субпопуляции ДН Т-лимфоцитов ассоциируется с удовлетворительной функцией почечного трансплантата. Определение уровня CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов может быть использовано в качестве дополнительного лабораторного признака

компенсаторной регуляторной реакции иммунной системы при трансплантации почки.

**Таблица 3. Уровень корреляции между показателями CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов и биомаркеров функции почечного трансплантата (Spearman Rank Order Correlations)**

**Table 3. The level of correlation between indices of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T lymphocytes and biomarkers of kidney graft function (Spearman Rank Order Correlations)**

Показатель	Сутки	Ед. изм.	Коэффициент корреляции, r (p)	
			Креатинин	Мочевина
ДН Т-лимфоциты	0	отн х %	-0,11 (p=0,29)	-0,11 (p=0,29)
		10 <sup>9</sup> кл/л	+0,14 (p=0,24)	-0,10 (p=0,38)
	360	отн х %	-0,53 (p<0,001)	-0,38 (p<0,001)
		10 <sup>9</sup> кл/л	-0,33 (p<0,001)	-0,21 (p=0,028)

**Выводы**

1. Для пациентов со стабильной в течение первого года удовлетворительной периферической функцией почечного трансплантата характерно повышение уровня в крови субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов.

2. Нарушение функции почечного трансплантата в позднем посттрансплантационном периоде характеризуется снижением уровня CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов.

3. Изменение содержания субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов может быть использовано в качестве дополнительного лабораторного признака компенсаторной регуляторной реакции иммунной системы при трансплантации почки.

4. Изучение субпопуляций CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> Т-лимфоцитов у пациентов после трансплантации почки дает возможность прогнозировать варианты течения посттрансплантационного периода, что позволит разрабатывать потенциальные терапевтические стратегии лечения этой категории пациентов.

**Литература / References**

1. Gao JF, McIntyre MS, Juvet SC, Diao J, Li X, Vanama RB, et al. Regulation of antigen-expressing dendritic cells by double negative regulatory T cells. *Eur J Immunol.* 2011;41(9):2699–708. PMID: 21660936 <https://doi.org/10.1002/eji.201141428>

2. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(7):490–500. PMID: 20559327 <https://doi.org/10.1038/nri2785>

3. Zhang Z, Yang L, Young K, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med.* 2000;6(7):782–789. <https://doi.org/10.1038/77513>

4. Brandt D, Hedrich CM. TCRαβ(+) CD3(+)CD4(-)CD8(-) (double negative) T cells in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2018;17(4):422–430. PMID: 29428806 <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.02.001>

5. Ford MS, Chen W, Wong S, Li C, Vanama R, Elford AR, et al. Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur J Immunol.* 2007;37(8):2234–41. PMID: 17578845 <https://doi.org/10.1002/eji.200636991>

6. Chen W, Ford MS, Young KJ, Cybulsky MI, Zhang L. Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. *J Immunol.* 2003;170(4):1846–53. PMID: 12574350 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.1846>

7. Voelkl S, Gary R, Mackensen A. Characterization of the immunoregulatory function of human TCR-αβ+ CD4- CD8- double-negative T cells. *Eur J Immunol.* 2011;41(3):739–48. PMID: 21287552 <https://doi.org/10.1002/eji.201040982>

8. Zhang D, Yang W, Degauque N, Tian Y, Mikita A, Zheng XX. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood.* 2007;109(9):4071–9. PMID: 17197428 <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-050625>

9. Chen W, Zhou D, Torrealba JR, Waddell TK, Grant D, Zhang L. Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells. *J Immunol.* 2005;175(5):3409–16. PMID: 16116235 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3409>

10. Hillhouse EE, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Dugas V, Lesage S. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol.* 2010;88(8):771–80. PMID: 20603635 <https://doi.org/10.1038/>

icb.2010.84

11. Zhang ZX, Ma Y, Wang H, Arp J, Jiang J, Huang X, et al. Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J Immunol.* 2006;177(10):6920–9. PMID: 17082607 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.6920>

12. Chen W, Diao J, Stepkowski SM, Zhang L. Both infiltrating regulatory T cells and insufficient antigen presentation are involved in long-term cardiac xenograft survival. *J Immunol.* 2007;179(3):1542–8. PMID: 17641020 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.3.1542>

13. Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L. Infusion of in vitro-generated DN T regulatory cells induces permanent cardiac allograft survival in mice. *Transplant Proc.* 2003;35(7):2479–80. PMID: 14611991 <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2003.08.030>

14. Young KJ, DuTemple B, Phillips MJ,

Zhang L. Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J Immunol.* 2003;171(1):134–41. PMID: 12816991 <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.1.134>

15. McIver Z, Serio B, Dunbar A, O'Keefe CL, Powers J, Wlodarski M, et al. Double-negative regulatory T cells induce allotolerance when expanded after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2008;141(2):170–8. PMID: 18318770 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141>

16. Young KJ, Kay LS, Phillips MJ, Zhang L. Antitumor activity mediated by double-negative T cells. *Cancer Res.* 2003;63(22):8014–21. PMID: 14633734.

17. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell.* 2008;133(5):775–787. PMID: 18510923 <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>

18. Chen W, Ford MS, Young KJ, Zhang L. The role and mechanisms of double negative regulatory T cells in the suppression of immune responses. *Cell*

*Mol Immunol.* 2004;1(5):328–35. PMID: 16285891.

19. Ford McIntyre MS1, Gao JF, Li X, Naeini BM, Zhang L. Consequences of double negative regulatory T cell and antigen presenting cell interaction on immune response suppression. *Int Immunopharmacol.* 2011;11(5):597–603. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.11.015>

20. Cantaluppi V, Dellepiane S, Tamagnone M, Medica D, Figliolini F, Messina M, et al. Neutrophil gelatinase associated lipocalin is an early and accurate biomarker of graft function and tissue regeneration in kidney transplantation from extended criteria donors. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129279. PMID: 26125566 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129279>

21. Massart A, Ghisdal L, Abramowicz M, Abramowicz D. Operational tolerance in kidney transplantation and associated biomarkers. *Clin Exp Immunol.* 2017;189(2):138–157. PMID: 28449211 <https://doi.org/10.1111/cei.12981>

### Информация об авторах

Светлана Валерьевна  
Зыблева

канд. мед. наук, врач-иммунолог, ученый секретарь ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», <https://orcid.org/0000-0003-3061-5324>

Сергей Леонидович  
Зыблев

канд. мед. наук, доцент, врач-хирург хирургического отделения (трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии) ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», <https://orcid.org/0000-0002-0968-6630>

### Information about authors

Svetlana V. Zyblev

Cand. Med. Sci., Immunologist, Academic Secretary, Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, <https://orcid.org/0000-0003-3061-5324>

Sergey L. Zyblev

Cand. Med. Sci., Associate Professor, Surgeon, Transplantation, Endocrine and Reconstructive Surgery Department, Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, <https://orcid.org/0000-0002-0968-6630>

Статья поступила: 19.11.2019

Статья принята в печать: 3.12.2019

Received: November 19, 2019

Accepted for publication: December 3, 2019