

Особенности субпопуляционного состава В-лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата

С.В. Зыблева[✉], С.Л. Зыблев

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины
и экологии человека»,

246040, Республика Беларусь, Гомель, ул. Ильича, д. 290

[✉] Автор, ответственный за переписку: Светлана Валерьевна Зыблева, канд. мед. наук, врач-иммунолог, ученый секретарь Республиканского научно-практического центра радиационной медицины и экологии человека, zyb-svetlana@yandex.ru

Аннотация

Введение. Обнаружено существование многочисленных подмножеств В-клеток со специфическими нормативными функциями, способными к модулированию воспалительных ответов. Большинство исследований по изучению функции В-регуляторных лимфоцитов проводили в контексте аутоиммунной и инфекционной патологии, тогда как целью данной работы было изучить показатели основных, активированных и толерогенных субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов, перенесших трансплантацию почки.

Цель исследования. Изучить показатели субпопуляций В-лимфоцитов и определить их роль в развитии иммунологической толерантности после трансплантации почки.

Материал и методы. Обследованы 197 реципиентов почечного трансплантата. Определяли уровень субпопуляций В-лимфоцитов (CD19⁺IgD⁺CD27⁺ и CD19⁺IgD⁺CD27⁻) перед операцией, на 1-е, 3-е, 7-е и 30-е сутки после операции. Функцию почечного трансплантата оценивали на 7-е сутки с разделением пациентов на две группы: с первичной функцией и его дисфункцией.

Результаты и обсуждение. В показателях CD19⁺IgD⁺CD27⁺ и CD19⁺IgD⁺CD27⁻ на протяжении 3 месяцев выявлены статистически значимые отличия между группами реципиентов. В течение первых 7 суток с удовлетворительной функцией аллотрансплантата ассоциированы более низкие уровни данных субпопуляций. Однако к 90-м суткам после операции в группе пациентов с дисфункцией трансплантата отмечен рост показателей CD19⁺IgD⁺CD27⁺ В-лимфоцитов.

Выводы. Низкие уровни непереключенных (CD19⁺IgD⁺CD27⁺) и переключенных (CD19⁺IgD⁺CD27⁻) В-лимфоцитов памяти в периферической крови реципиентов почечного трансплантата ассоциированы с благоприятным вариантом течения раннего послеоперационного периода. Выявлено, что на 3-и посттрансплантационные сутки относительный уровень CD19⁺IgD⁺CD27⁺ непереключенных В-лимфоцитов памяти, более либо равный уровню 11,77% с чувствительностью 88,40% и специфичностью 84,30%, и уровень CD19⁺IgD⁺CD27⁺ переключенных В-лимфоцитов памяти, более либо равный значению 20,74% с чувствительностью 88,70% и специфичностью 82,40%, позволяют прогнозировать развитие ранней дисфункции почечного трансплантата.

Ключевые слова: трансплантация почки, CD19⁺IgD⁺CD27⁺ и CD19⁺IgD⁺CD27⁻ В-лимфоциты, дисфункция трансплантата почки

Конфликт интересов Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование Исследование проводилось без спонсорской поддержки

Для цитирования: Зыблева С.В., Зыблев С.Л. Особенности субпопуляционного состава В-лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата. *Трансплантология*. 2021;13(2):141–150. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2021-13-2-141-150>

Characteristics of B-lymphocyte subpopulations in renal 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

[✉]Corresponding author: Svetlana V. Zybleva, Cand. Sci. (Med.), Immunologist, Academic Secretary,
Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, zyb-svetlana@yandex.ru

Abstract

Introduction. The presence of multiple subsets of B-cells with specific regulatory functions capable of modulating inflammatory responses have been detected. Most of the studies of B_{reg} function were carried out in the context of autoimmune and infectious diseases, whereas the objective of this research was to study the characteristics of the main, activated and tolerogenic subpopulations of B lymphocytes in patients who underwent kidney transplantation.

Objective. To study the indices of B-lymphocyte subpopulations and determine their role in the development of immunological tolerance after kidney transplantation.

Material and methods. We have examined 197 recipients who underwent kidney transplantation. We determined B lymphocyte subpopulation levels ($CD19^+IgD^+CD27^+$ and $CD19^+IgD^-CD27^+$) before transplantation, on the 1st, 3rd, 7th and 30th days after the transplantation. Allograft function was assessed on day 7 with the division of patients into two groups: with primary graft function and graft dysfunction.

Results and discussion. Significant differences were revealed between the groups of recipients over three months in the following cell subpopulation levels $CD19^+IgD^+CD27^+$ and $CD19^+IgD^-CD27^+$. During the first 7 days, lower levels of these subpopulations were associated with satisfactory allograft function. However, by the 90th day after surgery, an increase in $CD19^+IgD^+CD27^+$ B lymphocytes was noted in the group of patients with graft dysfunction.

Conclusions. Low levels of not-switched ($CD19^+IgD^+CD27^+$) and switched ($CD19^+IgD^-CD27^+$) memory B lymphocytes in the peripheral blood of kidney transplant recipients are associated with a favorable postoperative course. We have found that on the 3rd post-transplant day, the relative level of non-switched memory B lymphocytes ($CD19^+IgD^+CD27^+$) exceeding or equal to 11.47%, and the level of switched memory B lymphocytes ($CD19^+IgD^-CD27^+$) exceeding or equal to 20.74% might predict the development of early renal graft dysfunction with a sensitivity and specificity of 88.40% and 84.30% for the former parameter and of 88.70% and 82.40% for the latter one, respectively.

Keywords: kidney transplantation, $CD19^+IgD^+CD27^+$ and $CD19^+IgD^-CD27^+$ B lymphocytes, renal graft dysfunction

CONFLICT OF INTERESTS Authors declare no conflict of interest

FINANCING The study was performed without external funding

For citation: Zybleva SV, Zyblev SL. Characteristics of B-lymphocyte subpopulations in renal transplant recipients. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2021;13(2):141–150. (In Russ.). <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2021-13-2-141-150>

ГД – гемодиализ
ГС – группа сравнения
ДС – додиализная стадия
ДИ – доверительный интервал

ДФТ – дисфункция трансплантата
ИСТ – иммуносупрессивная терапия
ПД – перитонеальный диализ
ПФТ – первичная функция трансплантата

Введение

Иммунная система включает в себя сложную взаимосвязь между множеством различных типов клеток. За последние десятилетия Т-клетки, дендритные клетки и макрофаги были отнесены к ключевым клеткам, регулирующим иммунологический ответ, связывая врожденный и адаптивный иммунитет. Многие исследовательские группы при оценке различных иммунологических параметров, отвечающих за развитие толерантности, опирались в основном на пока-

затели Т-клеточной активности, а в частности, Т-регуляторные лимфоциты [1]. В то же время В-лимфоциты, традиционно известные своей ролью в производстве антител, представлении антигенов и продукции цитокинов, продиктованных Т-клетками, в последние годы получили иное значение в развитии иммунологического ответа [2]. Обнаружено существование многочисленных подмножеств В-клеток со специфическими нормативными функциями, способными к модулированию Т-клеточных и хронических воспалительных ответов [3].

При созревании в ответ на активацию антигеном и дальнейшей пролиферации изменяется набор маркеров В-клеток. Для верификации периферических В-лимфоцитов используют основной мембранный антиген CD19. По степени экспрессии других поверхностных маркеров (IgD, IgM, CD27, CD38, CD10) выделяют несколько субпопуляций В-клеток. Так, различают следующие типы зрелых В-лимфоцитов: собственно В-клетки (CD19⁺IgD⁺CD27⁻), наивные В-лимфоциты) – неактивированные В-лимфоциты, не контактировавшие с антигеном. Они имеют слабое сродство ко многим антигенам. В-клетки памяти (CD19⁺IgD⁺CD27⁺, не переключенные В-лимфоциты памяти) – активированные В-лимфоциты [4]. По мере созревания В-клетки переключаются от синтеза IgM и IgD на синтез IgG, IgA, IgE. В-клетки памяти (CD19⁺IgD⁻CD27⁺, переключенные В-лимфоциты памяти, основные антителопродуцирующие клетки). Финальным этапом дифференцировки активированных В-клеток являются плазматические клетки, которые в отличие от остальных В-клеток обладают малым количеством мембранных антител и способны секретировать антитела.

Недавние исследования выделили существование В-клеток с регуляторными свойствами, которые были названы В_{regs}, аналогичными регуляторным Т-клеткам (Т_{regs}). Несмотря на то, что в литературе информации о роли данной субпопуляции в развитии трансплантационной толерантности не много, некоторые исследователи отмечают связь уровня В_{regs} с выживаемостью почечного трансплантата [5]. Так, активация В-клеток при аутоиммунных заболеваниях ассоциирована с нарушением гомеостаза В-лимфоцитов периферической крови и выраженной экспансией CD27⁺ В-клеток памяти [6, 7]. Большинство исследований по изучению функции В_{regs} проводилось в контексте аутоиммунной и инфекционной патологии, тогда как целью данной работы было изучить показатели основных, активированных и толерогенных субпопуляций В-лимфоцитов у пациентов, перенесших трансплантацию почки.

В предыдущих исследованиях нами была выявлена взаимосвязь и предикативная значимость определения уровня наивных CD19⁺IgD⁺CD27⁻ В-лимфоцитов при прогнозировании начальной функции почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде на основании системы балльной оценки с использованием процедуры категориальной регрессии [8]. Было продолжено изучение особенностей динамики субпопуляций

CD19⁺IgD⁺CD27⁺ непереключенных и CD19⁺IgD⁻CD27⁺ переключенных В-клеток памяти и их возможной прогностической значимости при почечной аллотрансплантации.

Цель исследования. Изучить показатели субпопуляций В-лимфоцитов и определить их роль в развитии иммунологической толерантности после трансплантации почки.

Материал и методы

Обследованы 197 пациентов, которым выполнена трансплантация почки в хирургическом отделении (трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии) ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». Исследование соответствовало критериям Хельсинкской декларации 1975 года, одобрено комитетом по этике ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» (протокол № 5 от 02.12.2013).

Критерии включения в группу исследования являлись: первичная почечная трансплантация; индукционная терапия моноклональными анти-CD25-антителами; трехкомпонентная иммуносупрессивная терапия. Отрицательный результат прямой перекрестной пробы (cross-match) наблюдался в 100% случаев.

Пациенты были разделены на две группы по виду функционирования почечного трансплантата. С первичной функцией трансплантата (ПФТ, n=101) (средний возраст 45,46±1,28 [42,92; 47,99] лет) и с ранней дисфункцией трансплантата (ДФТ, n=96) (46,26±1,20 [43,87; 48,65] лет) (p=0,772). Ранняя функция почечного трансплантата оценивалась на 7-е сутки после операции по уровню креатинина крови и необходимости проведения диализа. При показателях креатинина 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 пациенты были отнесены в группу ДФТ [9]. В качестве группы сравнения (ГС) участвовали 90 здоровых добровольцев.

Средняя продолжительность нахождения на диализе в группе ПФТ составила 30,31±2,79 мес [95% ДИ 24,77; 35,86], в группе ДФТ – 37,40±3,71 мес [95% ДИ 30,03; 44,77]. По продолжительности диализа отмечалось следующее распределение: 5 лет и более в группе ПФТ находились 13 пациентов (12,87%), в группе ДФТ – 20 (20,83%), от 1 года до 5 лет – в группе ПФТ – 62 пациента (61,39%), в группе ДФТ – 54 (56,25%), до 1 года – в группе ПФТ было 24 пациента (23,76%),

в группе ДФТ – 21 (21,88%). На додиализной стадии (ДС) в группе ПФТ находились 2 пациента (1,98%), а в группе ДФТ – 1 пациент (1,04%).

Пациенты сравниваемых групп не имели статистически значимых отличий по полу (ПФТ: женщин – 38 (37,62%), мужчин – 63 (62,38%); ДФТ: женщин – 37 (38,54%), мужчин – 59 (61,46%)), виду проводимого диализа до трансплантации (ПФТ: гемодиализ (ГД) – 76 (75,25%), перитонеальный диализ (ПД) – 23 (22,77%), ДС – 2 (1,98%); ДФТ: ГД – 81 (84,38%), ПД – 14 (14,58%), ДС – 1 (1,04%)), времени холодовой ишемии донорского органа (ПФТ: $11,93 \pm 0,4$ часа [11,11; 12,75]; ДФТ: $12,79 \pm 0,46$ часа [11,87; 13,70]) ($p=506$, $p=0,145$, $p=0,274$ соответственно).

Все пациенты получали иммуносупрессивную терапию согласно клиническим протоколам трансплантации почки (Приложение 1 к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.01.2010 № 6).

Для определения иммунологических особенностей реципиентов почечного трансплантата применяли методику проточной цитометрии с применением многократного поступательного гейтирования.

Иммунологическое обследование пациентов проводили перед операцией, на 1-е, 3-и, 7-е и 30-е сутки после операции.

Методика определения относительного и абсолютного количества субпопуляций В-лимфоцитов

Забор крови производили из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтом (этилендиаминтетрауксусная кислота). Применяли моноклональные антитела, меченые флуорохромами к поверхностным антигенам IgD FITC, CD27 PC5.5, CD19 APC (Beckman Coulter и BD, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Кровь с мечеными антителами для проточной цитометрии инкубировали 15 мин в темноте. Для лизиса эритроцитов использовали Opti Lyse B. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США). Накапливали не менее 20 000 событий. Гейтирование проводили по 19^+ клеткам. Непереклученные и переклученные В-клетки памяти имели иммунофенотип $CD19^+IgD^+CD27^+$ и $CD19^+IgD^-CD27^+$ соответственно. Абсолютное значение всех субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови получали путем математического вычисления.

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) – M [Confidence -95%; +95%] и медиана (интерквартильный размах) – Me [Q25; Q75]. Для сравнения значений использовался метод числовых характеристик (Mann–Whitney U Test, Wilcoxon Matched Pairs Test) с оценкой распределения переменных. Для номинальных переменных проводили анализ таблиц сопряженности с оценкой различий в частотах с использованием критерия Pearson Chi-square и two-tailed Fisher's exact test. Результаты считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости менее 0,05.

Результаты

Изучив динамику $CD19^+$ лимфоцитов в группах реципиентов почечного трансплантата на протяжении первого месяца и сопоставив их со значениями группы сравнения, мы отметили следующие особенности. До трансплантации почки относительный уровень $CD19^+$ лимфоцитов в группе ПФТ составил 9,20% [5,30;10,60] и 8,50% [7,10;11,80] в группе ДФТ, что было ниже показателей в группе сравнения (11,00% [8,10;13,90]) ($p_{0ПФТ/ГСотн}=0,019$, $p_{0ДФТ/ГСотн}=0,014$).

Абсолютное содержание $CD19^+$ лимфоцитов было также ниже в группах ПФТ ($0,12 \times 10^9$ кл/л [0,08;0,18]) и ДФТ ($0,14 \times 10^9$ кл/л [0,09;0,21]), чем в группе сравнения ($0,23 \times 10^9$ кл/л [0,15;0,33]) ($p_{0ПФТ/ГСабс}<0,0001$ и $p_{0ДФТ/ГСабс}<0,0001$).

Между группами ПФТ и ДФТ статистически значимых различий по относительному и абсолютному содержанию $CD19^+$ лимфоцитов выявлено не было ($p_{0ПФТ/ДФТотн}=0,575$, $p_{0ПФТ/ДФТабс}=0,964$).

С первых суток после трансплантации был отмечен статистически значимый рост относительного количества В-лимфоцитов во всех группах ($p_{0,1ПФТ}<0,0001$, $p_{0,1ДФТ}<0,0001$) со статистически значимым превышением уровня такового в ГС в группах ПФТ и ДФТ ($p_{ПФТ1/ГСотн}=0,018$, $p_{ДФТ1/ГСотн}=0,012$). Абсолютное количество $CD19^+$ в группах ПФТ и ДФТ ($p_{1ПФТ/ГСабс}<0,0001$, $p_{1ДФТ/ГСабс}<0,0001$, $p_{3ПФТ/ГСабс}=0,036$, $p_{3ДФТ/ГСабс}<0,0001$) сохранялось ниже уровня в ГС до 3 суток.

К 3-м суткам сохранялся прогрессивный рост относительного количества В-лимфоцитов, в группах ПФТ и ДФТ уровень данной субпопуляции вырос в 2 раза и составил 19,40% [15,20;24,40]

и 17,45% [13,25;26,30] соответственно ($p_{\text{ПФТ/ДФТ}}=0,386$).

Относительный уровень В-лимфоцитов на 7-е посттрансплантационные сутки снизился и составил 12,20% [7,50;18,00] в группе ПФТ и 13,30% [9,60;19,60] в группе ДФТ; статистически значимых различий между этими группами по данному показателю выявлено не было ($p_{\text{ПФТ/ДФТ}}=0,277$, $p_{\text{ПФТ/ДФТ}}=0,269$).

В ходе дальнейшего мониторинга содержания относительного количества В-лимфоцитов на 30-е сутки столь существенной динамики не было выявлено. В группе ПФТ уровень CD19⁺ лимфоцитов статистически значимо не отличался от его уровня в группе ДФТ и составил 13,80% [11,10;19,10] при показателе в группе ДФТ 16,20% [9,50;23,30] ($p_{\text{ПФТ/ДФТ}}=0,240$). Абсолютный уровень В-лимфоцитов в группе ПФТ составил $0,29 \times 10^9$ кл/л [0,14;0,45], а в группе ДФТ содержание CD19⁺ лимфоцитов было $0,20 \times 10^9$ кл/л [0,14;0,41], что было сопоставимо с уровнем в группе ПФТ ($p_{\text{ПФТ/ДФТ}}=0,197$).

Содержание минорной субпопуляции CD19⁺IgD⁺CD27⁺ В-лимфоцитов в раннем посттрансплантационном периоде представлено в табл. 1.

Интересно, что перед операцией относительный и абсолютный уровень CD19⁺IgD⁺CD27⁺ в группе ПФТ был статистически значимо ниже показателей групп сравнения и ДФТ ($p_{\text{ПФТ/ДФТ}} < 0,0001$, $p_{\text{ПФТ/ГС}}=0,002$, $p_{\text{ДФТ/ГС}}=0,039$). В раннем посттрансплантационном периоде динамика количества CD19⁺IgD⁺CD27⁺ непереключенных В-лимфоцитов памяти в группе ДФТ отличалась от динамики в группе ПФТ. Так, в группе ПФТ наблюдался рост относительного количества CD19⁺IgD⁺CD27⁺ лимфоцитов, но сохранялось статистическое преобладание в группе ДФТ ($p_{\text{ПФТ/ДФТ}} < 0,0001$, $p_{\text{ПФТ/ДФТ}} < 0,0001$) (рис. 1).

На 30-е сутки наблюдения уровень непереключенных В-лимфоцитов памяти в группе ДФТ снизился в 2 раза, при этом их содержание стало ниже, чем в группе ПФТ (Mann-Whitney U Test $p_{\text{ПФТ/ДФТ}}=0,022$) (см. рис. 1).

Содержание минорной субпопуляции CD19⁺IgD⁺CD27⁺ переключенных В-лимфоцитов памяти в раннем посттрансплантационном периоде представлено в табл. 2.

За период мониторинга относительного и абсолютного количества CD19⁺IgD⁺CD27⁺ переключенных В-лимфоцитов памяти были выявлены следующие особенности (рис. 3, 4).

Таблица 1. Уровень CD19⁺IgD⁺CD27⁺ в периферической крови пациентов сравниваемых групп (Me [LQ; UQ])

Table 1. The level of CD19⁺IgD⁺CD27⁺ in the peripheral blood of patients of the compared groups (Me [LQ; UQ])

Сутки	Ед из.	ГС	ПФТ	ДФТ
0	%	14,40 [8,90;19,90]	9,86*# [9,70;11,13]	23,44 [13,61;36,07]
	10^9 кл/л		0,01*# [0,005;0,018]	0,04 [0,02;0,06]
1	%	14,40 [8,90;19,90]	7,52*# [6,00;8,63]	30,05 [17,41;37,50]
	10^9 кл/л		0,01*# [0,004;0,013]	0,02 [0,02;0,04]
3	%	14,40 [8,90;19,90]	10,19*# [9,39;11,42]	21,63 [14,61;31,45]
	10^9 кл/л		0,02*# [0,11;0,026]	0,01 [0,01;0,02]
7	%	14,40 [8,90;19,90]	10,33# [9,15;12,35]	25,34 [14,11;36,57]
	10^9 кл/л		0,02# [0,018;0,025]	0,04 [0,02;0,06]
30	%	14,40 [8,90;19,90]	12,61# [11,24;14,60]	12,01 [10,82;13,21]
	10^9 кл/л		0,02 [0,013;0,054]	0,02 [0,02;0,04]

Примечания:

* – $p < 0,05$ относительно показателей ГС;

– $p < 0,05$ относительно показателей группы ДФТ

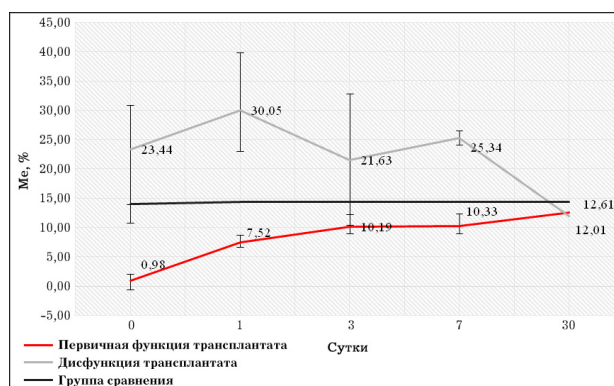


Рис. 1. Динамика относительного уровня CD19⁺IgD⁺CD27⁺ лимфоцитов у реципиентов почечного аллотрансплантата

Fig. 1. Dynamics of the relative level of CD19⁺IgD⁺CD27⁺ lymphocytes in renal allograft recipients

До трансплантации в группе ДФТ относительный уровень CD19⁺IgD⁺CD27⁺ лимфоцитов был статистически значимо меньше, чем в группе ПФТ, а также в группе сравнения (Mann-Whitney U Test $p_{\text{ПФТ/ДФТ}} < 0,0001$, $p_{\text{ПФТ/ГС}}=0,120$, $p_{\text{ДФТ/ГС}} < 0,0001$) (см. рис. 3). Абсолютное количество переключенных В-лимфоцитов памяти до операции было выше в группе ПФТ, чем в группе сравнения, а в группе ДФТ ниже ГС (Mann-Whitney U Test $p_{\text{ПФТ/ГС}}=0,120$, $p_{\text{ДФТ/ГС}} < 0,0001$) (см. рис. 4). Сравнение между группами показало, что в группе ДФТ уровень CD19⁺IgD⁺CD27⁺ лимфоцитов был статистически значимо ниже (Mann-Whitney U Test $p_{\text{ПФТ/ДФТ}} < 0,0001$).

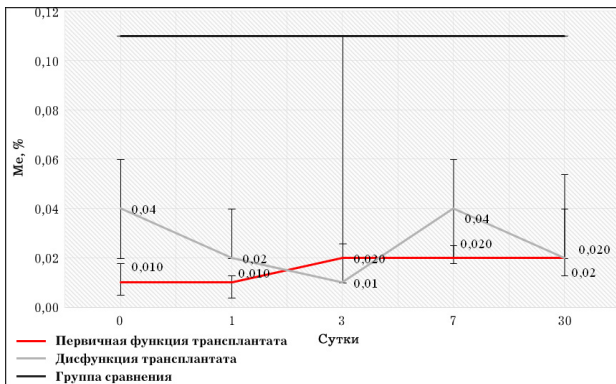


Рис. 2. Динамика абсолютного уровня CD19+IgD+CD27+ лимфоцитов у реципиентов почечного аллотрансплантата

Fig. 2. Dynamics of the absolute level of CD19+IgD+CD27+ lymphocytes in renal allograft recipients

Таблица 2. Уровень CD19+IgD-CD27+ в периферической крови пациентов сравниваемых групп (Me [LQ; UQ])

Table 2. The level of CD19+IgD-CD27+ in the peripheral blood of patients of the compared groups (Me [LQ; UQ])

Сутки	Ед. изм.	ГС	ПФТ	ДФТ
0	%	22,80 [19;10;27,70]	19,00# [14,20;25,85]	13,69 [11,60;14,79]
	10 ⁹ кл/л		0,02*# [0,018;0,034]	0,017 [0,01;0,024]
1	%	0,03 [0,02;0,06]	16,54*# [11,45;20,76]	8,86 [6,65;10,41]
	10 ⁹ кл/л		0,02*# [0,007;0,029]	0,010 [0,006;0,016]
3	%	0,03 [0,02;0,06]	15,28*# [12,11;18,44]	31,68 [29,24;33,23]
	10 ⁹ кл/л		0,02* [0,015;0,046]	0,029 [0,017;0,067]
7	%	0,03 [0,02;0,06]	12,26*# [10,76;15,40]	28,03 [18,95;38,33]
	10 ⁹ кл/л		0,02*# [0,019;0,034]	0,038 [0,029;0,083]
30	%	0,03 [0,014;0,062]	15,85* [9,81;21,48]	13,97 [12,30;16,43]
	10 ⁹ кл/л		0,03 [0,014;0,062]	0,032 [0,016;0,052]

Примечания:

* – $p < 0,05$ относительно показателей ГС;

– $p < 0,05$ относительно показателей группы ДФТ

В группе ПФТ относительное количество переключенных В-лимфоцитов памяти в ответ на проводимую иммуносупрессивную терапию постепенно снизилось на 21,03% к 7-м суткам и было статистически значимо ниже, чем в группе ДФТ, а также ниже, чем в ГС (Mann-Whitney U Test $p_{ПФТ/ДФТ\text{отн}} < 0,0001$).

На 30-е сутки иммунологического мониторинга содержание CD19+IgD-CD27+ лимфоцитов в группе ПФТ осталось без существенной динамики, а в группе ДФТ уровень переключенных В-лимфоцитов памяти снизился в 2 раза и стал статистически значимо ниже нормы (Mann-

Whitney U Test $p_{30ПФТ/ДФТ\text{отн}} < 0,0001$, $p_{30ПФТ/ГС\text{отн}} = 0,002$, $p_{30ДФТ/ГС\text{отн}} < 0,0001$).

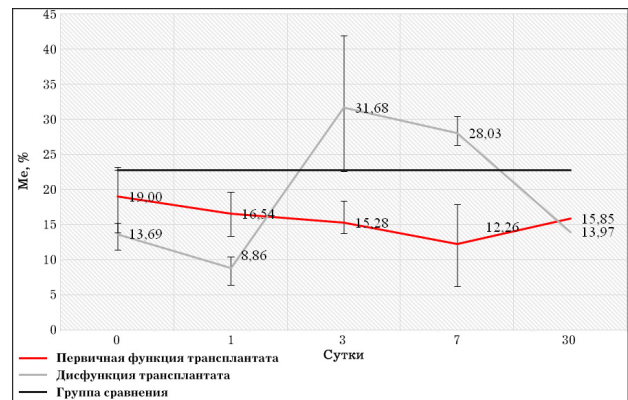


Рис. 3. Динамика относительного уровня CD19+IgD-CD27+ лимфоцитов у реципиентов почечного аллотрансплантата

Fig. 3. Dynamics of the relative level of CD19+IgD-CD27+ lymphocytes in renal allograft recipients

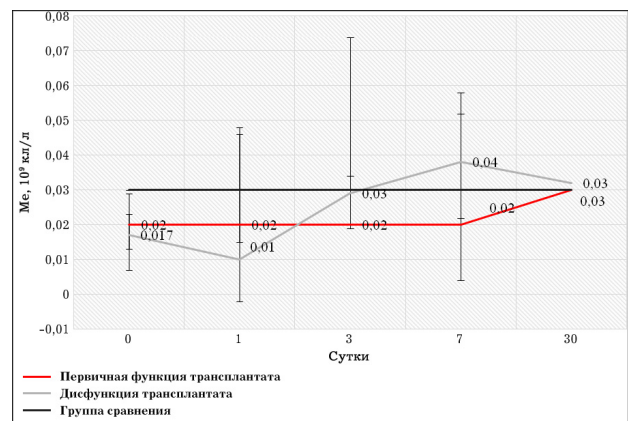


Рис. 4. Динамика абсолютного уровня CD19+IgD-CD27+ лимфоцитов у реципиентов почечного аллотрансплантата

Fig. 4. Dynamics of the absolute level of CD19+IgD-CD27+ lymphocytes in renal allograft recipients

С целью установления диагностических характеристик для прогнозирования развития дисфункции почечного трансплантата по уровням CD19+IgD+CD27+ и CD19+IgD-CD27+ В-лимфоцитов на 3-и посттрансплантационные сутки с использованием ROC-анализа выявлены диагностические возможности данных показателей (табл. 3).

Как следует из данных табл. 3, наличие на 3-и посттрансплантационные сутки относительного уровня CD19+IgD+CD27+ В-лимфоцитов более либо равного значению 11,77% с чувствительностью 88,40% и специфичностью 84,30% и уров-

Таблица 3. Диагностические характеристики уровней $CD19^+IgD^+CD27^+$ и $CD19^+IgD^-CD27^+$ в прогнозировании развития дисфункции почечного трансплантата

Table 3. Diagnostic characteristics of the levels of $CD19^+IgD^+CD27^+$ and $CD19^+IgD^-CD27^+$ in predicting the development of renal graft dysfunction

Показатель	S под кривой	Точка отсечения	Чувствительность	Специфичность	Асимптотический 95% доверительный интервал	
					Нижняя граница	Верхняя граница
$CD19^+IgD^+CD27^+$, %	0,903 $p < 0,001$	$\geq 11,77$	0,884	0,843	0,845	0,960
$CD19^+IgD^-CD27^+$, %	0,887 $p < 0,001$	$\geq 20,74$	0,887	0,824	0,825	0,933

ня $CD19^+IgD^-CD27^+$ В-лимфоцитов, более либо равного значению 20,74% с чувствительностью 88,70% и специфичностью 82,40%, позволяют прогнозировать развитие ранней дисфункции почечного трансплантата (рис. 5, 6).

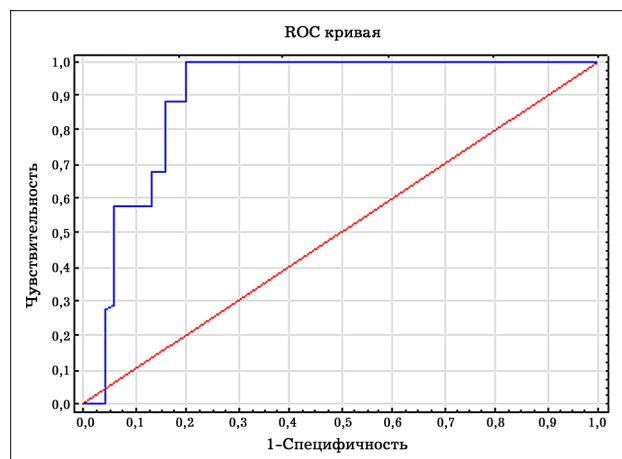


Рис. 5. Диагностические характеристики относительного уровня $CD19^+IgD^+CD27^+$ В-лимфоцитов при прогнозировании дисфункции почечного аллотрансплантата

Fig. 5. Diagnostic characteristics of the relative level of $CD19^+IgD^+CD27^+$ B-lymphocytes in predicting renal allograft dysfunction

Проведенный ROC-анализ диагностической возможности абсолютных уровней $CD19^+IgD^+CD27^+$ В-лимфоцитов (S под кривой 0,442; $p=0,340$) и $CD19^+IgD^-CD27^+$ (S под кривой 0,472; $p=0,645$) В-лимфоцитов памяти показал их низкую прогностическую значимость.

Обсуждение

Как было отмечено ранее, для реципиентов с ранней дисфункцией почечного трансплантата характерен низкий уровень как относительного, так и абсолютного значения наивных

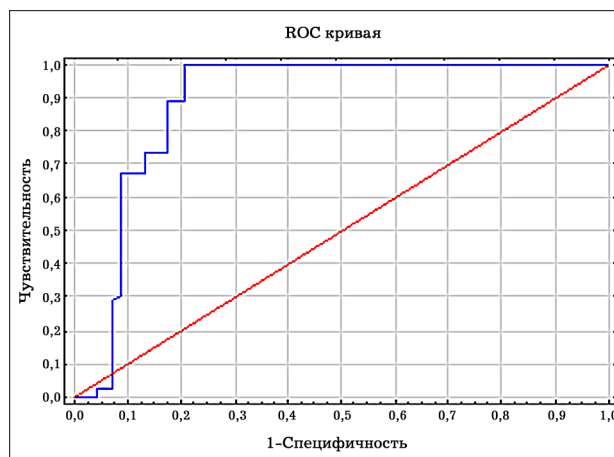


Рис. 6. Диагностические характеристики относительного уровня $CD19^+IgD^-CD27^+$ В-лимфоцитов при прогнозировании дисфункции почечного аллотрансплантата

Fig. 6. Diagnostic characteristics of the relative level of $CD19^+IgD^-CD27^+$ B-lymphocytes in predicting renal allograft dysfunction

($CD19^+IgD^+CD27^-$) В-лимфоцитов, что согласуется с данными некоторых авторов, указывающих на уменьшение относительного количества наивных В-лимфоцитов в периферической крови при некоторых аутоиммунных заболеваниях [8, 10–13]. Кроме того, нами выявлены хорошие предикативные характеристики повышенных уровней $CD19^+IgD^+CD27^+$ В-лимфоцитов и $CD19^+IgD^-CD27^+$ В-лимфоцитов памяти на 3-и посттрансплантационные сутки при прогнозировании развития дисфункции почечного трансплантата.

По наши данным, если в показателях непереключенных $CD19^+IgD^+CD27^+$ В-лимфоцитов памяти с первых суток и на протяжении первых 7 суток выявлено статистически значимое преобладание в группе с ДФТ, то по уровню переключенных $CD19^+IgD^-CD27^+$ В-лимфоцитов памяти схожие изменения выявлены только с 3-х посттрансплантационных

суток. Таким образом, увеличение относительного уровня субпопуляции В-лимфоцитов памяти на 3-и сутки после операции позволяет прогнозировать развитие ранней дисфункции почечного трансплантата. Данные изменения гомеостаза В-лимфоцитов периферической крови отражают потерю иммунологической толерантности, на что указывают некоторые исследователи [14, 15]. Кроме того, о роли в формировании толерантности сообщали и рабочие группы, изучающие иммунологическую толерантность, такие как Immune Tolerance Network (ITN) и EU Indices of Tolerance. По результатам их исследования было показано, что иммунологически устойчивые пациенты имеют увеличение числа наивных В-клеток [16].

В исследованиях Т. Matsushita выявлено, что раннее ингибирование наивных и переключенных В-лимфоцитов способствовало более тяжелому течению аутоиммунной патологии, а именно экспериментального аутоиммунного менингоэнцефалита. В экспериментальной группе мышей наблюдали раннюю манифестацию заболевания с более выраженным парезом конечностей, и 14% особей потребовалась эвтаназия, в то время как в контрольной группе все животные остались живы [17].

Таким образом, популяция В-лимфоцитов играет важную роль в формировании иммунологической толерантности, а дальнейшее изучение их уровня и клинико-лабораторных параллелей у реципиентов почечного трансплантата в позднем послеоперационном периоде имеет значение в разработке новых подходов к иммунологическому мониторингу данной группы пациентов.

Выводы

1. Прогностически благоприятным вариантом динамики переключенных ($CD19^+IgD^-CD27^+$) лимфоцитов является снижение их относительного уровня в крови в ответ на проводимую иммуносупрессивную терапию с 16,54% [11,45;20,76] до 15,85% [9,81;21,48] ($p_{1,30ПФТ}=0,047$), его заметный рост для $CD19^+IgD^+CD27^+$ непереключенных В-лимфоцитов памяти – с 7,52% [6,00;8,63] до 12,61% [11,24;14,60] ($p_{1,30ПФТ}<0,0001$) с 1-х по 30-е посттрансплантационные сутки.

2. Иммунологические особенности при дисфункции почечного трансплантата характеризуются существенным ростом относительного содержания в крови субпопуляции $CD19^+IgD^-CD27^+$ лимфоцитов – с 8,86% [6,65;10,41] до 13,97% [12,30;16,43] ($p_{1,30ДФТ}<0,0001$), его значительным снижением для $CD19^+IgD^+CD27^+$ В-лимфоцитов – с 30,05% [17,41;37,50] до 12,01% [10,82;13,21] ($p_{1,30ДФТ}<0,0001$) с 1-х по 30-е посттрансплантационные сутки.

3. При уровне $CD19^+IgD^+CD27^+$ непереключенных В-лимфоцитов памяти, более либо равным значению 11,77% с чувствительностью 88,40% и специфичностью 84,30%, возможно прогнозирование развития ранней дисфункции почечного трансплантата.

4. При значении уровня $CD19^+IgD^-CD27^+$ переключенных В-лимфоцитов памяти, более либо равным значению 20,74%, можно прогнозировать развитие ранней дисфункции почечного трансплантата с чувствительностью 88,70% и специфичностью 82,40%.

Список литературы / References

1. Silva HM, Takenaka MC, Moraes-Vieira PM, Monteiro SM, Hernandez MO, Chaara W, et al. Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol Med*. 2012;18(1):733–743. PMID: 22252714 <https://doi.org/10.2119/mol-med.2011.00281>
2. Samitas K, Lötvall J, Bossios A. B cells: from early development to regulating allergic diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2010;58(3):209–225. PMID: 20458549 <https://doi.org/10.1007/s00005-010-0073-2>
3. Vaughan AT, Roghanian A, Cragg MS. B cells-masters of the immunoverse. *Int J Biochem Cell Biol*. 2011;43(3):280–285. PMID: 21147251 <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.12.005>
4. Sims GP, Ettinger R, Shirota Y, Yarbboro CH, Illei GG, Lipsky PE. Identification and characterization of circulating human transitional B cells. *Blood*. 2005;105(11):4390–4398. PMID: 15701725 <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4284>
5. Wortel CM, Heidt S. Regulatory B cells: Phenotype, function and role in transplantation. *Transpl Immunol*. 2017;41:1–9. PMID: 28257995 <https://doi.org/10.1016/j.trim.2017.02.004>
6. Lindenau S, Scholze S, Odendahl M, Dörner T, Radbruch A, Burmester GR, et al. Aberrant activation of B cells in patients with rheumatoid arthritis. *Ann NY Acad Sci*. 2003;987:246–248. PMID: 12727646 <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb06055.x>
7. Brezinschek HP, Rainer F, Brickmann K, Graninger WB. B lymphocyte-typing for prediction of clinical response to rituximab. *Arthritis Res Ther*. 2012;14(4):R161. PMID: 22770118 <https://doi.org/10.1186/ar3901>
8. Зыблева С.В., Зыблев С.Л., Мартинков В.Н. Показатели субпопуляционного состава лимфоцитов для прогноза дисфункции почечного аллотрансплантата. *Трансплантология*. 2020;12(3):189–198. Zybleva SV, Zyblev SL, Martinkov VN. Studying some lymphocyte subpopulations in search for predictors of renal graft dysfunction. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2020;12(3):189–198. (In Russ.). <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2020-12-3-189-198>
9. 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>
10. Sellam J, Rouanet S, Hendel-Chavez H, Abbed K, Sibilia J, Tebib J, et al. Blood memory B cells are disturbed and predict the response to rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 2011;63(12):3692–3701. PMID: 22127692 <https://doi.org/10.1002/art.30599>
11. Anolik JH, Barnard J, Cappione A, Pugh-Bernard AE, Felgar RE, Looney RJ, et al. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50(11):3580–3590. PMID: 15529346 <https://doi.org/10.1002/art.20592>
12. Jacobi AM, Reiter K, Mackay M, Aranow C, Hiepe F, Radbruch A, et al. Activated memory B cell subsets correlate with disease activity in systemic lupus erythematosus: delineation by expression of CD27, IgD, and CD95. *Arthritis Rheum*. 2008;58(6):1762–1773. PMID: 18512812 <https://doi.org/10.1002/art.23498>
13. Супоницкая Е.В., Алексанкин А.П., Александрова Е.Н., Авдеева А.С., Панасидина Т.А., Верижникова Ж.Г. и др. Определение субпопуляций В-лимфоцитов периферической крови методом проточной цитофлуориметрии у здоровых лиц и больных ревматическими заболеваниями. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015;60(6):30–33. Suponitskaia EV, Aleksankin AP, Aleksandrova EN, Avdeeva AS, Panafidina TA, Verijnikova JG, et al. The identification of subpopulations of B-lymphocytes of peripheral blood using technique of flow cytometry in healthy individuals and patients with rheumatoid diseases. *Klinicheskaya Laboratornaia Diagnostika*. 2015;60(6):30–33. (In Russ.).
14. Adlowitz DG, Barnard J, Biear JN, Cistrone C, Owen T, Wang W, et al. Expansion of activated peripheral blood memory b cells in rheumatoid arthritis, impact of b cell depletion therapy, and biomarkers of response. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128269. PMID: 26047509 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128269>
15. Miller ML, Chong AS, Alegre ML. Mechanisms underlying transplantation tolerance. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier; 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00127-6>
16. Turka LA, Lechler RI. Towards the identification of biomarkers of transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(7):521–526. PMID: 19483711 <https://doi.org/10.1038/nri2568>
17. Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest*. 2008;118(10):3420–3430. PMID: 18802481 <https://doi.org/10.1172/JCI36030>

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>
55% – разработка концепции и дизайна исследования, сбор материала, статистическая обработка данных, анализ полученных данных, написание и редактирование текста рукописи

**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>
45% – сбор материала, анализ полученных данных, написание и редактирование текста рукописи

Information about the authors

Svetlana V. Zybleva

Cand. Sci. (Med.), Immunologist, Academic Secretary, Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, <https://orcid.org/0000-0003-3061-5324>
55%, development of the study concept and design, collection of material, statistical data processing, analysis of the data obtained, writing and editing the text of the manuscript

Sergey L. Zyblev

Cand. Sci. (Med.), Associate Professor, Surgeon of Transplantation, Endocrine and Reconstructive Surgery Department, Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, <https://orcid.org/0000-0002-0968-6630>
45%, collection of material, analyzing the data obtained, writing and editing the text of the manuscript

Статья поступила в редакцию 23.02.2021;
одобрена после рецензирования 18.03.2021;
принята к публикации 31.03.2021

The article was received on February 23, 2021;
approved after reviewing March 18, 2021;
accepted for publication March 31, 2021