

DOI:10.23873/2074-0506-2018-10-3-207-216

## Эффекторные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты и дендритные клетки – неинвазивные биомаркеры позднего клеточного отторжения при трансплантации почки

А.В. Носик<sup>1</sup>, С.В. Коротков<sup>1,2</sup>, В.В. Смольникова<sup>2</sup>, В.Ю. Гриневич<sup>2</sup>, Д.Ю. Ефимов<sup>1,2</sup>,  
М.В. Дмитриева<sup>3</sup>, А.А. Сыантович<sup>3</sup>, А.А. Долголикова<sup>2</sup>, О.В. Калачик<sup>1,2</sup>, С.И. Кривенко<sup>2</sup>,  
И.И. Пикиреня<sup>1</sup>, А.М. Дзядзько<sup>1,2</sup>, А.Е. Щерба<sup>1,2</sup>, О.О. Руммо<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»,  
220013, Республика Беларусь, Минск, ул. П. Бровки, д. 3, корп. 3,

Кафедра трансплантологии,  
220045, Республика Беларусь, Минск, ул. Семашко, д. 8;

<sup>2</sup> ГУ «МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии»,  
220045, Республика Беларусь, Минск, ул. Семашко, д. 8;

<sup>3</sup> УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро»,  
220045, Республика Беларусь, Минск, ул. Семашко, д. 8, корп. 8

Контактная информация: Александр Викторович Носик, очный аспирант кафедры трансплантологии  
Белорусской медицинской академии последипломного образования, врач-хирург  
отделения трансплантации МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии,  
e-mail: doctornosik@gmail.com

Дата поступления статьи: 30.05.2018

Принята в печать: 25.06.2018

**Введение.** Диагностика реакции клеточного отторжения почечного аллографта в отдаленном периоде после трансплантации остается сложной задачей. Используемые суррогатные маркеры недостаточно чувствительны и специфичны. Реакция отторжения – это иммунный ответ на аллоантигены донора. Применение пункционной биопсии почки для диагностики дисфункции почечного трансплантата является инвазивной процедурой, частота осложнений после которой достигает 12,6% и может привести к потере трансплантата. В этой связи использование методов иммуномониторинга для поиска биомаркеров, которые бы позволили осуществлять раннюю неинвазивную и точную диагностику отторжения в трансплантате почки, представляется актуальным.

**Материал и методы.** Проведено обсервационное, ретроспективное, одноцентровое, аналитическое, сравнительное в двух группах исследование по типу «случай-контроль» (44 пациента). Участники были разделены на две группы в зависимости от клинического течения посттрансплантационного периода. В первую группу вошли пациенты с гистологически подтвержденным поздним клеточным отторжением трансплантата и формированием хронической трансплантационной дисфункции (22 больных). Вторую группу составили реципиенты со стабильной функцией трансплантата, которые получали стандартную трехкомпонентную иммуносупрессивную терапию (22 пациента). В качестве метода оценки иммунного статуса реципиентов использована проточная цитофлуориметрия с установлением фенотипа лейкоцитов периферической крови (определяли субпопуляционный состав Т-, В-лимфоцитов и дендритных клеток).

**Результаты.** В группах исследования выявлены статистически значимые отличия в абсолютной численности субпопуляций эффекторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти, что составило в первой группе 0,147 (0,115–0,260) × 10<sup>9</sup> кл./л, а во второй – 0,106 (0,067–0,136) × 10<sup>9</sup> кл./л (p = 0,0167), относительной и абсолютной численности миелоидных дендритных клеток, что составило 0,65 (0,36–0,73) vs 1,05 (0,67–1,4) % и 0,039 (0,028–0,056) vs 0,063 (0,049–0,076) × 10<sup>9</sup> кл./л соответственно (p = 0,0009, p = 0,003), а также относительной и абсолютной численности плазмоцитоидных дендритных клеток – 0,055 (0,04–0,085) vs 0,09 (0,05–0,12) % и 0,0038 (0,0021–0,0054) vs 0,005 (0,0035–0,007) × 10<sup>9</sup> кл./л соответственно (p = 0,0197, p = 0,0414).

**Заключение.** Полученные данные показали, что уровень в крови дендритных клеток, являющихся основными «профессиональными» инициаторами иммунного ответа, и уровень хелперных эффекторных Т-клеток памяти, которые составляют главную субпопуляцию лимфоцитов, деструктивно воздействующих на ткани трансплантата почки, могут обоснованно считаться диагностическими маркерами реакции отторжения трансплантата почки в отдаленные сроки после операции.

**Ключевые слова:** трансплантация почки, отторжение, иммуномониторинг

Носик А.В., Коротков С.В., Смольникова В.В. и др. Эффекторные CD4<sup>+</sup> Т-лимфоциты и дендритные клетки – неинвазивные биомаркеры позднего клеточного отторжения при трансплантации почки. Трансплантология. 2018;10(3):207–216. DOI:10.23873/2074-0506-2018-10-3-207-216

## Effector memory CD4<sup>+</sup> T-cells and dendritic cells are noninvasive biomarkers of late cellular rejection after kidney transplantation

A.V. Nosik<sup>1</sup>, S.V. Korotkov<sup>1,2</sup>, V.V. Smol'nikova<sup>2</sup>, V.YU. Grinevich<sup>2</sup>, D.Yu. Efimov<sup>1,2</sup>,  
M.V. Dmitrieva<sup>3</sup>, A.A. Syantovich<sup>3</sup>, A.A. Dolgolikova<sup>2</sup>, O.V. Kalachik<sup>1,2</sup>, S.I. Krivenko<sup>2</sup>,  
I.I. Pikirenya<sup>1</sup>, A.M. Dzyadz'ko<sup>1,2</sup>, A.E. Scherba<sup>1,2</sup>, O.O. Rummo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education,  
3 Bldg. 3 P. Brovki St., Minsk 220013 Republic of Belarus,  
Department of Transplantology,  
8 Semashko St., Minsk 220045 Republic of Belarus;

<sup>2</sup> Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantation and Hematology,  
8 Semashko St., Minsk 220045 Republic of Belarus;

<sup>3</sup> City Clinical Pathologoanatomic Bureau,  
8 Bldg. 8 Semashko St., Minsk 220045 Republic of Belarus

Correspondence to: Aleksandr V. Nosik, Postgraduate at the Department of Transplantology,  
the Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Surgeon of Transplantation Department  
at Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantation and Hematology,  
e-mail: doctornosik@gmail.com

Received: 30 May 2018

Accepted for publication: 25 June 2018

**Introduction.** Diagnosis of the kidney transplant cellular rejection in the long-term after transplantation remains a challenge. Usual surrogate markers are not enough sensitive and specific. Rejection is an immune reaction to donor alloantigens. The kidney transplant biopsy to diagnose a dysfunction is an invasive procedure with the incidence of complications about 12.6% and can lead to transplant loss. In this regard, the search of immunological biomarkers for early noninvasive and accurate diagnosis of kidney transplant rejection is an actual task.

**Material and methods.** This is a report of the observational retrospective single-center, comparative case-control study in two groups involving 44 patients who underwent kidney transplantation. The first group (REJ) included the patients with the chronic graft dysfunction caused by a biopsy-confirmed late cellular rejection (22 patients). The second group (STA) included the recipients who had no dysfunction in the posttransplant period (22 patients). Flow cytometry of peripheral blood cells was performed to identify immunophenotyping markers of late cellular rejection after kidney transplantation (we determined subpopulations of T, B lymphocytes, and dendritic cells).

**Results.** As a result of our work, we found significant differences in the absolute count of effector memory T cells making  $0.147 (0.115-0.260) \times 10^9$  cell/L in REJ group, and  $0.106 (0.067-0.136) \times 10^9$  cell/L in STA group ( $p = 0.0167$ ). Relative and absolute counts of myeloid dendritic cells were also different between the groups: 0.65 (0.36–0.73) vs. 1.05 (0.67–1.4) % and 0.039 (0.028–0.056) vs. 0.063 (0.049–0.076)  $\times 10^9$  cell/L, respectively ( $p = 0.0009$ ,  $p = 0.003$ ). The numbers of plasmacytoid dendritic cells were also different between the study groups: 0.0038 (0.0021–0.0054) vs. 0.005 (0.0035–0.007)  $\times 10^9$  cell/L for an absolute count ( $p = 0.0414$ ), and 0.055 (0.04–0.085) vs. 0.09 (0.05–0.12) % for a relative count ( $p = 0.0197$ ).

**Conclusion.** The obtained data showed that the blood level of dendritic cells, which are the main “professional” initiators of immune reaction, and the level of effector helper T memory cells, which constitute the main lymphocyte subpopulation posing a destructive impact on the kidney transplant, can be considered as diagnostic markers of kidney transplant cellular rejection in the long-term after surgery.

**Keywords:** kidney transplantation, rejection, immune monitoring

Nosik A.V., Korotkov S.V., Smol'nikova V.V., et al. Effector memory CD4<sup>+</sup> T-cells and dendritic cells are noninvasive biomarkers of late cellular rejection after kidney transplantation. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2018;10(3):207–216. (In Russian). DOI:10.23873/2074-0506-2017-10-3-207-216

ИКК – иммунокомпетентные клетки  
ИТ – иммуносупрессивная терапия  
мДк – миелоидные дендритные клетки  
пДк – плазматоидные дендритные клетки  
ТП – трансплантация почки  
ЦФМ – цитофлуориметрия

HLA – главный комплекс гистосовместимости  
PRA – панель реактивных антител  
U-критерий – критерий Манна–Уитни  
REJ – основная группа исследования  
STA – группа сравнения

### Введение

В настоящее время трансплантация почки (ТП) является оптимальным методом заместительной почечной терапии. Почечный трансплантат не только улучшает качество жизни пациентов с хронической почечной недостаточностью, но и значительно увеличивает сроки их выживаемости. Kaballo et al. показали, что 5-летний риск смерти больных после трансплантации почки на 47% ниже, чем у пациентов, находящихся на заместительной почечной терапии [1].

Одним из наиболее значимых факторов, влияющих на результаты трансплантации, является реакция отторжения почечного аллографта. Несмотря на иммуносупрессивную терапию (ИТ), частота развития острой реакции отторжения в раннем посттрансплантационном периоде составляет около 10%. Клеточное отторжение трансплантата почки в позднем постоперационном периоде (свыше 1 года) встречается еще чаще, развивается у 35% пациентов и классифицируется, по данным Nair et al., как позднее клеточное отторжение [2]. Развитие позднего клеточного отторжения приводит к хронизации иммунологических процессов в почечном трансплантате и является одной из причин потери его функции [3].

В настоящее время «золотым стандартом» диагностики реакции отторжения трансплантата почки служит пункционная биопсия. Однако данная процедура является инвазивной и связана с риском развития осложнений, которые, по данным литературы, встречаются с частотой от 5,2 до 12,56%, что может в 0,25% наблюдений привести к потере аллографта [4]. Применяемые традиционные лабораторные маркеры диагностики функции почек, а также показатели ультразвукового исследования трансплантата не обладают достаточной чувствительностью и специфичностью.

Перспективным направлением в неинвазивной диагностике реакции отторжения при ТП является проточная цитофлуориметрия (ЦФМ). Использование данного метода позволяет одновременно количественно оценивать численность практически всех субпопуляций лейкоцитов периферической крови. Однако в настоящее время не выделены фенотипические биомаркеры, которые бы достоверно отражали иммунологические процессы в трансплантате, и не разработаны протоколы по клиническому применению ЦФМ в качестве метода диагностики реакции отторжения почечного аллографта.

В этой связи целью нашей работы явились изучение субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови пациентов после ТП и разработка ЦФМ-критериев диагностики позднего клеточного отторжения.

### Материал и методы

Проведено обсервационное, ретроспективное, одноцентровое, аналитическое, сравнительное в двух группах исследование по типу «случай-контроль», включившее 44 реципиента трансплантата почки, которых наблюдали в РНПЦ трансплантации органов и тканей на базе УЗ «9-я ГКБ» (в настоящее время ГУ «МНПЦ хирургии, трансплантологии и гематологии») (Минск). Пациентам была выполнена ТП от донора со смертью мозга в период с 2004 по 2013 г.

Критериями включения больных в исследование явились: реципиенты после трансплантации только почечного аллографта; трансплантация от донора со смертью мозга; период наблюдения не менее 4 лет; возраст реципиентов от 18 до 70 лет; наличие на момент исследования почечного трансплантата; прием ИТ; возможность получить информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: высокий риск иммунных осложнений на момент трансплантации (отсутствие совпадений по антигенам гистосовместимости (HLA) в паре донор-реципиент; панель реактивных антител (PRA) сыворотки реципиента > 15%); инфекционные осложнения и онкологические заболевания.

Группы исследования формировались исходя из характера течения посттрансплантационного периода и результатов гистологического исследования почечного трансплантата.

Основную группу исследования (REJ) составили 22 реципиента с хронической посттрансплантационной дисфункцией вследствие позднего клеточного отторжения. Развитие позднего клеточного отторжения трансплантата почки происходило как после острого криза отторжения аллографта – у 9 пациентов (40,9%) из 22, так и без предшествующей острой дисфункции трансплантата на фоне медленно прогрессирующего хронического повреждения – у 13 (59,1%). Позднее клеточное отторжение трансплантата почки было подтверждено гистологическим исследованием и оценкой изменений в соответствии с Международной стандартизированной классификацией Banff. Других причин хронической трансплантационной дисфункции при гисто-

логическом исследовании у пациентов данной группы выявлено не было.

В группу сравнения (СТА) вошли 22 реципиента, посттрансплантационный период у которых характеризовался отсутствием дисфункции трансплантата почки. Группа формировалась методом случайных чисел.

Среди 44 участников исследования было мужчин – 21 (47,7%), женщин – 23 (52,3%) (табл. 1). Медиана возраста участников исследования составила 49 (39,5–55,5) лет. Превалирующей патологией, приведшей к терминальной стадии хронической болезни почек, явился хронический гломерулонефрит – у 34 больных (77,3%) из 44. В качестве заместительной почечной терапии до трансплантации гемодиализ получали 38 реципиентов (86,4%) из 44. Длительность нахождения на диализотерапии составила в среднем 71,8 (39–105) месяца. Срок консервации трансплантата не превышал 24 часов и составил в среднем 8,5 (6,75–10) часа. Пары донор-реципиент чаще всего совпадали по двум антигенам гистосовместимости I класса (HLA) – 21 участник (47,7%) из 44 пациентов. Уровень предсуществующих антител при подсчете PRA на момент включения в исследование не превышал 15%. Предсуществующие антитела на момент трансплантации были выявлены у 7 участников (15,9%) исследования.

ИТ была стандартной, не различалась у участников всех групп и проводилась согласно клиническому протоколу ведения пациентов после ТП (см. табл. 1).

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом существующего в то время УЗ «9-я ГКБ» (Минск). Все пациенты дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Всем больным проводили ЦФМ-анализ с подсчетом абсолютной и относительной численности субпопуляций лейкоцитов периферической крови.

Имунофенотип клеток периферической крови определяли методом восьмицветной проточной ЦФМ на проточном цитофлюориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США), оснащенном тремя лазерами (488 нм, 633 нм, 405 нм). Данные анализировали с помощью компьютерной программы FACSDiva версии 6.

Для определения численности субпопуляций лейкоцитов 100 мкл периферической крови инкубировали с соответствующими моноклональными антителами в объеме согласно прописи фирмы-производителя в течение 15 минут при 4 °С. Затем эритроциты лизировали раство-

ром хлорида аммония в течение 10 минут при 4 °С. Далее клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при скорости 1500 об./мин. Супернатант удаляли, клетки суспендировали в 200 мкл фосфатно-буферного раствора. Для дальнейшего анализа клетки загружали в объеме: не менее 10 000 событий – в регион Т-лимфоцитов; не менее 500 событий – в регион дендритных клеток и не менее 3000 событий – в регион В-лимфоцитов.

Для выявления иммунофенотипа дендритных клеток, натуральных киллеров, Т- и В-лимфоцитов использовали следующие моноклональные антитела: CD45-PerCP (ExBio, Чехия), CD45RA-FITC (Beckman Coulter, США), CD62L-PE (Beckman Coulter, США), CD127-PC7 (Beckman Coulter, США), CD25-APC (Beckman Coulter, США), CD4-APC-Cy7 (ExBio, Чехия), CD3-Pacific Blue (Beckman Coulter, США), CD8-Krome Orange (Beckman Coulter, США), CD11c-PE (ExBio, Чехия), CD123-PC7 (Beckman Coulter, США), CD56-APC (ExBio, Чехия), CD19-APC-Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, США), HLA-DR-Krome Orange (Beckman Coulter, США), CD38-FITC (Beckman Coulter, США), IgD-PE (Becton Dickinson, США), CD27-PC7 (Beckman Coulter, США), CD5-APC (Beckman Coulter, США) и IgM-Pacific Blue (Beckman Coulter, США).

Гейтирование основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток (ИКК) проводили в соответствии с разработанным и стандартизированным протоколом.

Для статистического анализа количественных данных в группах использовали критерий Манна–Уитни (U-критерий). Результаты сравнения количественных данных представлены как REJ Медиана (1-й квартиль; 3-й квартиль) vs СТА (1-й квартиль; 3-й квартиль), уровень значимости различий. Для сравнения качественных данных в группах исследования использовали критерий  $\chi^2$ . Результаты сравнения качественных данных представлены как REJ Абсолютная частота (Процент) vs СТА Абсолютная частота (Процент), уровень значимости различий. Корреляционную связь между количественными типами данных устанавливали при помощи критерия Спирмена, между качественными – критерия ассоциации. Корреляцию между качественными и количественными данными оценивали при помощи рангово-бисериального критерия. Уровень статистической значимости полученных результатов принят как  $p \leq 0,05$ .

## ПРОБЛЕМНЫЕ АСПЕКТЫ

## PROBLEMATIC ASPECTS

**Таблица 1. Сравнение демографических и клинических характеристик в группах исследования**  
**Table 1. Comparison of demographic and clinical characteristics between the study groups**

Характеристика	REJ	STA	Уровень значимости
<b>Пол</b>			
мужской	12 (54,5%)	9/22 (40,9%)	p = 0,365
женский	10 (45,5%)	13/22 (59,1%)	
Возраст, годы	47,5 (35–56)	49 (43–55)	p = 0,622
<b>Патология</b>			
хронический гломерулонефрит	18 (81,8%)	17 (77,3%)	p = 0,73
врожденная аномалия мочевыводящих путей	1 (4,55%)	1 (4,55%)	
поликистозная болезнь	1 (4,55%)	1 (4,55%)	
сахарный диабет	1 (4,55%)	3 (13,6%)	
генетическая патология	1 (4,55%)	0 (0%)	
<b>Совместимость по HLA</b>			
≤ 3 несовпадений	18 (81,8%)	19 (86,4%)	p = 0,68
> 3 несовпадений	4 (18,2%)	3 (13,6%)	
PRA на момент трансплантации	4 (18,2%)	3 (13,6%)	p = 0,679
Длительность диализотерапии, месяцы	70 (46–107,5)	60 (17–86)	p = 0,336
Длительность холодовой ишемии, часы	8,75 (7–10)	7,5 (6,5–20)	p = 0,411
<b>Индукционная ИТ</b>			
антилимфоцитарный глобулин	9 (40,9%)	14 (63,6%)	p = 0,13
базиликсимаб	13 (59,1%)	8 (36,4%)	
<b>Ингибитор кальциневрина</b>			
циклоsporин А, мг/сут	150 (100–175)	150 (125–150)	p = 0,472
концентрация циклоsporина, нг/мл	76 (63,1–83)	70,1 (63,7–87)	p = 0,87
такролимус, мг/сут	4 (2–5)	3 (2,5–3)	p = 0,344
концентрация такролимуса, нг/мл	5,2 (4,95–5,9)	5,8 (5,18–5,95)	p = 0,7
<b>Антиметаболит</b>			
микофеноловая кислота, мг/сут	1000 (1000–2000)	1000 (1000–1000)	p = 0,66
азатиоприн, мг/сут	100 (75–100)	100 (100–100)	p = 0,264
<b>Глюкокортикостероиды</b>			
метилпреднизолон, мг/сут	4 (2–4)	2 (2–4)	p = 0,378
<b>Функция трансплантата</b>			
первичная дисфункция графта	12 (54,5%)	2 (9%)	p = 0,0014
сывороточный креатинин мкмоль/л	163 (101–218)	76,4 (65–93)	p < 0,01
разовая протеинурия, г/л	0,315 (0,046–0,789)	0,046 (0–0,186)	p < 0,01
скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	46,9 (27–75,4)	82 (70–98)	p < 0,01

Примечание: результаты представлены как медиана (1-й квартиль; 3-й квартиль)

### Результаты

*Характеристика участников исследования*  
 Среди 22 участников исследования острая дисфункция трансплантата в отдаленном пери-

оде возникла у 9 реципиентов (40,9%). При этом развитие острого криза отторжения ассоциировалось с формированием хронической трансплантационной дисфункции (коэффициент ассоциации – 0,65). Анализ результатов пункционных

биопсий трансплантатов на момент включения пациентов в исследование показал, что 1А степень отторжения по классификации Banff была выявлена у 13 реципиентов (59,1%) из 22, 1В степень – у 2 (9%), а 2А степень – у 3 (13,6%). Первичное формирование хронических процессов отторжения трансплантата почки отмечено у 4 больных (18,3%) группы REJ.

Статистический анализ результатов показал, что клинические факторы не влияли на частоту развития иммунологической дисфункции трансплантата почки. Была выявлена сильная корреляция между реакцией отторжения и первичной дисфункцией аллогraftа. Связи между степенью гистологически подтвержденного отторжения почечного аллогraftа и численностью субпопуляций ИКК выявлено не было.

#### Результаты цитофлуориметрического исследования

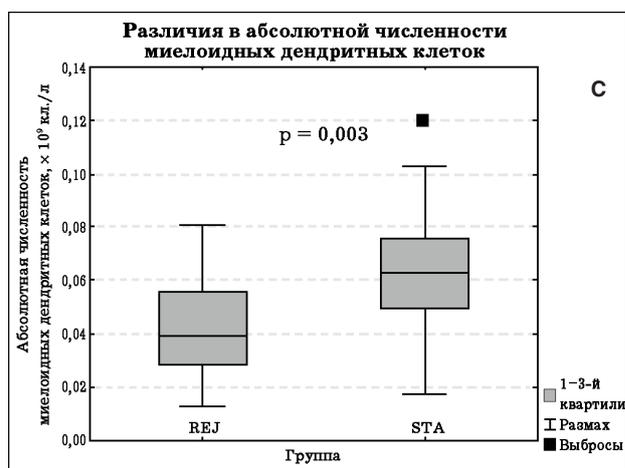
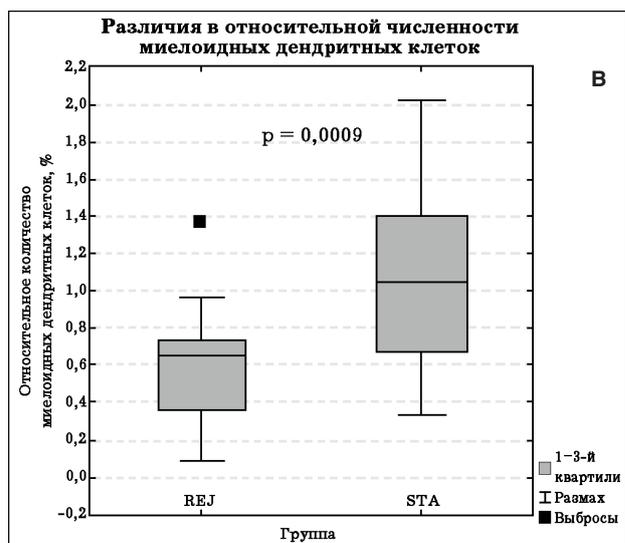
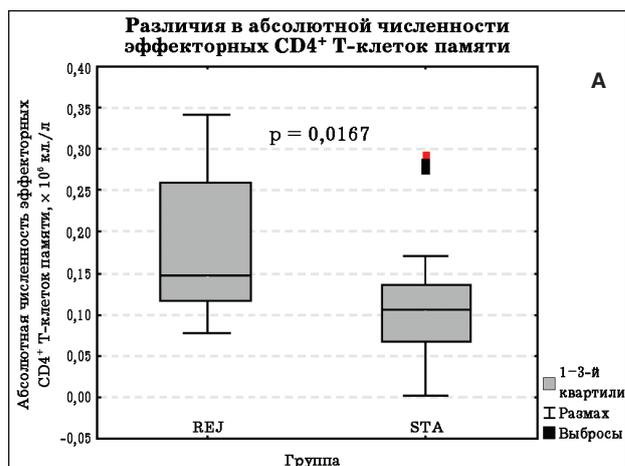
Как показали результаты ЦФМ (табл. 2), были выявлены статистически значимые различия в абсолютной численности  $CD4^+$  эффекторных Т-клеток памяти – 0,147 (0,115–0,260) vs 0,106 (0,067–0,136)  $\times 10^9$  кл./л;  $p = 0,0167$  (рис. 1А).

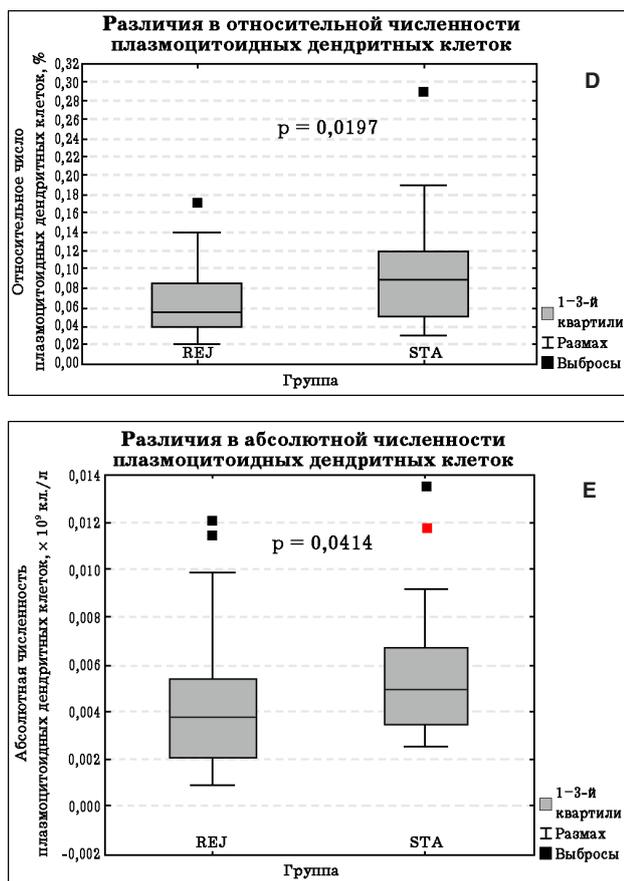
Значимые различия в группах REJ и STA также были получены в численности миелоидных и плазмоцитоидных дендритных клеток (мДк и пДк). Так, относительная численность мДк была меньше в группе с гистологически подтвержденным иммунным конфликтом и составила 0,65 (0,36–0,73) vs 1,05 (0,67–1,4) %;  $p = 0,0009$ . Соответственно, абсолютное количество мДк периферической крови в группах было 0,039 (0,028–0,056) vs 0,063 (0,049–0,076)  $\times 10^9$  кл./л;  $p = 0,003$  (рис. 1В, С).

Снижение численности пДк также было выявлено в группе реципиентов с осложненным течением посттрансплантационного периода. Процентное количество пДк в группах REJ и STA составило 0,055 (0,04–0,085) vs 0,09 (0,05–0,12) %;  $p = 0,0197$ . Абсолютная численность пДк была 0,0038 (0,0021–0,0054) vs 0,005 (0,0035–0,0068)  $\times 10^9$  кл./л;  $p = 0,0414$  (рис. 1D, E).

Проведенный анализ не выявил тенденций в различии численности оставшихся субпопуляций Т-лимфоцитов, а также в численности субпопуляций В-лимфоцитов и натуральных киллеров (табл. 2).

Таким образом, табл. 2 демонстрирует, что среди изучаемых субпопуляций лимфоцитов в группах исследования статистически значимо





**Рис. 1.** Различия в субпопуляциях иммунокомпетентных клеток в группах исследования: А – более высокая абсолютная численность эффекторных хелперных Т-клеток памяти в группе пациентов с отторжением трансплантата почки; В и С – более низкие относительная и абсолютная численности миелоидных дендритных клеток в группе с иммунным конфликтом; D и E – сниженная относительная и абсолютная численности плазмоцитOIDных дендритных клеток в основной группе исследования

**Fig. 1.** Differences in subpopulations of immunocompetent cells between the study groups: A, a higher absolute count of effector helper memory T cells in the group of patients with the kidney transplant rejection; B and C, lower relative and absolute counts of myeloid dendritic cells in the group with an immune conflict; D and E, decreased relative and absolute counts of plasmacytoid dendritic cells in the main study group

различались численности эффекторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти, а также мДк и пДк.

### Обсуждение

Результаты исследования показали, что увеличение уровня эффекторных CD4<sup>+</sup> Т-клеток памяти и снижение количества мДк в крови у реципиентов почечного трансплантата являются

статистически значимыми неинвазивными маркерами позднего клеточного отторжения.

Мы полагаем, что полученные нами данные не случайны и объясняются ролью Т-лимфоцитов и мДк в иммунном ответе на аллоантигены.

Так, эффекторные CD4<sup>+</sup> Т-клетки памяти служат одними из главных компонентов активной иммунологической памяти, которые осуществляют поддержку активации и пролиферации донор-специфических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов и В-клеток, в свою очередь являющихся главным субстратом отторжения трансплантата [5]. Повышение численности данной субпопуляции Т-лимфоцитов в крови, вероятнее всего, связано с усилением иммунного ответа на аллоантигены трансплантата, в результате чего развиваются его отторжение и дисфункция.

Дендритные клетки – также одни из основных инициаторов иммунного ответа, обеспечивающие захват, процессинг и представление антигена Т-лимфоцитам. В системе трансплантационного иммунитета взаимодействие CD4<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с мДк является основным пусковым механизмом Т-клеточного ответа. Снижение численности мДк периферической крови связано с их миграцией в очаг воспаления – трансплантат [6]. Продемонстрировано, что обнаружение мДк в тканях трансплантата почки прямо коррелирует со степенью отторжения аллографта по классификации Banff. При этом плотность мДк в тканях трансплантата в период острого отторжения является независимым предиктором потери функции трансплантата в течение 1 года [6]. Дендритные клетки являются резидентной субпопуляцией, с чем, по-видимому, связано отсутствие повышения их численности в крови реципиентов с активным иммунным ответом на аллоантигены [8].

Из вышесказанного следует, что различия в иммунофенотипе лимфоцитов периферической крови, которые мы выявили между группами пациентов с нормальной функцией трансплантата и при развитии позднего клеточного отторжения в послеоперационном периоде, являются закономерными и патогенетически обоснованными.

### Заключение

Важность полученных нами результатов заключается в возможной эффективной, быстрой и неинвазивной диагностике реакции клеточного отторжения трансплантата почки у пациентов

Таблица 2. Результаты иммунофенотипирования лейкоцитов периферической крови в группах исследования  
Table 2. The results of immunophenotyping of peripheral blood leukocytes in the study groups

Субпопуляция ИКК	REJ	STA	p
Т-лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup>	1,25 (0,816–1,9)	1,35 (0,915–1,672)	0,805
Т-хелперы, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	0,297 (0,21–0,415)	0,254 (0,158–0,453)	0,581
Т-киллеры, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	0,423 (0,31–0,73)	0,4755 (0,276–0,683)	0,699
Т-регуляторные клетки, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> CD127 <sup>-</sup>	0,0124 (0,0084–0,023)	0,014 (0,0057–0,03)	0,860
«Наивные» Т-хелперы, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	0,205 (0,143–0,412)	0,2695 (0,18–0,421)	0,318
Центральные CD4 <sup>+</sup> Т-клетки памяти, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup>	0,253 (0,184–0,345)	0,248 (0,158–0,453)	0,879
Эффекторные CD4 <sup>+</sup> Т-клетки памяти, % CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup>	22,45 (18,0–28,3)	16,55 (9,5–27,3)	0,069
Эффекторные CD4 <sup>+</sup> Т-клетки памяти, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup>	0,147 (0,115–0,260)	0,106 (0,067–0,136)	0,0167
Эффекторные CD4 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>	0,009 (0,006–0,028)	0,0135 (0,006–0,027)	0,824
«Наивные» Т-киллеры, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	0,139 (0,066–0,195)	0,162 (0,087–0,25)	0,318
Центральные CD8 <sup>+</sup> Т-клетки памяти, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>+</sup>	0,029 (0,012–0,039)	0,024 (0,015–0,05)	0,991
Эффекторные CD8 <sup>+</sup> Т-клетки памяти, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD62L <sup>-</sup>	0,06 (0,043–0,089)	0,041 (0,015–0,086)	0,163
Эффекторные CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD62L <sup>-</sup>	0,197 (0,118–0,367)	0,22 (0,078–0,31)	0,392
В-лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup>	0,068 (0,047–0,086)	0,063 (0,026–0,096)	0,392
«Наивные» В-лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> 27 <sup>-</sup> IgD <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>	0,038 (0,02–0,056)	0,028 (0,011–0,064)	0,366
«Не переключенные» В-клетки памяти, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> 27 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> IgM <sup>+</sup>	0,008 (0,005–0,014)	0,0075 (0,0036–0,01)	0,392
«Переключенные» В-клетки памяти, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> 27 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> IgM <sup>-</sup>	0,012 (0,009–0,017)	0,017 (0,006–0,025)	0,565
В-регуляторные клетки, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> CD38 <sup>++</sup> CD24 <sup>++</sup> IgM <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup>	0,0002 (0,00007–0,0006)	0,0002 (0,00002–0,00065)	0,842
Плазмоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> 27 <sup>+</sup> CD38 <sup>++</sup> IgD <sup>-</sup> IgM <sup>-</sup>	0,00065 (0,0004–0,0014)	0,001 (0,0005–0,0025)	0,255
В-1а-лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> CD5 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup>	0,00076 (0,0004–0,00099)	0,001 (0,0003–0,00215)	0,286
Вм-1-лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup>	0,021 (0,014–0,032)	0,019 (0,01–0,024)	0,489
Вм-2-лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup>	0,023 (0,0115–0,042)	0,017 (0,0075–0,035)	0,286
Вм-2 <sup>-</sup> -лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> IgD <sup>+</sup> CD38 <sup>++</sup>	0,00005 (0,0–0,00019)	0,00016 (0,0–0,0004)	0,275064
еВм-5-лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>+</sup>	0,011 (0,0074–0,014)	0,01 (0,0044–0,024)	0,787210
Вм-5-лимфоциты, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD19 <sup>+</sup> IgD <sup>-</sup> CD38 <sup>-</sup>	0,0058 (0,0047–0,007)	0,006 (0,003–0,011)	0,823543
мДк, % Lin <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD123 <sup>-</sup>	0,65 (0,36–0,73)	1,05 (0,67–1,4)	0,0009
мДк, × 10 <sup>9</sup> кл./л Lin <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> CD123 <sup>-</sup>	0,039 (0,028–0,056)	0,063 (0,049–0,076)	0,003
пДк, % Lin <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>-</sup> CD123 <sup>+</sup>	0,055 (0,04–0,085)	0,09 (0,05–0,12)	0,0197
пДк, × 10 <sup>9</sup> кл./л Lin <sup>-</sup> CD14 <sup>-</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD11c <sup>-</sup> CD123 <sup>+</sup>	0,0038 (0,0021–0,0054)	0,005 (0,0035–0,007)	0,0414
Естественные киллеры, × 10 <sup>9</sup> кл./л CD 16 <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup>	0,118 (0,036–0,2)	0,059 (0,0256–0,14)	0,342

Примечание: результаты представлены как Ме (1-й квартиль; 3-й квартиль)

после пересадки почки в отдаленном периоде после операции.

Применение проточной цитофлуориметрии с определением уровня Т-лимфоцитов и дендрит-

ных клеток может быть использовано для дифференциальной диагностики дисфункции почечного аллографта без риска развития осложнений как для трансплантата, так и для пациента.

**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
**CONFLICT OF INTERESTS.** Authors declare no conflict of interest.

**ФИНАНСИРОВАНИЕ.** Исследование проводилось без спонсорской поддержки.  
**FINANCING.** The study was performed without external funding.

### Литература

1. Kaballo M.A., Canney M., O'Kelly P., et al. A comparative analysis of survival of patients on dialysis and after kidney transplantation. *Clin. Kidney J.* 2018;11(3):389–393. DOI:10.1093/ckj/sfx117
2. Nair R., Agrawal N., Lebaeau M., et al. Late Acute Kidney Transplant Rejection: Clinicopathological Correlates and Response to Corticosteroid Therapy. *Transplant. Proc.* 2009;41(10):4150–4153. PMID:20005357 DOI:10.1016/j.transproceed.2009.09.074
3. Eid L., Tuchman S., Moudgil A. Late acute rejection: Incidence, risk factors, and effect on graft survival and function. *Pediatr. Transplant.* 2014;18(2):155–162. PMID:24372967 DOI:10.1111/ptr.12203
4. Redfield R., McCune K., Rao A., et al. Nature, timing, and severity of complications from ultrasound-guided percutaneous renal transplant biopsy. *Transpl. Int.* 2016;29(2):167–172. PMID:26284692 DOI:10.1111/tri.12660
5. Benichou G., Gonzalez B., Marino J., et al. Role of Memory T Cells in Allograft Rejection and Tolerance. *Front. Immunol.* 2017;(8):170–179. PMID:28293238 DOI:10.3389/fimmu.2017.00170
6. Zuidwijk K., de Fijter J., Mallat M., et al. Increased influx of myeloid dendritic cells during acute rejection is associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy and predicts poor outcome. *Kidney Int.* 2012;81(1):64–75. PMID:21866093 DOI:10.1038/ki.2011.289

## References

1. Kaballo M.A. Canney M., O'Kelly P., et al. A comparative analysis of survival of patients on dialysis and after kidney transplantation. *Clin Kidney J.* 2018;11(3):389–393. DOI:10.1093/ckj/sfx117
2. Nair R. Agrawal N., Lebaeau M., et al. Late Acute Kidney Transplant Rejection: Clinicopathological Correlates and Response to Corticosteroid Therapy. *Transplant Proc.* 2009;41(10):4150–4153. PMID:20005357 DOI:10.1016/j.transproceed.2009.09.074
3. Eid L., Tuchman S., Moudgil A. Late acute rejection: Incidence, risk factors, and effect on graft survival and function. *Pediatr Transplant.* 2014;18(2):155–162. PMID:24372967 DOI:10.1111/petr.12203
4. Redfield R., McCune K., Rao A., et al. Nature, timing, and severity of complications from ultrasound-guided percutaneous renal transplant biopsy. *Transpl Int.* 2016;29(2):167–172. PMID:26284692 DOI:10.1111/tri.12660
5. Benichou G., Gonzalez B., Marino J., et al. Role of Memory T Cells in Allograft Rejection and Tolerance. *Front Immunol.* 2017;(8):170–179. PMID:28293238 DOI:10.3389/fimmu.2017.00170
6. Zuidwijk K., de Fijter J., Mallat M., et al. Increased influx of myeloid dendritic cells during acute rejection is associated with interstitial fibrosis and tubular atrophy and predicts poor outcome. *Kidney Int.* 2012;81(1):64–75. PMID:21866093 DOI:10.1038/ki.2011.289