

УДК 612.017.1:616.61-089.843-071

DOI: 10.14427/jipai.2019.4.6

## CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> активированные Т-хелперы и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Т-регуляторные лимфоциты у реципиентов почечного аллотрансплантата с различными вариантами течения посттрансплантационного периода

С.В. Зыблева

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

## CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> activated T cells and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> T-regulatory lymphocytes in patients after kidney transplantation with various types of post-transplantation period

S.V. Zybleva

Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

### Аннотация

**Цель.** Изучить динамику CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (активированные Т-хелперы) и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> (Т-регуляторные) субпопуляций лимфоцитов у реципиентов почечного аллотрансплантата с различными вариантами течения посттрансплантационного периода. **Методы.** Из 165 реципиентов почечного аллотрансплантата сформировано 4 группы. В первую группу (РПТ1) были включены пациенты, имеющие удовлетворительную первичную и позднюю функции почечного трансплантата, во вторую группу (РПТ2) – имеющие первичную удовлетворительную функцию и позднюю дисфункцию трансплантата, в третью группу (РПТ3) – первичную дисфункцию и позднюю удовлетворительную функцию, в четвертую группу (РПТ4) вошли пациенты с первичной и поздней дисфункцией трансплантата. Определяли количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> в крови на 0-е, 1-е, 3-и, 10-е, 30-е, 90-е, 180-е, 360-е сутки. **Результаты и обсуждение.** У пациентов до проведения трансплантации почки значимых различий количества CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> лимфоцитов с группой сравнения не выявлено. В свою очередь, количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Т-лимфоцитов в группе с наиболее благоприятным течением посттрансплантационного периода до операции было значимо ниже, чем в группе сравнения, с последующим снижением в ответ на терапию анти-CD25-антителами. Через год наблюдения произошло восстановление данного показателя до уровня группы сравнения, чего не было отмечено в других группах. В группе РПТ3 начальная функция была не удовлетворительной, но через 360 дней уровень креатинина был ниже 150 мкмоль/л, а количество регуляторной

### Summary

**Objective.** To study the dynamics of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (activated T-helper cell) and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> (regulatory T cell) lymphocytes in kidney transplant recipients (KTR) with different course of post-transplantation period. **Methods.** Out of 165 recipients of a renal allograft, 4 groups were formed. The first group (KTR1) included patients with satisfactory primary and delayed renal transplant functions, the second group (KTR2) had satisfactory primary function and delayed graft dysfunction, the third group (KTR3) included primary dysfunction and delayed satisfactory function, the fourth group (KTR4) included patients with primary and delayed transplant dysfunction. The number of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> in the blood was determined at the 0th, 1st, 3rd, 10th, 30th, 90th, 180th, 360th day. **Results and Discussion.** There were no significant differences in the number of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> lymphocytes between patients prior to kidney transplantation and the comparison group. In turn, the number of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> T-lymphocytes in the group with the most favorable post-transplant period prior to surgery was significantly lower than in the comparison group with a subsequent decrease in the response to anti-CD25 antibody therapy. After a year of observation, this indicator recovered to the level of the comparison group, which was not observed in other groups. In KTR3 group, the primary function was not satisfactory, but after 360 days the creatinine level was below 150 μmol/L, and the number of the regulatory CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> subpopulation was lower than the comparison group, but not lower than the absolute number in the group with stable satisfactory function of KTR1 transplant.

субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> было ниже группы сравнения, но не ниже чем абсолютное количество в группе со стабильно удовлетворительной функцией трансплантата РПТ1.

**Заключение.** Восстановление количества CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> лимфоцитов на 90-е сутки с сохранением стабильного уровня на протяжении года характерно для пациентов с удовлетворительной ранней и поздней функцией почечного трансплантата. В группе с первоначальной дисфункцией и поздней удовлетворительной функцией почечного трансплантата содержание регуляторной субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> имело положительную тенденцию и не имело значимых различий абсолютного количества с группой пациентов с удовлетворительной ранней и поздней функцией на 360-е сутки.

### Ключевые слова

Трансплантация почки, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> субпопуляции лимфоцитов, функция почечного трансплантата

### Введение

Достижение и поддержание долгосрочной выживаемости аллотрансплантата является основной целью при трансплантации почки. Улучшение результатов в трансплантологии достигается как снижением риска отторжения трансплантата, так и минимизацией побочных эффектов иммуносупрессивной терапии. Изучение основных толерогенных механизмов (центральных и периферических), а также Т-клеток, играющих ключевую роль в механизмах отторжения трансплантата, привело к появлению различных стратегий, включая блокаду костимуляции Т-клеток, индукцию смешанного химеризма, истощение Т-клеток и индукцию толерантности, опосредованной регуляторными Т-клетками (Tregs) [1-6].

Tregs были представлены, как Т-лимфоциты, которые могут подавлять иммунный ответ на собственные и чужеродные антигены. Существует целый ряд субпопуляций, описанных как Tregs, в том числе и так называемые «естественные циркулирующие Tregs», определяемые как субпопуляция CD4<sup>+</sup> положительных Т-клеток, экспрессирующих высокие уровни α-цепи рецептора к интерлекину-2 (CD25) и «индуцированные регуляторные CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>Т-клетки», которые развиваются на периферии из наивных CD4<sup>+</sup> Т-клеток при взаимодействии с антигенами в определенном микроокружении цитокинов, толерогенных антигенпредставляющих клеток или иммуносупрессивных лекарственных средств [7, 8]. Помимо рецепторов CD4 и CD25, Tregs характеризуются экспрессией L-селектина (CD62L), цитотоксического

**Conclusion.** The recovery of the number of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> lymphocytes on the 90th day with a stable level throughout the year is typical for patients with satisfactory primary and delayed renal transplant function. In the group with primary dysfunction and delayed satisfactory renal transplant function, the number of the regulatory subpopulation CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> had a positive tendency and there were no significant differences in the absolute number with the group of patients with satisfactory primary and delayed function on the 360th day.

### Keywords

Kidney transplantation, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> subpopulations of lymphocytes, renal transplant function

Т-лимфоцит-ассоциированного антигена-4 и глюкокортикоид-индуцированного рецептора фактора некроза опухоли (TNF), а также внутриклеточной экспрессией транскрипционного фактора forkhead box P3 (FoxP3) [9-12].

Большой интерес представляет вклад регуляторных Т-клеток в поддержание выживаемости трансплантата почки. Исследования показали, что Tregs играют центральную роль в отторжении аллотрансплантата [8]. После трансплантации, Tregs обычно обнаруживаются в лимфоидной ткани реципиента и в области трансплантата [13, 14]. Регуляторные лимфоциты в обеих указанных локализациях могут предупреждать инициализацию иммунной реакции против трансплантата.

Хотя многие экспериментальные модели предполагают определенную роль Tregs в индукции толерантности трансплантата, необходимо лучшее понимание функции, фенотипа и биологии регуляторных лимфоцитов, чтобы иметь возможность оптимально использовать различные механизмы индукции толерантности к антигенам трансплантата. Несмотря на то, что успехи в подходах к иммуносупрессивной терапии заметно увеличили краткосрочную выживаемость трансплантата, хроническая дисфункция почечного трансплантата является одной из основных причин поздней потери донорского органа [15]. Изучение информативных иммунологических маркеров, ассоциированных с развитием и прогрессированием дисфункции аллотрансплантата не только в раннем, но и позднем посттрансплантационном периоде, является актуальной задачей современной иммунологии.

## Цель

Изучить динамику CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Т- лимфоцитов у реципиентов почечного аллотрансплантата с различными вариантами течения посттрансплантационного периода.

## Методы

В исследование было включено 165 реципиентов в терминальной стадией хронической болезни почек (тХБП), Им была проведена трансплантация аллогенной почки в хирургическом отделении трансплантации ГУ РБ «РНПЦ РМиЭЧ». Период наблюдения составил 12 месяцев.

Всем пациентам проведено динамическое определение концентрации в сыворотке крови креатинина на предоперационном этапе, 7-е и 360-е сутки после трансплантации. Удовлетворительная функция почечного трансплантата через год характеризовалась уровнем креатинина в сыворотке крови не превышающим 150 мкмоль/л, отсутствием эпизодов отторжения почечного трансплантата и необходимости в диализе на первом году наблюдения [16,17].

*Критерии включения в группу:*

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 года, средний возраст (М) был 45,95±0,94 [44,9; 47,81] лет. До трансплантации 81,2% пациентов находилось на гемодиализе и 18,8% - на перитонеальном диализе. Уровень креатинина до трансплантации составил 705,0 [579,0; 920,0] мкмоль/л. Время (среднее) холодовой ишемии равнялось 12,14±0,32 час. Отрицательный результат прямой перекрестной пробы (cross-match) наблюдался в 100% случаев.

Основные причины терминальной стадии ХБ почек у пациентов: хронический гломерулонефрит (57,58%), ХП (7,27%), хронический тубулоинтерстициальный нефрит (5,45%), сахарный диабет (7,27%), поликистоз почек (13,94%), врожденные аномалии развития мочевых путей (3,64%), ишемическая нефропатия (1,82%) и другие причины (3,03%).

Дотрансплантационный период почечнозаместительной терапии составил 32,9±2,45 [28,06; 37,76] месяцев. Количество пациентов с продолжительностью диализа 5 и более лет составило

23 пациента (13,94%), от 1 года до 5 лет – 103 (62,42%) и до 1 года – 39 (23,64%).

Иммуносупрессивная терапия проводилась согласно клиническим протоколам РБ (Приложение 1 к приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 05.01.2010 № 6). В качестве индукции все пациенты получали моноклональные анти-CD25-антитела, которые вводились дважды в дозе 20 мг в 0-е и 4-е сутки. Поддерживающая иммуносупрессивная терапия была представлена ингибиторами кальциневрина в сочетании с микофенолатом (87,35%) или азатиоприном (12,65%), а так же кортикостероиды. Кроме того, 72,89 % пациентов получали в качестве ингибитора кальциневрина циклоспорин, а 27,11% – такролимус.

Оценка иммунного статуса реципиентов почечного трансплантата проводилась методом проточной цитофлуориметрии (BD Company, Biosciences, США) со станцией пробоподготовки с использованием моноклональных антител (МКАТ) фирмы «BCoulter», Франция и Becton Dickinson and Company, BD Biosciences, США к CD45,3,4,25,127 (Fitc), и др., согласно инструкции производителя с применением многократного гейтирования. Иммунофенотипирование было проведено перед операцией по трансплантации почки, на 1-е, 3-и, 7-е, 30-е, 90-е, 180-е и 360-е сутки после операции.

Из 165 пациентов были сформированы 4 группы реципиентов почечного трансплантата. В первую (РПТ1) группу включены пациенты имеющие удовлетворительную первичную и позднюю функции почечного трансплантата (n=76), во вторую группу (РПТ2) – имеющие первичную удовлетворительную функцию и позднюю дисфункцию трансплантата (n=17), в третью группу (РПТ3) – первичную дисфункцию и позднюю удовлетворительную функцию (n=44), в четвертую группу (РПТ4) включены пациенты с первичной и поздней дисфункцией трансплантата (n=28). В качестве группы сравнения участвовало 90 практически здоровых пациентов.

Забор крови производили из локтевой вены в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА). Для определения маркеров экспрессии CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитометрии производили пробоподготовку по безотмывочной технологии. К 100 мкл крови добавляли моноклональные антитела CD4PC7, CD3FITC, CD127PE, CD25APC (Beckman Coulter, США) в объемах, рекомендуемых фирмой-производителем. Затем инкубировали 15 минут в темноте

при комнатной температуре. Для лизиса эритроцитов использовали лизирующий раствор OptiLyse B. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (BD, США). Накапливали не менее 30000 событий. Популяцию Т-лимфоцитов определяли как CD3<sup>+</sup> клетки, от которых производили гейтирование для определения активированных Т-хелперов с иммунофенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>. По даблпозитивной популяции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Т-хелперов производилось гейтирование для выявления субпопуляции Т-регуляторных клеток с иммунофенотипом CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>. Для вычисления абсолютного содержания изучаемых субпопуляций использовали результаты общего анализа крови, выполнявшегося из данной пробирки в тот же день.

Статистически результаты обработаны программой Statistica 10.0. Описательная статистика выполнена: среднее [доверительный интервал] – М [Confidence -95%; +95%], стандартная ошибка среднего (Std.err of mean) и медиана (интерквартильный размах) – Me [Q25; Q75]. Также использован метод числовых характеристик (Mann-Whitney U Test). Статистически значимые результаты - уровень Р менее 0,05.

### Результаты и обсуждение

Результаты уровня различий субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в группах реципиентов почечного трансплантата с различным вариантом клинического течения посттрансплантационного периода представлены в таблице 1.

Данные таблицы показывают, что у пациентов до проведения трансплантации почки значимых различий относительного количества субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с группой сравнения не выявлено ( $p_{\text{РПТ1Mann-Whitney U Test}}=0,61$ ,  $p_{\text{РПТ2Mann-Whitney U Test}}=0,377$ ,  $p_{\text{РПТ3Mann-Whitney U Test}}=0,258$ ,  $p_{\text{РПТ4Mann-Whitney U Test}}=0,56$ ).

Все пациенты из обследуемых групп получали индукционную терапию моноклональными анти-CD25-антителами, в связи с чем уже на 1-е сутки после операции относительное и абсолютное количество CD25-позитивных лимфоцитов значительно снизилось во всех группах ( $p_{\text{РПТ1Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{РПТ2Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{РПТ3Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{РПТ4Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ), сохранялось на 3-е ( $p_{\text{РПТ1Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{РПТ2Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{РПТ3Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{РПТ4Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ), 7-е ( $p_{\text{РПТ1Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{РПТ2Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{РПТ3Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{РПТ4Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ) и 30-е сутки ( $p_{\text{РПТ1Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ,  $p_{\text{РПТ2Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ).

$p_{\text{РПТ3Mann-Whitney U Test}}=0,001$ ,  $p_{\text{РПТ4Mann-Whitney U Test}} < 0,0001$ ).

Как известно, через 3 месяца заканчивается продолжительность действия индукционной иммуносупрессивной терапии анти-CD25-антителами [18]. Так, уровень относительного количества CD25-экспрессирующих лимфоцитов во всех группах восстановился к 90-м суткам и от группы сравнения не отличался ( $p_{\text{РПТ1Mann-Whitney U Test}}=0,504$ ,  $p_{\text{РПТ2Mann-Whitney U Test}}=0,974$ ,  $p_{\text{РПТ3Mann-Whitney U Test}}=0,180$ ,  $p_{\text{РПТ4Mann-Whitney U Test}}=0,614$ ). На 180-е и 360-е сутки обследования значимых различий относительного количества субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов с группой сравнения также выявлено не было ( $p_{\text{РПТ1Mann-Whitney U Test}}=0,954$ ,  $p_{\text{РПТ2Mann-Whitney U Test}}=0,217$ ,  $p_{\text{РПТ3Mann-Whitney U Test}}=0,77$ ,  $p_{\text{РПТ4Mann-Whitney U Test}}=0,981$  и  $p_{\text{РПТ1Mann-Whitney U Test}}=0,322$ ,  $p_{\text{РПТ2Mann-Whitney U Test}}=0,304$ ,  $p_{\text{РПТ3Mann-Whitney U Test}}=0,129$ ,  $p_{\text{РПТ4Mann-Whitney U Test}}=0,167$  соответственно).

Абсолютное количество субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов было значимо ниже во всех группах реципиентов почечного трансплантата относительно группы сравнения весь период посттрансплантационного наблюдения ( $p_{1,3,7,30,90,180,360 \text{ Mann-Whitney U Test}} < 0,001$ ). Это объясняется тем, что для пациентов с терминальной стадией болезни почек характерно снижение уровня CD4-Т-лимфоцитов [19]. В результате сравнения относительного содержания субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в группах с различными нарушениями функции почечного трансплантата (ранней или поздней дисфункцией) было выявлено, что уровень циркулирующих CD25-позитивных лимфоцитов на дотрансплантационном этапе в группе РПТ1 был значимо выше чем в группах РПТ2, РПТ3 и не имел значимых различий с группой РПТ4 ( $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,044$ ,  $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,007$ ,  $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,199$  соответственно).

В группе РПТ3 CD25-активированных лимфоцитов было значимо меньше чем в группе РПТ1 на 3-е сутки ( $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,003$ ) и 7-е ( $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,004$ ) сутки. На 90-е сутки в группе РПТ3 уровень CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> клеток также был значимо ниже чем в РПТ1 ( $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,038$ ), но через год наблюдения различий между группами выявлено не было.

Анализируя различия абсолютного количества CD25-экспрессирующих Т-хелперов были отмечены похожие тенденции, за исключением повышенного уровня данной субпопуляции на 1-е сутки, в группах РПТ3 и РПТ4 относительно группы РПТ1 ( $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,015$  и  $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,048$  соответственно).

**Таблица 1. Показатели CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата (РПТ) и группы сравнения (ГС) (Ме [Q25; Q75])**

Сутки	Ед. изм.	Группы			
		ГС	4,60 [3,00;8,00] % 0,25 [0,07;1,29] 10 <sup>9</sup> кл/л		
		РПТ1	РПТ2	РПТ3	РПТ4
0	отн х %	6,23 4,00;7,63	4,35** 2,50;5,70	4,60** 2,80;5,70	5,80 2,60;6,40
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,07* 0,044;0,123	0,07* 0,04;0,08	0,06* 0,044;0,098	0,061* 0,035;0,156
1	отн х %	1,08* 0,47;1,70	0,9* 0,26;1,23	0,90 0,50;3,50	0,90* 0,50;3,40
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,005* 0,00;0,010	0,01* 0,001;0,014	0,005*,** 0,003;0,019	0,009*,** 0,003;0,019
3	отн х %	1,50* 0,90;2,60	0,90* 0,50;2,10	0,45*,** 0,30;1,00	1,00* 0,40;1,20
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,015* 0,004;0,039	0,004* 0,003;0,013	0,003*,** 0,002;0,009	0,009* 0,002;0,018
7	отн х %	0,80* 0,50;1,46	0,50* 0,30;0,81	0,50*,** 0,40;0,70	0,70* 0,40;1,55
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,01* 0,009;0,030	0,01* 0,008;0,014	0,005*,** 0,003;0,01	0,01* 0,005;0,018
30	отн х %	1,10* 0,30;2,90	1,00* 0,50;4,70	0,30* 0,20;2,10	0,50* 0,30;3,50
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,014* 0,004;0,044	0,01* 0,008;0,078	0,008* 0,003;0,049	0,009* 0,003;0,021
90	отн х %	5,60 3,79;7,71	4,00 3,10;5,67	3,90** 1,60;7,30	6,15 4,60;7,50
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,08* 0,06;0,13	0,07* 0,05;0,08	0,077* 0,033;0,134	0,103* 0,08;0,136
180	отн х %	5,80 3,30;6,93	3,60 2,10;4,30	7,50** 4,80;8,60	6,00 2,60;8,10
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,09* 0,06;0,13	0,055* 0,04;0,11	0,162*,** 0,097;0,204	0,084* 0,043;0,163
360	отн х %	4,30 2,40;5,90	4,55 2,60;6,90	3,60 2,40;5,30	3,10 2,40;6,20
	10 <sup>9</sup> кл/л	0,07* 0,050;0,10	0,06* 0,05;0,13	0,048* 0,031;0,105	0,044* 0,033;0,134

Примечания:

\* – p&lt;0,05 при сравнении с ГС;

\*\* – p&lt;0,05 при сравнении с РПТ1.

На дооперационном этапе количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Т-лимфоцитов было значимо ниже в группе РПТ1 относительно группы сравнения, а в остальных группах различий с группой здоровых лиц выявлено не было (p<sub>РПТ1Mann-Whitney U Test</sub><0,0001, p<sub>РПТ2Mann-Whitney U Test</sub>=0,189, p<sub>РПТ3Mann-Whitney U Test</sub>=0,971, p<sub>РПТ4Mann-Whitney U Test</sub>=0,952) (таблица 2).

Динамика регуляторных CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Т-лимфоцитов в группах реципи-

ентов почечного трансплантата и их различия с группой сравнения схожи с динамикой CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов. Также было отмечено снижение с 1-х суток количества регуляторных Т-лимфоцитов в результате проведенной индукционной иммуносупрессивной терапии. Через 3 месяца количество данной субпопуляции восстановилось во всех группах кроме РПТ3 (p<sub>РПТ1Mann-Whitney U Test</sub>=0,083, p<sub>РПТ2Mann-Whitney U Test</sub>=0,102, p<sub>РПТ3Mann-Whitney U Test</sub>=0,005, p<sub>РПТ4Mann-Whitney U Test</sub>=0,281).

При сравнении уровней регуляторных лимфоцитов в группах РПТ2, РПТ3 и РПТ4 с РПТ1 было выявлено, что у пациентов в группе РПТ3 с ранней дисфункцией почечного трансплантата, количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Т-лимфоцитов было значимо ниже чем в группе РПТ1 ( $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,011$ ) на 90-е сутки наблюдения.

На 360-е сутки наблюдения в группе РПТ1 с удовлетворительной ранней и поздней функцией и в группе сравнения различий по содержанию данной субпопуляции не было. В то время как в других группах уровень CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Т-лимфоцитов был значимо ниже чем в группе сравнения ( $p_{\text{РПТ1Mann-Whitney U Test}}=0,825$ ,  $p_{\text{РПТ2Mann-Whitney U Test}}=0,008$ ,  $p_{\text{РПТ3Mann-Whitney U Test}}=0,002$ ,  $p_{\text{РПТ4Mann-Whitney U Test}}<0,0001$ ) и в группе РПТ1 ( $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}<0,0001$ ,  $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,0006$ ,  $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,004$ ).

Проведение анализа содержания абсолютного количества данной субпопуляции в группах РПТ и в группе сравнения выявило схожие различия (таблица 2), за исключением того, что в группе РПТ3 (с ранней дисфункцией и удовлетворительной поздней функцией) абсолютное количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Т-лимфоцитов было сопоставимо с группой РПТ1 ( $p_{\text{Mann-Whitney U Test}}=0,073$ ).

Таким образом, в группе с удовлетворительной ранней и поздней функцией почечного трансплантата и в группах с ранней или поздней дисфункцией принципиальных различий по динамике содержания субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на протяжении первого года наблюдения относительно группы сравнения и между изучаемыми группами выявлено не было. В свою очередь, до операции количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Т-лимфоцитов в группах с развившейся ранней дисфункцией трансплантата (РПТ3 и РПТ4) было выше, чем в группе сравнения. На 1-е сутки наблюдения отмечено снижение CD25-позитивных лимфоцитов в ответ на терапию анти-CD25-

антителами во всех группах с восстановлением данного показателя через 3 месяца. Однако через год наблюдения только в группе РПТ1 количество CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> Т-лимфоцитов сохранилось на уровне группы сравнения. Следует отметить, что в группе РПТ3, характеризующейся начальной дисфункцией, через 360 дней уровень креатинина стал ниже 150 мкмоль/л, функция трансплантата улучшилась и расценивалась как удовлетворительная. И, хотя, относительное количество регуляторной субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> сохранялось ниже чем в группе сравнения, абсолютное значение данной субпопуляции в этой группе не имело значимых различий с группой со стабильно удовлетворительной функцией трансплантата, чего не было отмечено в группах с поздней дисфункцией.

### Выводы

1. Восстановление количества CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> субпопуляций лимфоцитов на 90-е сутки и сохранение стабильного содержания данных субпопуляций в крови на протяжении года характерно для пациентов после трансплантации почки в группе с удовлетворительной ранней и поздней функцией почечного трансплантата.
2. У пациентов с первоначальной дисфункцией и поздней удовлетворительной функцией почечного трансплантата содержание регуляторной субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> имеет положительную тенденцию и через год не имеет значимых различий абсолютного количества с показателями пациентов с удовлетворительной ранней и поздней функцией почечного трансплантата.
3. Мониторинг CD25-экспрессирующих лимфоцитов может быть использован при разработке и применении стратегии минимизации иммуносупрессивной терапии для выявления пациентов с высоким толерогенным потенциалом.

### Литература

1. Fatina I.F., Eman A.E., Manal F.E. et al. Lymphocyte Activation Markers in Pediatric Kidney Transplant Recipients. *Int J Biomed Sci.* 2015; 11(3): 121-130. DOI: 10.1016/j.humimm.2011.02.003.
2. Bestard O., Cruzado J.M., Mestre M. et al. Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3+ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *J. Immunol.* 2007; 179 (7): 4901-4909. DOI: 10.4049/jimmunol.179.7.4901.

3. Kawai T., Poncelet A., Sachs D.H. et al. Long-term outcome and alloantibody production in a non-myeloablative regimen for induction of renal allograft tolerance. *Transplantation.* 1999; 68: 1767-1775. DOI: 10.1097/00007890-199912150-00022.
4. Thomas J.M., Contreras J.L., Jiang X.L. et al. Peritransplant tolerance induction in macaques: early events reflecting the unique synergy between immunotoxin and deoxyspergualin. *Transplantation.* 1999; 68: 1660-1673. DOI: 10.1097/00007890-199912150-00009.

5. Thomas J.M., Eckhoff D.E., Contreras J.L. et al. Durable donor-specific T and B cell tolerance in rhesus macaques induced with peritransplantation anti-CD3 immunotoxin and deoxyspergualin: absence of chronic allograft nephropathy. *Transplantation*. 2000; 69(12): 2497-2503. DOI: 10.1097/00007890-200006270-00007.
6. Francisco S.O., Nurhashikin Y., Susan S.S.H. Are We Ready for the Use of Foxp3+ Regulatory T Cells for Immunodiagnosis and Immunotherapy in Kidney Transplantation? *J Transplant*. 2012; 2012: 397952. DOI: 10.1155/2012/397952.
7. Shevach E.M. From vanilla to 28 flavors: Multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity*. 2006; 25: 195-201. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.08.003.
8. Stephen P.C. Herman W. Regulatory Cells and Transplantation Tolerance. *Transplantation: a subject collection from Cold Spring Harbor perspectives in medicine*/edited by L.A. Turka, Harvard Medical School, Massachusetts General Hospital, and K.J. Wood, University of Oxford. 2014;191-209.
9. Szanya V., Ermann J., Taylor C. et al. The subpopulation of CD4+CD25+ splenocytes that delays adoptive transfer of diabetes expresses L-selectin and high levels of CCR7. *J. Immunol*. 2002; 169: 2461-2465. DOI: 10.4049/jimmunol.169.5.2461.
10. Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+) CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen. *J. Exp. Med*. 2000; 192: 303-310. DOI: 10.1084/jem.192.2.303.
11. Shimizu J., Yamazaki S., Takahashi T. et al. Stimulation of CD25(+) CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self tolerance. *Nat. Immunol*. 2002; 3: 135-142. DOI: 10.1038/ni759.
12. Fontenot J.D., Gavin M.A., Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol*. 2003; 4: 330-336. DOI: 10.1038/ni904.
13. Wood K.J., Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat. Rev. Immunol*. 2003; 3: 199-210. DOI: 10.1038/nri1027.
14. Graca L., Cobbold S.P., Waldmann H. Identification of regulatory T cells in tolerated allografts. *J. Exp. Med*. 2002; 195: 1641-1646. DOI: 10.1084/jem.20012097.
15. Chapman J.R., O'Connell P.J., Nankivell B.J. Chronic renal allograft dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2005; 16: 3015. DOI: 10.1681/ASN.2005050463.
16. Cantaluppi V., Dellepiane S., Tamagnone 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): 1-19. DOI: 10.1371/journal.pone.0129279.
17. Massart A., Ghisdal L., Abramowicz M. et al. Operational Tolerance in Kidney Transplantation and Associated Biomarkers: Serendipitous tolerance in kidney recipients. *Clinical & Experimental Immunology*. 2017; 189(2): 138-157. DOI: 10.1111/cei.12981.
18. Зыблева С.В., Зыблев С.Л., Новиков П.Д. и др. Влияние иммуносупрессивной терапии на Т-лимфоциты у пациентов после трансплантации почки. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2018; 1: 13-18. DOI: 10.14427/jipai.2018.1.13.
19. Зыблева С.В., Зыблев С.Л., Новиков П.Д. и др. Иммунопатологические нарушения у реципиентов почечного трансплантата с терминальной стадией хронической болезни почек. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2017; 2: 51-57. DOI: 10.14427/jipai.2017.2.51.

#### Сведения об авторе:

Зыблева Светлана Валерьевна, к.м.н., ученый секретарь, врач-иммунолог, 246000 Беларусь, Гомель, ул. Ильича, 290. Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, Тел.: (80232) 38-99-08, (029) 109-75-09, факс (80232-37-80-97). E-mail: zyb-svetlana@yandex.ru.

Поступила 17.10.2019 г.