

## ПОКАЗАТЕЛИ CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> И CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> ЛИМФОЦИТОВ ПРИ УДОВЛЕТВОРИТЕЛЬНОЙ ПЕРВИЧНОЙ ФУНКЦИИ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА

ЗЫБЛЕВА С.В., ЗЫБЛЕВ С.Л.

Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель, Республика Беларусь

Вестник ВГМУ. – 2020. – Том 19, №6. – С. 122-131.

## INDICATORS OF CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> AND CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> LYMPHOCYTES WITH SATISFACTORY PRIMARY KIDNEY GRAFT FUNCTION

ZYBLEVA S.V., ZYBLEV S.L.

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

Vestnik VGMU. 2020;19(6):122-131.

---

### Резюме.

Цель – изучить динамику CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов у пациентов после трансплантации почки с удовлетворительной первичной функцией почечного трансплантата.

Материал и методы. 197 реципиентам выполнена трансплантация почки. Все пациенты разделены на 3 группы. Первая группа (ПФТ, n=101) – пациенты с удовлетворительной первичной функцией трансплантата без эпизодов отторжения, вторая группа (ДФТ, n=82) – пациенты с первичной дисфункцией трансплантата без эпизодов отторжения, третья группа (ОПТ, n=14) – пациенты с первичной дисфункцией трансплантата и отторжением, верифицированным на основании биопсии почечного трансплантата. Группа сравнения (ГС) – 90 здоровых добровольцев. Функция трансплантата оценивалась по следующим критериям: первичная функция трансплантата характеризовалась при уровне креатинина на 7 сутки после операции ниже 300 мкмоль/л; при концентрации креатинина равной или превышающей 300 мкмоль/л (или), при необходимости в проведении диализа на первой неделе после трансплантации состояние классифицировалось как дисфункция почечного трансплантата. Иммунологическое обследование проводилось на 1-е, 3-и, 7-е, 30-е и 90-е сутки после операции. Определяли уровень CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов.

Результаты. В группе ПФТ выявлено значимое преобладание с 3-х до 30-х суток абсолютного уровня НК только по сравнению с группой ОПТ. Относительный уровень НК был значимо выше в группе ПФТ по сравнению с группой ОПТ начиная с 30-х суток. Не выявлена связь относительного и абсолютного количества НК с уровнем креатинина на протяжении всего исследования.

Выявлен значимый рост абсолютного и относительного показателя НКТ с 30-х суток в группе ПФТ по сравнению с группами ДФТ и ОПТ. Обнаружена отрицательная связь абсолютного количества НКТ с уровнем креатинина на 30-е и 90-е сутки и относительного количества данных лимфоцитов с уровнем креатинина на 90-е сутки.

Заключение. Результаты исследования могут быть использованы для иммунологического мониторинга в раннем посттрансплантационном периоде.

*Ключевые слова:* CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>, трансплантация почки.

### Abstract.

Objectives. To study the dynamics of CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> lymphocytes in patients after kidney transplantation with satisfactory primary graft function.

Material and methods. 197 recipients underwent kidney transplantation. All patients were divided into 3 groups. The first group (PGF, n=101) consisted of patients with satisfactory primary graft function without rejection episodes, the second group (PGD, n=82) included patients with primary graft dysfunction without rejection episodes, the third group

(GR, n=14) was composed of patients with primary graft dysfunction and graft rejection verified on the basis of renal transplant biopsy. A comparison group (CG) consisted of 90 healthy volunteers. Graft function was assessed according to the following criteria: primary graft function was characterized by creatinine level below 300  $\mu\text{mol/l}$  on the 7th day after surgery; when creatinine concentration was equal to or higher than 300  $\mu\text{mol/l}$  and (or) in case of need for dialysis during the first week after transplantation, the state was classified as kidney graft dysfunction. Immunological examination was carried out on the 1st, the 3rd, the 7th, the 30th and the 90th days after the transplantation. The level of  $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  and  $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  lymphocytes was determined.

Results. In the PGF group, a significant predominance of the absolute NK level from the 3rd day to the 30th day was revealed only in comparison with the GR group. The relative NK level was significantly higher in the PGF group compared to the GR group beginning with the 30th day. No correlation was found between the relative and absolute NK levels and creatinine levels throughout the study. There was a significant increase in the absolute and relative NKT level beginning with the 30th day in the PGF group compared to the PGD and GR groups. A negative correlation was found between the absolute NKT level and creatinine level on the 30th and the 90th days and the relative level of these lymphocytes with the creatinine level on the 90th day.

Conclusions. The results of the study can be used for the immunological monitoring in the early post-transplantation period.

Key words:  $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  and  $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$ , kidney transplantation.

Естественные киллерные (НК) лимфоидные клетки являются основными компонентами врожденного иммунитета и служат первым барьером против микробной инфекции и развития опухоли. На основании интенсивности экспрессии молекулы CD56 все периферические НК-клетки человека можно разделить на два основных подмножества ( $\text{CD56}^{\text{dim}}$  и  $\text{CD56}^{\text{bright}}$ ), причем каждая группа проявляет различные фенотипические и функциональные свойства. К основным маркерам относятся Fc $\gamma$  рецептор IIIa (CD16), CD6, и KIR (killer cell immunoglobulin-like receptors) которые экспрессированы на  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  клетках [1]. В отличие от  $\text{CD56}^{\text{dim}}$ , субпопуляция  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  НК-клеток экспрессирует очень низкий уровень, менее 3%, молекул CD16 и CD6, но при этом демонстрирует более высокую плотность ингибиторного гетеродимера CD94/NKG2A [2]. Другие поверхностные рецепторы, такие как активационно-зависимые маркеры CD25, CD69, HLA-DR и типичные рецепторы НК-клеток, такие как естественные рецепторы цитотоксичности (NCR), NKG2D и CD161, одинаково экспрессируются на клетках обеих субпопуляций. Помимо отчетливых различий по фенотипическим признакам, обе субпопуляции НК-клеток также отличаются разными эффекторными функциями. Общепринято, что  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  НК-клетки в первую очередь ответственны за цитотоксическую активность из-за их высокого содержания гранул, наполненных цитотоксинами, такими как перфорин, гранзим А и В. В то время как  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  постулируются регуляторами иммунных реакций, главным образом

через продукцию цитокинов, например секрецию интерферона (ИФН)- $\gamma$  после стимуляции интерлейкином (Ил)-2, Ил-12 или Ил-15 [3].

Таким образом, НК-клетки являются цитолитическими эффекторными клетками с двумя основными режимами действия. Первый – это прямой лизис человеческих клеток-мишеней, относящийся к естественной цитотоксичности. Вторым способом действия НК-клеток является лизис, индуцируемый взаимодействием между Fc-рецептором CD16 и Fc-фрагментом антитела, которое распознает чужеродные антигены на клетках-мишенях, действие которого также называется антителозависимой клеточной цитотоксичностью. В отличие от того, что считалось несколько десятилетий назад, в настоящее время четко установлено, что НК играют определенную роль в отторжении аллотрансплантата [4]. Отсутствие на аллотрансплантате самоподдерживающихся молекул комплекса гистосовместимости I класса или активация Fc-рецептора донорспецифическими АТ индуцируют активность НК-клеток, приводя к прямому лизису клеток аллотрансплантата и секреции провоспалительных молекул, способствующих адаптивному иммунитету [5]. Однако функция НК-клеток, как указывалось выше, является двунаправленной. Помимо того, что они играют определенную роль в отторжении аллотрансплантата, НК-клетки также участвуют в формировании иммунологической толерантности согласно исследованиям на животных моделях. Таким образом, в последнее десятилетие статус НК-клеток перешел от «вредной роли»

к «нулевой роли», а затем и к «полезной роли» в области трансплантации. Было показано, что в экспериментальных моделях, как и в организме человека, НК-клетки оказывают благоприятное воздействие и могут быть мощными регуляторами иммунитета. Данные клетки здерживают отторжение аллотрансплантата путем снижения гомеостатической пролиферации CD8<sup>+</sup> Т-клеток, конкурируя за Ил15 и так же способны ингибировать клональную экспансию антиген-стимулированных Т-клеток в дополнение к снижению уровня дендритных клеток [6].

НКТ-лимфоциты представляют уникальную популяцию клеток, экспрессирующих антигены НК-лимфоцитов (например, CD16) и Т-клеточный рецептор (TCR), и могут относиться к CD4<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> фенотипу [7]. НКТ-лимфоциты распознают гликолипид агалактозилцерамиды (α-GalCer) в комплексе с белками главного комплекса гистосовместимости (CDId) на поверхности опухолевых клеток и затем уничтожают их. Кроме того, НКТ-лимфоциты угнетают активированные (аутореактивные) Т-лимфоциты, что связано с продукцией ими Ил-4. В настоящее время установлена «дефектность» НКТ лимфоцитов у пациентов с некоторыми аутоиммунными расстройствами [8].

Несмотря на активное участие НК-клеток в иммунологическом ответе после трансплантации почки, репертуар периферических НК-клеток реципиентов почки изучен недостаточно подробно. Таким образом, НК-клетки явно влияют на результат трансплантации, и одна из задач заключается в том, чтобы согласовать их роль в формировании толерантности при трансплантации почки [9].

Недавние открытия расширили понимание биологии НК-клеток и подняли важные вопросы о том, как НК-клетки влияют на результаты трансплантации. Эти данные подчеркивают необходимость разработки и тестирования новых стратегий, направленных на модуляцию НК-клеток в качестве адъювантной терапии для предотвращения повреждения трансплантата и облегчения индукции толерантности [10].

## Материал и методы

Обследовано 197 пациентов, которым выполнена трансплантация почки в хирургическом отделении (трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии) ГУ «РНПЦ РМиЭЧ». Исследование соответствовало критериям Хель-

синской декларации 1975 года, одобрено комитетом по этике ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» (протокол №5 от 02.12.2013). Пациенты сравниваемых групп не имели статистически значимых отличий по полу, возрасту, виду проводимого диализа до трансплантации и времени ишемии, что представлено в таблице 1.

Из 197 реципиентов с первично удовлетворительной функцией почечного трансплантата (ПФТ) был 101 пациент (51,27%), в группе с первичной дисфункцией (ДФТ) было 82 пациента (42,62%). В третью группу (n=14) вошли пациенты с первичной дисфункцией донорского органа и гистологически подтвержденным отторжением почечного трансплантата (ОПТ) (7,10%). В качестве группы сравнения участвовало 90 практически здоровых пациентов.

Для определения иммунологических особенностей реципиентов почечного трансплантата использовали методику проточной цитометрии с применением многократного поступательного гейтирования. Иммунологическое обследование пациентов проводилось на 1-е, 3-и, 7-е, 30-е и 90-е сутки после операции.

## Методика определения относительно-го и абсолютного количества субпопуляций Т-лимфоцитов

Кровь брали из локтевой вены, в качестве антикоагулянта использовали ЭДТА. Определение относительного и абсолютного количества натуральных киллеров (НК) и Т-натуральных киллеров (ТНК) в периферической крови проводилось в рамках исследования показателей стандартной иммунограммы. Применяли комбинацию моноклональных антител, меченных флуорохромами к поверхностным антигенам: CD3 Fcγ, CD45 PerCP, CD19 APC, CD56, CD16 PE (BD, США), согласно инструкции фирмы-производителя. Инкубировали 15 минут в темноте. Для лизиса эритроцитов использовали OptiLyseB. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Canto II (BD, США). Накапливали не менее 30 000 событий. Гейтирование проводили по клеткам с НК определяли как CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клетки. Клетки с иммунофенотипом CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> определялись как ТНК периферической крови. Абсолютное значение НК и ТНК получали путем математического вычисления.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета программ Statistica

Таблица 1 – Пол и возраст пациентов, вид диализа, время ишемии в сравниваемых группах

Группа	Возраст, лет, М ДИ [-95%; +95%]	Пол, n (%)	Вид диализа, n (%)	Время ишемии, час, М ДИ [-95%; +95%]
Всего (n=197)	45,85 [44,12; 47,58]	жен – 75 (38,07%), муж – 122 (61,93%)	ГД – 157 (79,70%) ПД – 37 (18,78%) ДД – 3 (1,52%)	12,38 [11,77; 13,00]
Группа ПФТ (n=101)	45,46 [42,92; 47,99]	жен – 38 (37,62%) муж – 63 (62,38%)	ГД – 76 (75,25%) ПД – 23 (22,77%) ДД – 2 (1,98%)	11,93 [11,11; 12,75]
Группа ДФТ (n=82)	46,32 [43,67; 48,97]	жен – 28 (34,15%) муж – 54 (65,85%)	ГД – 69 (84,15%) ПД – 12 (14,63%) ДД – 1 (1,22%)	12,58 [11,62; 13,55]
Группа ОПТ (n=14)	45,93 [39,92; 51,94]	жен – 9 (64,29%) муж – 5 (35,71%)	ГД – 12 (85,71%) ПД – 2 (14,29%)	13,85 [10,89; 16,81]
Сравнение показателей	p=0,919 Kruskal-Wallis test	p=0,100 Pearson Chi-square	p=0,613 Pearson Chi-square	p=0,245 Kruskal-Wallis test

10,0. Описательная статистика качественных признаков представлена абсолютными и относительными частотами, а количественных признаков – в формате: среднее (доверительный интервал) – М [Confidence -95%; +95%] и медиана (интерквартильный размах) – Ме [Q25; Q75]. Для сравнения значений использовался метод числовых характеристик (Mann-Whitney U Test) с оценкой распределения переменных. Результаты считали статистически значимыми при достигнутом уровне значимости менее 0,05.

## Результаты

В результате исследования получены следующие данные, представленные в таблице 2 и 3.

В 1-е сутки после операции существенной динамики зафиксировано не было (Wilcoxon Matched Pairs Test  $p_{0,1ПФТ/Тотн} = 0,170$ ,  $p_{0,1ДФТ} = 0,071$ ,  $p_{0,1ОПТ/Тотн} = 0,214$ ). Относительное содержание НКТ лимфоцитов на 3-и сутки наблюдения в группе ПФТ значимо снизилось на 42,86%, а группах ДФТ и ОПТ стало выше на 20,00% и 80,00% соответственно (Mann-Whitney U Test  $p_{3ПФТ/ДФТ/Тотн} = 0,464$ ,  $p_{3ПФТ/ОПТ/Тотн} = 0,037$ ,  $p_{3ДФТ/ОПТ/Тотн} = 0,111$ ) (рис. 1).

Схожая картина отношения уровней субпопуляции CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> клеток сохранялась и на 7-е сутки, причем в группе ДФТ отмечено некоторое снижение уровня данных клеток (Mann-Whitney U Test  $p_{7ПФТ/ДФТ/Тотн} = 0,357$ ,  $p_{7ПФТ/ОПТ/Тотн} = 0,044$ ,  $p_{7ДФТ/ОПТ/Тотн} = 0,023$ ).

К 30-м суткам относительное содержание НКТ клеток во всех группах реципиентов ста-

билизировалось и значимо между собой и с группой сравнения не различалось (Mann-Whitney U Test  $p_{30ПФТ/ДФТ/Тотн} = 0,356$ ,  $p_{30ПФТ/ОПТ/Тотн} = 0,679$ ,  $p_{30ДФТ/ОПТ/Тотн} = 0,772$ ,  $p_{30ПФТ/ГСабс} = 0,151$ ,  $p_{30ДФТ/ГСабс} = 0,697$ ,  $p_{30ОПТ/ГСабс} = 0,503$ ).

Сравнив уровень CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов на 90-е сутки, был зафиксирован достоверный их рост в группе ПФТ, превышающий содержание данных клеток у пациентов групп ДФТ и ОПТ (Mann-Whitney U Test  $p_{90ПФТ/ДФТ/Тотн} < 0,0001$ ,  $p_{90ПФТ/ОПТ/Тотн} = 0,041$ ,  $p_{90ДФТ/ОПТ/Тотн} = 0,346$ ).

Мониторинг абсолютного содержания НКТ клеток выявил, что в 1-е и 3-и сутки после трансплантации их количество во всех группах реципиентов было ниже, чем в ГС (Mann-Whitney U Test  $p_{1ПФТ/ГСабс} < 0,0001$ ,  $p_{1ДФТ/ГСабс} < 0,0001$ ,  $p_{1ОПТ/ГСабс} < 0,0001$ ,  $p_{3ПФТ/ГСабс} = 0,003$ ,  $p_{3ДФТ/ГСабс} = 0,005$ ,  $p_{3ОПТ/ГСабс} = 0,012$ ). К 90-м суткам абсолютное количество CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов было выше в группе ПФТ, чем в группах ДФТ и ОПТ (Mann-Whitney U Test  $p_{90ПФТ/ДФТ/Тотн} = 0,001$ ,  $p_{90ПФТ/ОПТ/Тотн} = 0,047$ ,  $p_{90ДФТ/ОПТ/Тотн} = 0,754$ ) (табл. 2, рис. 2).

В ранний период после ТП динамика количества CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> натуральных киллеров (НК) характеризовалась снижением количества клеток на 3 сутки после операции, и весь период мониторинга, кроме 1 суток, общее число НК не превышало верхней границы референтных значений (табл. 3).

В первые сутки наблюдения значимой разницы между группами и группой сравнения по уровню CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов выявлено не было (Mann-Whitney U Test  $p_{1ПФТ/ГС} = 0,297$ ,  $p_{1ДФТ/ГС} = 0,142$ ,  $p_{1ОПТ/ГС} = 0,935$ ,  $p_{1ПФТ/ДФТ/Тотн} = 0,609$ ,

Таблица 2 – Показатели  $CD3^+CD16^+CD56^+$  лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата и группы сравнения (Me [Q25; Q75])

ГС		4,20 [2,70;7,30] %		
		0,08 [0,05;0,18] $10^9/л$		
Сут.	Ед. изм.	Группы		
		ПФТ	ДФТ	ОПТ
0	%	7,00* 5,40;9,40	6,70* 3,90;12,60	6,60* 5,40;16,50
	$10^9/л$	0,11 0,07;0,21	0,10 0,06;0,25	0,10 0,09;0,17
1	%	7,30* 3,40;9,70	5,50 2,70;8,70	5,10 3,30;7,30
	$10^9/л$	0,01* 0,00;0,02	0,01*§ 0,00;0,01	0,00*# 0,00;0,01
3	%	4,60§ 3,20;8,40	6,20 3,00;9,20	9,55* 5,30;12,50
	$10^9/л$	0,06* 0,03;0,09	0,06* 0,02;0,10	0,03* 0,01;0,17
7	%	5,90 4,00;8,40	5,90§ 3,20;8,70	9,60*^ 4,80;20,50
	$10^9/л$	0,10 0,06;0,14	0,07 0,04;0,17	0,09 0,04;0,15
30	%	5,70 3,50;10,50	5,00 2,90;6,40	5,70 3,70;8,90
	$10^9/л$	0,12^ 0,04;0,17	0,08# 0,05;0,13	0,04*# 0,02;0,11
90	%	8,60*^ 5,25;12,10	4,50# 3,10;5,60	4,90# 3,50;7,05
	$10^9/л$	0,20*^ 0,08;0,24	0,10# 0,08;0,14	0,10# 0,09;0,12

Примечания: \* –  $p < 0,05$  относительно показателей ГС; # –  $p < 0,05$  относительно показателей группы ПФТ; ^ –  $p < 0,05$  относительно показателей группы ДФТ; § –  $p < 0,05$  относительно показателей группы ОПТ.

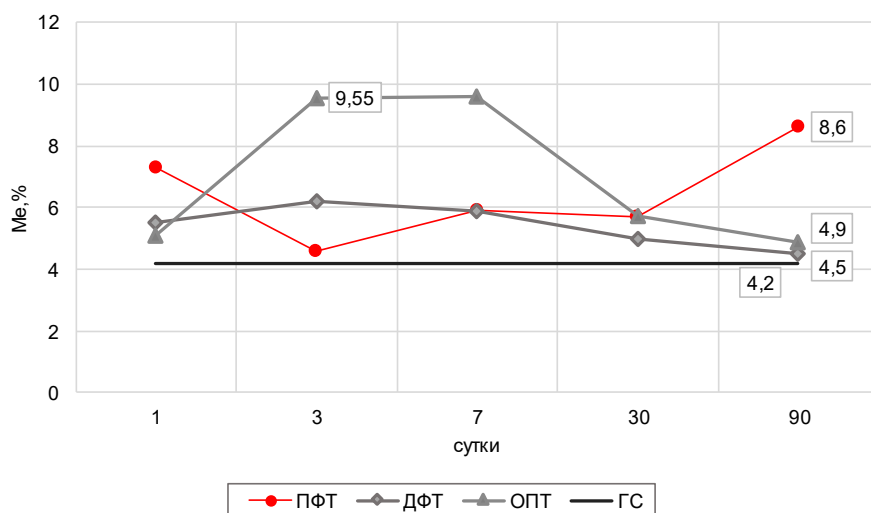


Рисунок 1 – Динамика относительного количества  $CD3^+CD16^+CD56^+$  лимфоцитов.

$p_{ПФТ/ОПТ_{\text{итог}}} = 0,623$ ,  $p_{ДФТ/ОПТ_{\text{итог}}} = 0,544$ ).

У пациентов из группы ПФТ на 3-и сутки

после операции было выявлено существенное снижение НК на 68,75%, в группе ДФТ снижение

Таблица 3 – Показатели CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата и группы сравнения (Me [Q25; Q75])

ГС		14,40 [11,00; 17,80]% 0,33 [0,21; 0,40] 10 <sup>9</sup> /л		
Сут.	Ед. изм.	Группы		
		ПФТ	ДФТ	ОПТ
0	%	15,60 <sup>§</sup> 10,6;24,40	11,90 8,20;18,90	9,70 <sup>#</sup> 5,90;11,20
	10 <sup>9</sup> /л	0,30 <sup>§</sup> 0,16;0,42	0,25 0,10;0,39	0,13 <sup>#</sup> 0,09;0,24
1	%	16,10 9,00;26,00	17,60 11,10;22,70	14,55 6,60;22,70
	10 <sup>9</sup> /л	0,12 <sup>*</sup> 0,06;0,21	0,13 <sup>*</sup> 0,09;0,20	0,12 <sup>*</sup> 0,03;0,20
3	%	5,40 <sup>*§^</sup> 3,80;12,70	13,15 <sup>#</sup> 11,20;17,80	14,45 <sup>#</sup> 10,00;18,90
	10 <sup>9</sup> /л	0,06 <sup>*^</sup> 0,03;0,14	0,13 <sup>*#§</sup> 0,06;0,20	0,05 <sup>*^</sup> 0,02;0,13
7	%	8,10 <sup>*§</sup> 6,00;10,40	9,00 <sup>*</sup> 5,20;11,50	10,55 <sup>*#</sup> 9,30;12,90
	10 <sup>9</sup> /л	0,13 <sup>*</sup> 0,09;0,22	0,12 <sup>*</sup> 0,07;0,19	0,10 <sup>*</sup> 0,08;0,14
30	%	9,90 <sup>*</sup> 5,30;13,70	10,70 5,10;21,60	7,55 <sup>*</sup> 3,20;19,15
	10 <sup>9</sup> /л	0,15 <sup>*</sup> 0,09;0,17	0,14 <sup>*</sup> 0,07;0,24	0,08 <sup>*</sup> 0,04;0,18
90	%	9,20 <sup>*§</sup> 5,00;13,50	8,20 <sup>*§</sup> 5,90;15,60	5,25 <sup>*#</sup> 2,60;6,70
	10 <sup>9</sup> /л	0,17 <sup>*§</sup> 0,12;0,28	0,19 <sup>*§</sup> 0,10;0,35	0,09 <sup>*#^</sup> 0,02;0,10

Примечания: \* – p<0,05 относительно показателей ГС; # – p<0,05 относительно показателей группы ПФТ; ^ – p<0,05 относительно показателей группы ДФТ; § – p<0,05 относительно показателей группы ОПТ.

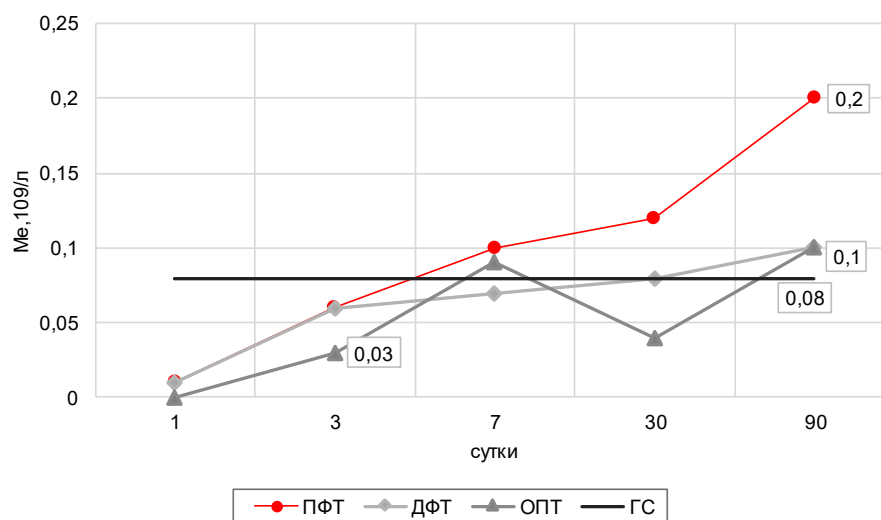


Рисунок 2 – Динамика абсолютного количества CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов.

было менее выраженным – на 23,53%, а в группе ОПТ значимой динамики выявлено не было

(Wilcoxon Matched Pairs Test  $p_{1,3ПФТ\text{Тотн}}=0,0001$ ,  $p_{1,3ДФТ}=0,065$ ,  $p_{1,3ОПТ\text{Тотн}}=0,144$ , Mann-Whitney U

Test  $p_{3\text{ПФТ/ДФТ}_{\text{Тотн}}} < 0,0001$ ,  $p_{3\text{ПФТ/ОПТ}_{\text{Тотн}}} = 0,047$ ,  $p_{3\text{ДФТ/ОПТ}_{\text{Тотн}}} = 0,954$  (рис. 3).

На 7-е посттрансплантационные сутки снижение  $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  лимфоцитов относительно ГС было зафиксировано во всех группах реципиентов, причем в группе ПФТ уровень данной субпопуляции был достоверно ниже, чем в группе ДФТ (Mann-Whitney U Test  $p_{7\text{ПФТ/ГС}} < 0,0001$ ,  $p_{7\text{ДФТ/ГС}} < 0,0001$ ,  $p_{7\text{ОПТ/ГС}} = 0,048$ ,  $p_{7\text{ПФТ/ДФТ}_{\text{Тотн}}} = 0,894$ ,  $p_{7\text{ПФТ/ОПТ}_{\text{Тотн}}} = 0,040$ ,  $p_{7\text{ДФТ/ОПТ}_{\text{Тотн}}} = 0,115$ ).

При проведении сравнительного анализа на 90-е сутки выявлены достоверные различия между группой сравнения и группами реципиентов почечного трансплантата (Mann-Whitney U Test  $p_{90\text{ПФТ/ГС}} = 0,001$ ,  $p_{90\text{ДФТ/ГС}} = 0,008$ ,  $p_{90\text{ОПТ/ГС}} < 0,0001$ ). Также выявлены значимые различия между группами ПФТ и ДФТ с группой ОПТ (Mann-Whitney

U Test  $p_{90\text{ПФТ/ДФТ}_{\text{Тотн}}} = 0,870$ ,  $p_{90\text{ПФТ/ОПТ}_{\text{Тотн}}} = 0,023$ ,  $p_{90\text{ДФТ/ОПТ}_{\text{Тотн}}} = 0,046$ ).

Уровень абсолютного содержания  $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  лимфоцитов в группах ПФТ, ДФТ и ОПТ был ниже, чем в группе сравнения весь ранний посттрансплантационный период (Mann-Whitney U Test  $p_{1\text{ПФТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{1\text{ДФТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{1\text{ОПТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{3\text{ПФТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{3\text{ДФТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{3\text{ОПТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{7\text{ПФТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{7\text{ДФТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{7\text{ОПТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{30\text{ПФТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{30\text{ДФТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{30\text{ОПТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ). На 90-е сутки наблюдения в группе ПФТ и ДФТ уровень НК был значимо ниже чем в группе ПФТ и ГС (Mann-Whitney U Test  $p_{90\text{ПФТ/ДФТ}_{\text{абс}}} = 0,334$ ,  $p_{90\text{ПФТ/ОПТ}_{\text{абс}}} = 0,003$ ,  $p_{90\text{ДФТ/ОПТ}_{\text{абс}}} = 0,012$ ,  $p_{90\text{ПФТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ,  $p_{90\text{ДФТ/ГС}_{\text{абс}}} = 0,008$ ,  $p_{90\text{ОПТ/ГС}_{\text{абс}}} < 0,0001$ ) (рис. 4).

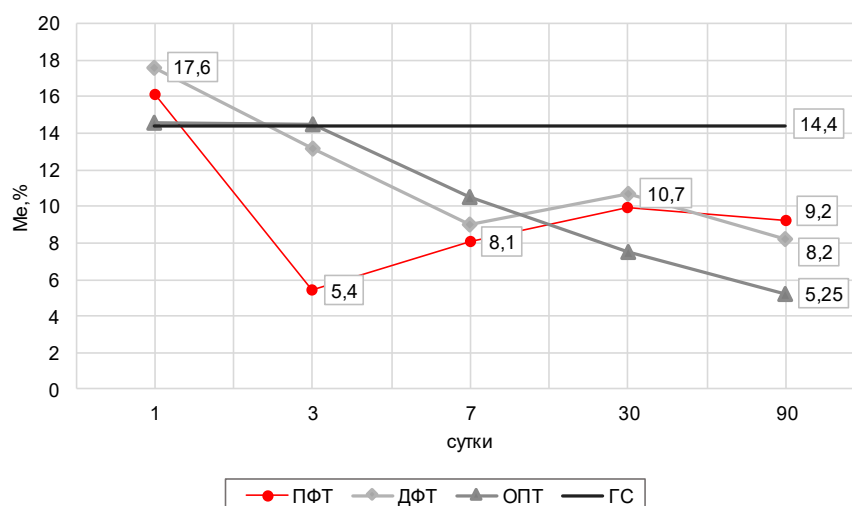


Рисунок 3 – Динамика относительного количества  $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  лимфоцитов.

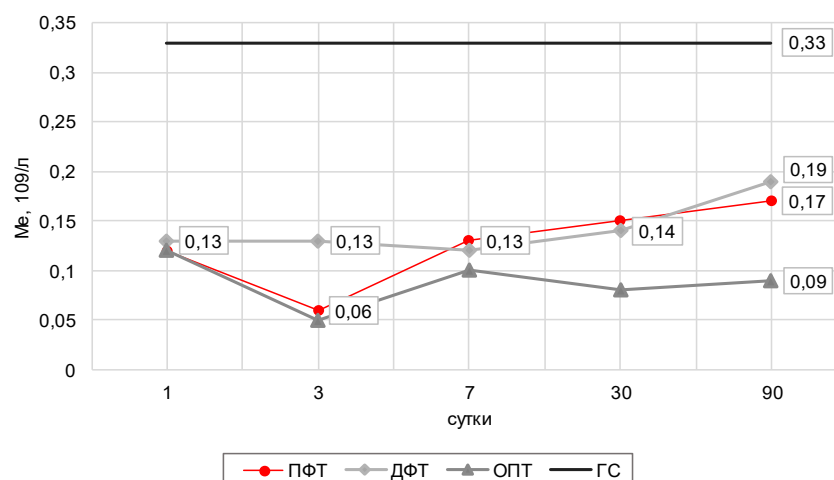


Рисунок 4 – Динамика абсолютного количества  $\text{CD3}^+\text{CD16}^+\text{CD56}^+$  лимфоцитов.

## Обсуждение

В исследовании Sago P. с соавт. сообщается, что у толерантных реципиентов почечного трансплантата наблюдается увеличение уровня В- и NK-лимфоцитов, снижение активированных CD4<sup>+</sup> Т-клеток, отсутствие донорспецифических антител, донорспецифическая гипореактивность CD4<sup>+</sup> Т-клеток и высокое соотношение FoxP3 к экспрессии гена Альфа-1,2-маннозидазы [11]. Некоторые исследователи описали связь иммунологической толерантности после трансплантации печени преимущественно с NK-клетками и  $\gamma\delta$ -Т-клетками в крови и генами, ассоциированными с гомеостазом железа в трансплантате. Так, толерантные реципиенты демонстрировали повышенное содержание NK-клеток на фоне снижения уровня  $\gamma\delta$  Т-клеток [12].

Другие экспериментальные сообщения указывали на то, что NK-клетки сдерживают отторжение аллотрансплантата за счет снижения регуляции гомеостатической пролиферации CD8<sup>+</sup> Т-клеток [13]. Представления о роли NK-клеток в трансплантологии были дополнены открытием Yu G. И соавт., что NK-клетки необходимы для индукции толерантности, а их истощение (но не NKT-клеток) препятствовало развитию иммунологической толерантности к островковым и кожным аллотрансплантатам [14]. В исследованиях Deniz G. и соавт., показывают, что NK-клетки могут ингибировать или модулировать местные иммунные реакции посредством синтеза Ил-10 [15]. Однако точные механизмы, контролирующие повреждение трансплантата, опосредованное NK-клетками, в сравнении с индукцией иммунологической толерантности, расшифрованы в полной мере не были. Более глубокое понимание этих вопросов может иметь существенное значение при разработке методов лечения, направленных на продление выживаемости трансплантата. Тот факт, что NK-клетки могут одновременно выполнять как про-, так и противовоспалительные действия, представляет собой серьезную проблему в определении точной роли NK-клеток в индукции отторжения трансплантата и иммунологической толерантности [10]. Так, по нашим данным в группе ПФТ наблюдалось значимое преобладание с 3-х суток до 3-х месяцев абсолютного уровня NK по сравнению с показателями только группы ОПТ. Относительный уровень NK был значимо выше в группе ПФТ по сравнению с группой ОПТ начиная с 30-х суток. Кроме

того, корреляционный анализ не выявил связь относительного и абсолютного количества CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов с уровнем креатинина на протяжении всего исследования.

Что касается натуральных супрессоров (NKT), которые являются неспецифическими блокаторами Т-лимфоцитов и дендритных клеток, нами выявлен значимый рост абсолютного и относительного уровня данных клеток, четко ассоциированный с удовлетворительной функцией почечного трансплантата. Отмечен значимый рост абсолютного и относительного показателя NKT клеток с 30-х суток посттрансплантационного периода в группе реципиентов с ПФТ по сравнению с уровнем групп ДФТ и ОПТ. Следует отметить, что корреляционный анализ выявил отрицательные связи абсолютного количества CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов с уровнем креатинина на 30-е и 90-е сутки и относительного количества данных лимфоцитов с уровнем креатинина на 90-е сутки (Spearman Rank Order Correlations  $r_{30\text{CD}3+\text{CD}16+\text{CD}56+\text{абс}/30\text{креатинин}} = -0,347, p=0,000264, r_{90\text{CD}3+\text{CD}16+\text{CD}56+\text{абс}/90\text{креатинин}} = -0,295, p=0,001095, r_{90\text{CD}3+\text{CD}16+\text{CD}56+\text{отн}/90\text{креатинин}} = -0,398, p=0,000003$ ).

## Заключение

1. В группе реципиентов с первично функционирующим почечным трансплантатом выявлен рост абсолютного и относительного уровня CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов (NKT) с 30-х суток посттрансплантационного периода.

2. Определена отрицательная связь абсолютного количества CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов с уровнем креатинина на 30-е и 90-е сутки и относительного количества данных лимфоцитов с уровнем креатинина на 90-е сутки.

3. Не обнаружена связь относительного и абсолютного количества CD3<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> лимфоцитов (NK) с уровнем креатинина на протяжении всего исследования.

4. Результаты исследования могут быть использованы для иммунологического мониторинга в раннем посттрансплантационном периоде.

## Литература

1. The CD6 scavenger receptor is differentially expressed on a CD56 natural killer cell subpopulation and contributes to natural killer-derived cytokine and chemokine secretion / M. Braun [et al.] // J. Innate Immun. – 2011. – Vol. 3, N 4. – P. 420–434.
2. CD94 surface density identifies a functional intermediary



between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets / J. Yu [et al.] // *Blood*. – 2010 Jan. – Vol. 115, N 2. – P. 274–281.

3. The Peripheral NK Cell Repertoire after Kidney Transplantation is Modulated by Different Immunosuppressive Drugs / C. Neudoerfl [et al.] // *Front Immunol.* – 2013 Feb. – Vol. 4. – P. 46.
4. Rajalingam, R. The impact of HLA class I-specific killer cell immunoglobulinlike receptors on antibody-dependent natural killer cell-mediated cytotoxicity and organ allograft rejection / R. Rajalingam // *Front Immunol.* – 2016 Dec. – Vol. 7. – P. 585.
5. Hadad, U. NK cells after transplantation: friend or foe / U. Hadad, O. Martinez, S. M. Krams // *Immunol. Res.* – 2014 May. – Vol. 58, N 2/3. – P. 259–267.
6. Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells / S. Laffont [et al.] // *Blood*. – 2008 Aug. – Vol. 112, N 3. – P. 661–671.
7. Godfrey, D. I. Going both ways: Immune regulation via CD Id-dependent NKT cells / D. I. Godfrey, M. Kronenberg // *J. Clin. Invest.* – 2004 Nov. – Vol. 114, N 10. – P. 1379–1388.
8. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis / P. T. Lee [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2002 Sep.

– Vol. 110, N 6. – P. 793–800.

9. Broad impairment of natural killer cells from operationally tolerant kidney transplanted patients / E. Dugast [et al.] // *Front Immunol.* – 2017 Dec. – Vol. 8. – P. 1721.
10. Bromberg, J. S. Evolving paradigms that determine the fate of an allograft / J. S. Bromberg, P. S. Heeger, X. C. Li // *Am. J. Transplant.* – 2010 May. – Vol. 10, N 5. – P. 1143–1148.
11. Development of a crossplatform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans / P. Sagoo [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2010 Jun. – Vol. 120, N 6. – P. 1848–1861.
12. Newell, K. A. Tolerance signatures in transplant recipients / K. A. Newell, L. A. Turka // *Curr. Opin Organ. Transplant.* – 2015 Aug. – Vol. 20, N 4. – P. 400–405.
13. Association of peripheral NK cell counts with Helios+ IFN- $\gamma$ - Tregs in patients with good long-term renal allograft function / K. Trojan [et al.] // *Clin. Exp. Immunol.* – 2017 Jun. – Vol. 188, N 3. – P. 467–479.
14. NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells / G. Yu [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2006 Aug. – Vol. 203, N 8. – P. 1851–1858.
15. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses / G. Deniz [et al.] // *J. Immunol.* – 2008 Jan. – Vol. 180, N 2. – P. 850–857.

Поступила 28.09.2020 г.

Принята в печать 11.12.2020 г.

## References

1. Braun M, Müller B, ter Meer D, Raffegerst S, Simm B, Wilde S, et al. The CD6 scavenger receptor is differentially expressed on a CD56 natural killer cell subpopulation and contributes to natural killer-derived cytokine and chemokine secretion. *J Innate Immun.* 2011;3(4):420–34. doi: 10.1159/000322720
2. Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park I, et al. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood.* 2010 Jan;115(2):274–81. doi: 10.1182/blood-2009-04-215491
3. Neudoerfl C, Mueller BJ, Blume C, Daemen K, Stevanovic-Meyer M, Keil J, et al. The Peripheral NK Cell Repertoire after Kidney Transplantation is Modulated by Different Immunosuppressive Drugs. *Front Immunol.* 2013 Feb;4:46. doi: 10.3389/fimmu.2013.00046
4. Rajalingam R. The impact of HLA class I-specific killer cell immunoglobulinlike receptors on antibody-dependent natural killer cell-mediated cytotoxicity and organ allograft rejection. *Front Immunol.* 2016 Dec;7:585. doi: 10.3389/fimmu.2016.00585
5. Hadad U, Martinez O, Krams SM. NK cells after transplantation: friend or foe. *Immunol Res.* 2014 May;58(2-3):259–67. doi: 10.1007/s12026-014-8493-4
6. Laffont S, Cyril S, Ortaldo J, Coudert JD, Guéry J-C. Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells. *Blood.* 2008 Aug;112(3):661–71. doi: 10.1182/blood-2007-10-120089
7. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD Id-dependent NKT cells. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(10):1379–88. doi: 10.1172/JCI23594
8. Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA,

Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. *J Clin Invest.* 2002 Sep;110(6):793–800. doi: 10.1172/JCI15832

9. Dugast E, David G, Oger R, Danger R, Judor J-P, Gagne K, et al. Broad impairment of natural killer cells from operationally tolerant kidney transplanted patients. *Front Immunol.* 2017 Dec;8:1721. doi: 10.3389/fimmu.2017.01721
10. Bromberg JS, Heeger PS, Li XC. Evolving paradigms that determine the fate of an allograft. *Am J Transplant.* 2010 May;10(5):1143–8. doi: /10.1111/j.1600-6143.2010.03033.x
11. Sagoo P, Perucha E, Sawitzki B, Tomiuk S, Stephens DA, Miqueu P, et al. Development of a crossplatform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest.* 2010 Jun;120(6):1848–61. doi: 10.1172/JCI39922
12. Newell KA, Turka LA. Tolerance signatures in transplant recipients. *Curr Opin Organ Transplant.* 2015 Aug;20(4):400–5. doi: 10.1097/MOT.0000000000000207
13. Trojan K, Zhu L, Aly M, Weimer R, Bulut N, Morath C, et al. Association of peripheral NK cell counts with Helios+ IFN- $\gamma$ - Tregs in patients with good long-term renal allograft function. *Clin Exp Immunol.* 2017 Jun;188(3):467–479. doi: 10.1111/cei.12945
14. Yu G, Xu X, Vu MD, Kilpatrick ED, Li XC. NK cells promote transplant tolerance by killing donor antigen-presenting cells. *J Exp Med.* 2006 Aug;203(8):1851–8. doi: 10.1084/jem.20060603
15. Deniz G, Erten G, Can Küçüksezer U, Kocacik D, Karagiannidis C, Aktas E, et al. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol.* 2008 Jan;180(2):850–7. doi: 10.4049/jimmunol.180.2.850

Submitted 28.09.2020

Accepted 11.12.2020

**Сведения об авторах:**

Зыблева С.В. – к.м.н., ученый секретарь, врач-иммунолог, Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3061-5324>;

Зыблев С.Л. – к.м.н., доцент, врач-хирург хирургического отделения (трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии), Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека,

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0968-6630>.

**Information about authors:**

*Zybleva S.V. – Candidate of Medical Sciences, academic secretary, immunologist, Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology;*

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3061-5324>;*

*Zyblev S.L. – Candidate of Medical Sciences, associate professor, surgeon of the surgical department (transplantation, reconstructive and endocrine surgery), Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology,*

*ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0968-6630>.*

**Адрес для корреспонденции:** Республика Беларусь, 246000, г. Гомель, ул. Ильича, 290, Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, научный отдел. E-mail: [zyb-svetlana@yandex.by](mailto:zyb-svetlana@yandex.by) – Зыблева Светлана Валерьевна.

**Correspondence address:** Republic of Belarus, 246000, Gomel, 5 Iliche str., Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Scientific Department. E-mail: [zyb-svetlana@yandex.by](mailto:zyb-svetlana@yandex.by) – Svetlana V. Zybleva.