

УРОВЕНЬ CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПРОГНОЗЕ РАННЕЙ ДИСФУНКЦИИ ТРАНСПЛАНТАТА ПОЧКИ

Зыблева С. В., Зыблев С. Л.

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

Введение. Даблпозитивные CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Т-лимфоциты имеют большое значение в реакциях иммунного ответа на различные инфекционные агенты. В модели трансплантации островков поджелудочной железы CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Т-клетки описаны как маркеры отторжения донорских клеток.

Цель. Изучить количество CD3⁺CD4⁺CD8⁺ даблпозитивных Т-лимфоцитов до пересадки почки у пациентов с ранней дисфункцией почечного трансплантата.

Материал и методы. Обследованы 199 реципиентов, которым выполнена трансплантация почки. Определяли уровень CD3⁺CD4⁺CD8⁺ перед операцией. Всех пациентов разделили на две группы: с первичной функцией трансплантата (ПФТ) и с дисфункцией трансплантата (ДФТ). Провели корреляционный анализ между значениями CD3⁺CD4⁺CD8⁺ и показателями биомаркеров функции почечного трансплантата на седьмые сутки.

Результаты. Перед операцией у реципиентов с ранней дисфункцией трансплантата уровень CD3⁺CD4⁺CD8⁺ был значимо ниже показателя в группе с первичной функцией донорского органа. Определены значения CD3⁺CD4⁺CD8⁺ для прогнозирования развития ранней дисфункции почечного трансплантата.

Выводы. Показатель CD3⁺CD4⁺CD8⁺ у реципиентов перед трансплантацией почки может быть использован для прогнозирования развития ранней дисфункции почечного трансплантата.

Ключевые слова. CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Т-лимфоциты, дисфункция трансплантата почки.

Для цитирования: Зыблева, С. В. Уровень CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов в прогнозе ранней дисфункции трансплантата почки / С. В. Зыблева, С. Л. Зыблев // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2020. Т. 18, № 1. С. 17-20. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-1-17-20>.

Введение

Регуляторные Т-лимфоциты играют важную роль при разных заболеваниях [1]. Одной из субпопуляций Т-регуляторных лимфоцитов являются даблпозитивные CD3⁺CD4⁺CD8⁺ Т-лимфоциты (ДП Т-лимфоциты). Рост количества этих клеток остается во многом необъяснимым, хотя считается, что данная субпопуляция может иметь большое значение в реакциях иммунного ответа на различные инфекционные агенты. Имеются сведения о повышении содержания ДП Т-лимфоцитов при длительной антигенной стимуляции, при персистирующей патологии [2]. Повышение уровня ДП Т-клеток отмечается при ряде вирусных инфекций [3]. Так, при вирусном иммунодефиците человека или Эпштейна-Барр вирусной инфекции соотношение ДП Т-клеток может возрасти до 20% от всех циркулирующих лимфоцитов [4]. Кроме того, доля ДП Т-лимфоцитов в крови может увеличиваться, или они могут быть локализованы в определенных тканях при некоторых заболеваниях, связанных с воспалительным процессом аутоиммунной природы, характеризующихся хронической активацией лимфоцитов [5, 6]. Кроме того, CD4⁺CD8⁺ Т-клетки секретируют такие цитокины, как IFN- γ , IL-4 и IL-21 в ответ на антигены в количествах, эквивалентных секретируемым CD4 или CD8 Т-клетками. А содержание перфорина и гранзимов в CD4⁺CD8⁺ Т-клетках сравнимо с таковым в CD8⁺ Т-клетках, что свидетельствует об участии данной субпопуляции в процессах лизиса клеток, инфицированных вирусом [3].

Что касается роли данной субпопуляции в трансплантологии, некоторыми авторами показано, что увеличение количества ДП Т-клеток в

модели трансплантации островков поджелудочной железы было ассоциировано с отторжением трансплантата. Учитывая полученные данные, авторы предположили, что периферические ДП Т-клетки, обладающие как хелперной, так и цитотоксической активностью *in vitro*, могут выступать в качестве нового биомаркера для диагностики отторжения [7].

Таким образом, периферические ДП Т-клетки имеют две разные функции *in vitro*: хелперную и цитотоксическую. Кроме того, результаты модели трансплантации островков поджелудочной железы свидетельствуют о том, что эта клеточная популяция может быть важным биомаркером (наряду с CD8 Т-клетками) отторжения трансплантата.

В данной статье представлены результаты изучения динамики CD3⁺CD4⁺CD8⁺ даблпозитивных Т-лимфоцитов у пациентов с ранней дисфункцией трансплантата почки.

Цель – изучить количество CD3⁺CD4⁺CD8⁺ даблпозитивных Т-лимфоцитов до пересадки почки у пациентов с ранней дисфункцией почечного трансплантата.

Материал и методы

Работа выполнена на базе ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека» (ГУ «РНПЦ РМиЭЧ») г. Гомеля. Изучали результаты обследования 199 реципиентов почечного трансплантата с терминальной стадией хронической болезни почек (тХБП), которым выполнена трансплантация аллогенной почки в хирургическом отделении (трансплантации, реконструктивной и эндокринной хирургии) ГУ «РНПЦ РМиЭЧ».

Клиническое исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией 1975 г. и одобрено комитетом по этике ГУ «РНПЦ РМи-ЭЧ» (протокол № 5 от 02.12.2013).

Всем пациентам определяли уровень $CD3^+CD4^+CD8^+$ перед операцией. Ранняя функция почечного трансплантата оценивалась на 7-е сутки после операции по уровню креатинина в крови и необходимости проведения диализа. При показателях ниже 300 мкмоль/л функция считалась первичной (ПФТ), при значениях, равных или превышающих 300 мкмоль/л, а также при возникновении необходимости в диализе на первой неделе после трансплантации состояние классифицировалось как дисфункция почечного трансплантата (ДФТ) [8]. Критерии включения в группу исследования: первичная почечная трансплантация; индукционная терапия моноклональными анти-CD25-антителами; трехкомпонентная иммуносупрессивная терапия.

Мужчин в данной группе было 123 (62%), женщин – 76 (38%). Возраст в изучаемой группе – от 19 до 71 года, средний возраст составил $45,72 \pm 0,87$ [43,99; 47,44] года. До трансплантации 159 (80%) пациентов находились на программном гемодиализе и 37 (18,6%) – на перитонеальном диализе, три пациента (1,5%) были на додиализной стадии. Среднее время холдовой ишемии – $12,14 \pm 0,32$ часа. Отрицательный результат прямой перекрестной пробы (cross-match) наблюдался в 100% случаев.

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

Для определения иммунологических особенностей реципиентов почечного трансплантата применяли методику проточной цитометрии. Иммунологическое обследование пациентов проводилось перед операцией, на первые, третьи и седьмые сутки после операции.

Забор крови производили из локтевой вены, в пробирки с антикоагулянтом (ЭДТА). Для определения экспрессии поверхностных маркеров даблпозитивных и даблнегативных Т-лимфоцитов методом проточной цитометрии выполняли пробоподготовку по безотмывочной технологии в панели оценки активационной способности Т-лимфоцитов. К 100 мкл крови добавляли моноклональные антитела CD4PC7, CD8FITC, CD38PE, CD3PC5.5, Anti-HLADR APC (Beckman Coulter и BD, США) в объемах, рекомендуемых фирмой-производителем. Инкубировали 15 минут в темноте при комнатной температуре. Для лизиса эритроцитов использовали лизирующий раствор OptiLyse В. Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (BD, США). Накапливали не менее 10000 событий. Популяцию Т-лимфоцитов определяли как $CD3^+$ клетки в гейте SScLowCD45+bright, характерной для лимфоцитов. Оценку даблпозитивной популяции производили по гистограмме, гейтированной по $CD3^+$ Т-лимфоцитам по соотношению $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток. В квадранте $CD3^+CD4^+CD8^+$

определялись даблпозитивные Т-лимфоциты. Для вычисления абсолютного содержания даблпозитивных Т-лимфоцитов использовали результат общего анализа крови, выполнявшегося из данной пробирки в тот же день.

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

Результаты и обсуждение

По результатам исследования пациентов с ПФТ было 104 (52%) реципиента, ДФТ – 95 (48%). Результаты биохимического обследования пациентов изучаемых групп представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Показатели биохимического анализа крови реципиентов на седьмые сутки после операции (Me [Q25; Q75])

Table 1. – Indices of biochemical blood analysis in recipients on the 7th day after transplantation (Me [Q25; Q75])

Показатель	ПФТ, n=104	ДФТ, n=95	p, Mann-Whitney U Test
Креатинин, мкмоль/л	149,0 116,0; 197,0	525,0 360,0; 707,0	0,000000
Мочевина, моль/л	10,2 7,8; 14,5	23,8 17,3; 34,4	0,000000
Цистацин С, мг/л	1,83 1,26; 1,92	3,98 2,59; 4,41	0,000000
β 2-микрोगлобулин, мкг/л	2,14 1,89; 3,42	5,4 4,74; 9,16	0,000001

Выявлено значимое различие как в абсолютных, так и в относительных предоперационных уровнях субпопуляции $CD3^+CD4^+CD8^+$ даблпозитивных Т-лимфоцитов у реципиентов ДФТ и ПФТ, что представлено в таблице 2.

Учитывая полученные результаты, нами проведен корреляционный анализ между значениями изучаемых субпопуляций Т-лимфоцитов и показателями биомаркеров функции почечного трансплантата на седьмые сутки (табл. 3).

На основании полученных данных можно предположить, что определение количества $CD3^+CD4^+CD8^+$ даблпозитивных Т-лимфоцитов у реципиентов перед трансплантацией почки может быть использовано в качестве дополнительного лабораторного критерия прогнозиро-

Таблица 2. – Показатели CD3⁺CD4⁺CD8⁺ даблпозитивных Т-лимфоцитов у реципиентов почечного трансплантата (Me [Q25; Q75])

Table 2. – Indices of CD3⁺CD4⁺CD8⁺ double-positive T-lymphocytes in kidney transplant recipients (Me [Q25; Q75])

Единицы измерения	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ даблпозитивные Т-лимфоциты		
	ПФТ	ДФТ	p, Mann-Whitney U Test
%	2,03 [1,2; 3,11]	1,32 [0,78; 1,75]	0,000001
10 ⁹ кл/л	0,01[0,005; 0,018]	0,005 [0,004; 0,009]	0,006

Таблица 3. – Уровень корреляции между показателями CD3⁺CD4⁺CD8⁺ даблпозитивных Т-лимфоцитов перед операцией и биомаркеров функции почечного трансплантата на седьмые сутки (Spearman Rank Order Correlations)

Table 3. – The level of correlation between the indices of CD3⁺CD4⁺CD8⁺ double-positive T-lymphocytes before transplantation and biomarkers of kidney allograft function on the 7th day (Spearman Rank Order Correlations)

Показатель	Ед. изм.	Коэффициент корреляции, r (p)			
		Креатинин	Мочевина	Цистацин С	β2-микроглобулин
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ Т-лимфоциты	отн., %	-0,41 p=0,00001	-0,3 p=0,0006	-0,54 p=0,0001	-0,62 p=0,00002
	10 ⁹ кл/л	-0,22 p=0,042	-0,27 p=0,012	-0,2 p=0,178	-0,43 p=0,019

Таблица 4. – Диагностические характеристики предоперационного уровня CD3⁺CD4⁺CD8⁺ даблпозитивных Т-лимфоцитов в прогнозировании развития дисфункции почечного трансплантата

Table 4. – Diagnostic characteristics of the preoperative level of CD3⁺CD4⁺CD8⁺ double-positive T-lymphocytes in predicting the development of kidney allograft dysfunction

Показатель		S под кривой	Точка отсечения	Чувствительность	Специфичность	95% ДИ
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ Т-лимфоциты	отн., %	0,755 p<0,001	>1,633	0,742	0,700	76,1 [65,3; 86,9]
	10 ⁹ кл/л	0,662 p=0,006	>0,007	0,640	0,612	63,8 [50,8; 76,9]

вания развития ранней дисфункции почечного трансплантата.

Выводы

1. Прогнозировать развитие ранней дисфункции почечного трансплантата можно на основании определения у реципиентов предоперационного уровня субпопуляции CD3⁺CD4⁺CD8⁺ даблпозитивных Т-лимфоцитов.

Литература

- Regulation of antigen-expressing dendritic cells by double negative regulatory T cells / J. F. Gao [et al.] // Eur. J. Immunol. – 2011. – Vol. 41, № 9. – P. 2699-2708. – doi: 10.1002/eji.201141428.
- Субпопуляционный состав лимфоцитов периферической крови у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией / Н. В. Балацкая [и др.] // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, № 5. – С. 461-466. – doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-461-466.
- Peripheral CD4(+)/CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions / M. Nascimbeni [et al.] // Blood. – 2004. – Vol. 104, № 2. – P. 478-486. – doi: 10.1182/blood-2003-12-4395.
- Хайдуков, С. В. Малые субпопуляции Т-хелперов (Th наивные тимические, Th наивные центральные, TH9, TH22 и CD4⁺CD8⁺ дважды положительные Т-клетки) / С. В. Хайдуков // Медицинская иммунология. – 2013. – Т. 15, № 6. – С. 503-512. – doi: 10.15789/1563-0625-2013-6-503-512.
- Presence of CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis / Y. Parel [et al.] // Arthritis Rheum. – 2007. – Vol. 56, № 10. – P. 3459-3467. – doi: 10.1002/art.22927.
- CD4⁺CD8⁺ (thymocyte-like) T lymphocytes present in blood and skin from patients with atopic dermatitis suggest immune dysregulation / K. Bang [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2001. – Vol. 144, № 6. – P. 1140-1147. – doi: 10.1046/j.1365-2133.2001.04223.x.
- CD4^{hi}CD8^{low} Double-Positive T Cells Are Associated with Graft Rejection in a Nonhuman Primate Model of Islet Transplantation / Y. J. Choi [et al.] // J. Immunol. Res. – 2018. – Vol. 2018, № 3861079. – P. 1-11. – doi: 10.1155/2018/3861079.
- Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin Is an Early and Accurate Biomarker of Graft Function and Tissue Regeneration in Kidney Transplantation from Extended Criteria Donors / V. Cantaluppi [et al.] // PLoS ONE. – 2015. – Vol. 10, № 6. – P. 1-19. – doi: 10.1371/journal.pone.0129279.

References

- Gao JF, McIntyre MS, Juvet SC, Diao J, Li X, Vanama RB, Mak TW, Cattral MS, Zhang L. Regulation of antigen-expressing dendritic cells by double negative regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 2011;41(9):2699-708. doi: 10.1002/eji.201141428.
- Balackaja NV, Eremeeva EA, Slepova OS, Rjabina MV, Kulikova IG, Sorozhkina ES. Subpopuljacionnyj sostav limfocitov perifericheskoj krovi u pacientov s vozrastnoj makuljarnoj degeneracijej [Peripheral blood subpopulation of lymphocytes of patients with age-related macular degeneration]. *Medicinskaja immunologija* [Medical Immunology]. 2015;17(5):461-466. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-461-466. (Russian).
- Nascimbeni M, Shin EC, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehmann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood.* 2004;104(2):478-486. doi: 10.1182/blood-2003-12-4395.
- Hajdukov SV. Malye subpopuljaciej T-helperov (Th naivnye timicheskie, Th naivnye centralnye, TH9, TH22 I CD4+CD8+ dvazhdy polozhitelnye T-kletki) [Minor subsets of T-helper cells (Th thymic naive, Th central naive, Th9, Th22 and CD4+CD8+ double positive T-cells)]. *Medicinskaja immunologija* [Medical Immunology]. 2013;15(6):503-512. doi: 10.15789/1563-0625-2013-6-503-512. (Russian).
- Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer JM, Roosnek E, Chizzolini C. Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007;56(10):3459-3467. doi: 10.1002/art.22927.
- Bang K, Lund M, Wu K, Mogensen SC, Thestrup-Pedersen K. CD4+ CD8+ (thymocyte-like) T lymphocytes present in blood and skin from patients with atopic dermatitis suggest immune dysregulation. *Br. J. Dermatol.* 2001;144(6):1140-1147. doi: 10.1046/j.1365-2133.2001.04223.x.
- Choi YJ, Park HJ, Park HJ, Jung KC, Lee JI. CD4(hi) CD8(low) Double-Positive T Cells Are Associated with Graft Rejection in a Nonhuman Primate Model of Islet Transplantation. *J. Immunol. Res.* 2018;2018:3861079:1-11. doi: 10.1155/2018/3861079.
- Cantaluppi V, Dellepiane S, Tamagnone M, Medica D, Figliolini F, Messina M, Manzione AM, Gai M, Tognarelli G, Ranghino A, Dolla C, Ferrario S, Tetta C, Segoloni GP, Camussi G, Biancone L. 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.

CD3⁺CD4⁺CD8⁺ T-LYMPHOCYTES COUNT IN PROGNOSIS OF EARLY KIDNEY ALLOGRAFT DYSFUNCTION

Zybleva S. V., Zyblev S. L.

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

Background. Double-positive CD3⁺CD4⁺CD8⁺ T-lymphocytes are significant in the immune response to various infectious agents. Pancreatic islet transplantation in the experiment characterizes CD3⁺CD4⁺CD8⁺ as a new biomarker for donor cells rejection.

Objective. To study the indices of CD3⁺CD4⁺CD8⁺ double-positive T-lymphocytes before kidney transplantation in patients with early allograft dysfunction.

Material and Methods. We examined 199 recipients who underwent kidney transplantation. CD3⁺CD4⁺CD8⁺ count was determined before transplantation. All the patients were divided into 2 groups: those with primary graft function (PGF) and those with graft dysfunction (PGD). A correlation analysis was performed between the values of CD3⁺CD4⁺CD8⁺ and the biomarkers indices of allograft function on the 7th day.

Results. Before transplantation the CD3⁺CD4⁺CD8⁺ count was significantly lower in recipients with early allograft dysfunction as compared to the group with primary allograft function. The CD3⁺CD4⁺CD8⁺ indices were determined to predict the development of early allograft dysfunction.

Conclusions. The CD3⁺CD4⁺CD8⁺ indices in recipients before kidney transplantation can be used to predict the development of early allograft dysfunction.

Keywords: CD3⁺CD4⁺CD8⁺ T-lymphocytes, kidney graft dysfunction.

For citation: Zybleva SV, Zyblev SL. CD3⁺CD4⁺CD8⁺ T-lymphocytes count in prognosis of early kidney allograft dysfunction. *Journal of the Grodno State Medical University.* 2020;18(1):17-20. <http://dx.doi.org/10.25298/2221-8785-2020-18-1-17-20>.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Conformity with the principles of ethics. The study was approved by the local ethics committee.

Об авторах / About the authors

*Зыблева Светлана Валерьевна / Zybleva Svetlana, e-mail: zyb-svetlana@yandex.ru, ORCID: 0000-0003-3061-5324

Зыблев Сергей Леонидович / Zyblev Sergey, e-mail: s.zyblev@yandex.by, ORCID: 0000-0002-0968-6630

* – автор, ответственный за переписку / corresponding author

Поступила / Received: 16.11.2019

Принята к публикации / Accepted for publication: 17.01.2020