

ВОЗМОЖНОСТИ НЕИНВАЗИВНОЙ ДИАГНОСТИКИ ОТТОРЖЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТА ПЕЧЕНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕРМИНАЛЬНО-ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ЭФФЕКТОРНЫХ CD8+ Т-ЛИМФОЦИТОВ

^{1,2}С. В. Коротков, ²В. Н. Смольникова, ²В. Ю. Гриневич, ³О. А. Лебедь, ²М. Н. Василенко, ²Д. Ю. Ефимов, ^{1,2}А. М. Федорук, ^{1,2}А. Е. Щерба, ²С. И. Кривенко, ^{1,2}О. О. Руммо

¹Белорусская медицинская академия последипломного образования, Минск, Беларусь

²Минский научно-практический центр хирургии трансплантологии и гематологии, Минск, Беларусь

³Городское клиническое патологоанатомическое бюро" г. Минска, Минск, Беларусь

Введение. Одна из главнейших проблем современной трансплантологии – иммунологическая дисфункция трансплантата, частота развития которой достигает 40%. Пункционная биопсия в 2,2% случаев сопряжена с развитием осложнений и может привести к летальному исходу.

Цель исследования – разработка методики неинвазивной диагностики отторжения трансплантата печени в отдаленном периоде после операции с использованием терминально-дифференцированных эффекторных CD8+Т-лимфоцитов.

Материал и методы. Проведено пилотное одноцентровое обсервационное ретроспективное случай-контроль исследование, включающее 45 реципиентов после ортотопической трансплантации печени. По клиническому течению послеоперационного периода пациенты стратифицировались на 2 группы в зависимости от наличия эпизодов отторжения в трансплантате. Все пациенты после трансплантации получали иммуносупрессивную терапию. Иммунофенотипы реципиентов определялись методом проточной цитофлуориметрии. Всем пациентам была выполнена пункционная биопсия трансплантата.

Результаты. Результаты исследования биоптатов трансплантатов печени показали, что 14 пациентов (31%) из 45 имели морфологические признаки отторжения. У пациентов с отторжением был достоверно более высокий уровень абсолютного количества CD8+ Тетра-клеток, что составило $0,23 (0,14; 0,38) \times 10^9/\text{л}$ по сравнению с пациентами без отторжения – $0,09 (0,034; 0,16) \times 10^9/\text{л}$ ($p=0,034$). Результаты ROC-анализа показали, что наиболее оптимальный порог отсеивания уровня CD8+ Тетра-лимфоцитов при диагностике иммунологической дисфункции трансплантата печени в отдаленном периоде составил $0,1882 \times 10^9/\text{л}$, чувствительность и специфичность при данном пороге отсеивания составила 73,33 (95% ДИ: 44,9-92,0) и 96,55 (95% ДИ: 82,2-99,4,) соответственно.

Выводы. Увеличение абсолютной численности терминально-дифференцированных эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов является диагностическим критерием у пациентов с иммунологической дисфункцией трансплантата в позднем посттрансплантационном периоде. Высокая чувствительность и специфичность порога отсеивания абсолютного количества CD8+ Тетра-лимфоцитов у пациентов после трансплантации печени и достоверная разница между количеством клеток у пациентов с нормальным послеоперационным течением, имеющих иммунологическую дисфункцию трансплантата, позволяет рассматривать субпопуляцию Т-лимфоцитов как прогностический биомаркер отторжения в позднем посттрансплантационном периоде. Корреляция этого показателя с результатами морфологического исследования делает его альтернативным и, главное, безопасным неинвазивным способом ранней диагностики отторжения.

Ключевые слова: трансплантация печени, отторжение, биомаркеры, CD8+ Т-лимфоциты.

THE OPPORTUNITIES OF NON-INVASIVE LIVER GRAFT REJECTION DIAGNOSTICS BY USING TERMINALLY DIFFERENTIATED EFFECTOR CD8+ T-LYMPHOCYTES

^{1,2}S. V. Korotkov, ²V. N. Smolnikova, ²V. Y. Hrynevich, ³O. A. Lebed, ²M. N. Vasilenka, ²D. Y. Efimov, ^{1,2}A. M. Fedoruk, ^{1,2}A. E. Shcherba, ²S. I. Kryvenka, ^{1,2}O. O. Rummo

¹Belorussian Medical Academy of Postgraduate Education, Transplantology Department, Minsk, Belarus

²Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Belarus

³City Clinical Pathologoanatomic Bureau, Minsk, Belarus

Background. Immune-mediated graft dysfunction with the prevalence of 40% is one of the main problems of modern transplantology. Although percutaneous liver graft biopsy is associated with the development of different complications occurring in 2,2% of cases and can also lead to fatal outcome.

Objective – to develop a noninvasive method of graft dysfunction diagnostics in the late post-transplant period using terminally differentiated effector CD8+ T-lymphocytes.

Material and methods. There was carried out a single center observational retrospective case-control pilot study, including 45 recipients after orthotopic liver transplantation. According to the postoperative clinical course the patients were stratified into 2 groups depending on the presence of graft rejection episodes. All patients got immunosuppressive therapy after liver transplantation. Immunophenotypes of the recipients were determined by flow cytometry method. Percutaneous liver graft biopsy was performed in all patients, the results of histological examination were evaluated according to the international Banff schema for grading liver allograft rejection.

Results. The results of liver biopsies showed that 14 (31%) out of 45 patients had morphological signs of rejection. The patients with rejection had a reliably higher level of CD8+ Temra cells absolute number ($0,23 (0,14;0,38) \times 10^9/l$) in comparison to those without rejection ($0,09 (0,034;0,16) \times 10^9/l$) ($p=0,034$). The results of ROC-analysis have shown that the most optimal cut-off threshold of CD8+ T-lymphocytes level in immune-mediated graft dysfunction diagnostics in the late post-transplant period is $0,1882 \times 10^9/l$; sensitivity and specificity in this case being 73,33 (95%; 44,9-92,0) and 96,55 (95%; 82,2-99,4) respectively.

Conclusions. The increase of terminally differentiated effector CD8+ T-lymphocytes absolute number has diagnostic importance in patients with immune-mediated graft dysfunction in the late post-transplant period. High sensitivity and specificity of cut-off threshold of CD8+ Temra lymphocytes absolute number in patients after liver transplantation as well as reliable difference between cell number in patients with normal postoperative period and in patients with immune-mediated graft dysfunction allow considering T-lymphocyte subpopulation as a rejection predictor in the late post-transplant period. The correlation between CD8+ T-lymphocyte absolute number and the results of histological examination makes the former an alternative and, what is more, safe noninvasive method in early diagnostics of liver graft rejection.

Keywords: liver transplantation, rejection, biomarkers, CD8+ T-lymphocytes.

Автор, ответственный за переписку:

Коротков Сергей Владимирович, канд. мед. наук, доц., ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»; e-mail: skorotkov@tut.by

Corresponding author:

Korotkov Sergey V., PhD (Medicine), Associate Professor; Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology; e-mail: skorotkov@tut.by

Для цитирования: Возможности неинвазивной диагностики отторжения трансплантата печени с использованием терминально-дифференцированных эффекторных CD8+ T-лимфоцитов / С. В. Коротков, В. Н. Смольникова, В. Ю. Гриневич, О. А. Лебедь, М. Н. Василенко, Д. Ю. Ефимов, А. М. Федорук, А. Е. Щерба, С. И. Кривенко, О. О. Руммо // Гепатология и гастроэнтерология. 2020. Т. 4, № 2. С. 177-183. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2020-4-2-177-183>.

For citation: Korotkov SV, Smolnikova VN, Hrynevich VY, Lebed OA, Vasilenka MN, Efimov DY, Fedoruk AM, Shcherba AE, Kryvenka SI, Rummo OO. Opportunities of non-invasive liver graft rejection diagnostic by using of terminally differentiated effector CD8+ T-lymphocytes. *Hepatology and Gastroenterology*. 2020;4(2):177-183. <https://doi.org/10.25298/2616-5546-2020-4-177-183>.

Введение

Ортопическая трансплантация печени (ОТП) – метод выбора лечения пациентов с терминальными стадиями хронических диффузных заболеваний печени, врожденными метаболическими ее поражениями, врожденной атрезией желчных протоков и в ряде случаев с первичным и вторичным опухолевым поражением печени.

Одна из главных проблем современной трансплантологии – борьба с отторжением трансплантата, включая поиск наиболее чувствительных и специфичных предикторов отторжения, позволяющих распознавать осложнение на ранней стадии и своевременно начинать терапию. Наряду с постоянным совершенствованием схем иммуносупрессивной терапии проблема отторжения трансплантата по-прежнему является одной из главных причин его дисфункции и даже потери в посттрансплантационном периоде. По данным литературы, частота острого клеточного отторжения трансплантата печени колеблется в пределах от 20 до 40% [1].

Мировым «золотым» стандартом диагностики отторжения является биопсия, однако этот ме-

тод из-за инвазивности сопряжен с риском развития осложнений. По данным мультицентрового ретроспективного исследования, включающего более 68.000 пациентов, частота осложнений после проведенных пункционных биопсий печени составила порядка 2,2% [2]. В структуре осложнений пункционной биопсии печени выделены геморрагические осложнения: гемоперитонеум (0,32%), гемобилия (0,059%), внутрипеченочная гематома (0,059%); осложнения со стороны органов дыхательной системы: гемоторакс (0,18%), пневмоторакс (0,35%), пункция лёгкого (0,14%); осложнения, связанные с повреждением других органов: почки (0,29%), желчного пузыря (0,117%), толстой кишки (0,44%), желчный перитонит (0,22%). Инфекционные осложнения составили 0,09%, летальный исход отмечен в соотношении 1:10.000 пациентов, или в 0,2% случаев [2].

Учитывая такое количество и спектр неблагоприятных исходов пункционной биопсии трансплантата печени, проблема раннего выявления признаков возможного отторжения путем определения его предикторов в крови является актуальной.

Одним из потенциальных биомаркеров иммунологического конфликта при трансплантации печени может стать субпопуляция CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов (Т-киллеров), которые считаются одними из главных эффекторов иммунологической аллореактивности [3].

По данным литературы, наибольшим интересом в качестве ранней диагностики отторжения графта характеризуются наиболее дифференцированные субпопуляции CD8+ Т-лимфоцитов – терминально дифференцированные эффекторные клетки памяти (Тemга). Эти клетки по отношению к другим субпопуляциям Т-лимфоцитов обладают наиболее выраженным цитолитическим потенциалом, играя ведущую роль в инициации и продвижении процесса отторжения [4].

В одном из исследований показано, что повышение уровня CD8+ Тemга лимфоцитов после операции трансплантации почки увеличивало риск развития иммунологической дисфункции пересаженной почки в 2 раза [5]. Подобные данные получены у пациентов после трансплантации лёгких, в частности, установлено, что повышение уровня CD8+ Т-лимфоцитов происходило при развитии острого отторжения [6].

Отличительной особенностью терминально-дифференцированных эффекторных клеток памяти является выраженная экспрессия цитотоксических молекул (перфорин, гранзим-В) и ИФН- γ , а также экспрессия факторов транскрипции (T-bet, Blimp-1, Eomes), что в совокупности делает эти клетки основной движущей силой повреждения графта при отторжении [4, 7, 8, 9, 10]. Изменение их количества в крови у пациентов до и после трансплантации органов может рассматриваться как потенциальный маркер возможного отторжения трансплантата [3].

Цель исследования – разработка неинвазивной методики диагностики отторжения трансплантата печени путем определения уровня субпопуляций цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов в периферической крови.

Материал и методы

Дизайн исследования. Проведено пилотное одноцентровое обсервационное ретроспективное случай-контроль исследование, включающее пациентов после трансплантации печени.

Характеристика пациентов. В исследование были включены 45 реципиентов после ОТП (табл. 1). Критерии включения в исследование: пациенты старше 18 лет, первичная трансплантация печени, срок наблюдения после операции 3 года и более. Критерии исключения: вирусные (HBV, HCV) и аутоиммунные (ПБЦ, ПСХ, АИГ) заболевания печени.

По клиническому течению послеоперационного периода пациенты стратифицированы на 2 группы с учетом наличия эпизодов отторжения в

Таблица 1. – Характеристика пациентов по патологии печени

Table 1. – Characteristics of patients by kind of liver disorders

Нозология	Количество пациентов	
Недостаточность альфа-1-антитрипсина	2	4%
Альвеококкоз	2	4%
Алиментарно-токсический	14	31%
Болезнь Бадда-Киари	1	2%
Вторичный билиарный цирроз	4	9%
Болезнь Вильсона-Коновалова	5	11%
Первичный билиарный цирроз	2	4%
Болезнь Гирке	1	2%
Криптогенный цирроз печени	6	13%
Первичный склерозирующий холангит	1	2%
Холангиоцеллюлярная карцинома	2	4%
Эпителиоидная гемангиоэндотелиома	4	9%
Фульминантный гепатит (прием НПВС)	1	2%

трансплантате. Первую группу (REJ) составили 9 реципиентов, которые на фоне стандартной либо усиленной иммуносупрессивной терапии имели эпизоды кризов отторжения в послеоперационном периоде. Вторую группу (noREJ) сформировали 36 реципиентов, у которых послеоперационный период протекал без признаков иммунологической дисфункции.

Иммуносупрессивная терапия. Все пациенты после трансплантации получали иммуносупрессивную терапию. Из 36 пациентов второй группы (noREJ) 27 (60%) получали монотерапию такролимусом (Тас), один (2,2%) пациент – мофетила микофенолатом (ММФ); трое (6,7%) пациентов находились на двухкомпонентной схеме Тас + ММФ, один (2,2%) – Тас + сертикан; и четверо (8,9%) пациентов из-за почечной дисфункции получали двухкомпонентную схему мофетил микофенолатом с глюкокортикостероидами (ГКС).

В группе пациентов REJ все они получали многокомпонентную иммуносупрессивную терапию: двое (4,4%) пациентов после операции получали иммуносупрессивную терапию Тас + ММФ, трое (6,7%) – Тас + ГКС и четверо (8,9%) – трехкомпонентную иммуносупрессию – Тас + ММФ + ГКС (табл. 2).

Цитофлуометрический анализ субпопуляций Т-лимфоцитов. Иммунофенотип реципиентов – уровень CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов и их субпопуляций (naïve Т-клеток, Тcm, Тem и TEMRA) определялись методом проточной цитофлуометрии в соответствии со стандартизированным протоколом [11].

Гистологическое исследование трансплантатов печени. Всем пациентам была вы-

Таблица 2. – Иммуносупрессивная терапия пациентов после трансплантации печени

Table 2. – Immunosuppressive therapy after liver transplantation

Схема иммуносупрессивной терапии	noREJ (n=36)		REJ (n=9)	
	Число	Процент	Число	Процент
Монотерапия такролимусом	27	60%	-	-
Монотерапия ММФ	1	2,2%	-	-
Тас + ММФ	3	6,7%	2	4,4%
Тас + ГКС	-	-	3	6,7%
Тас + сертикан	1	2,2%	-	-
Тас + ММФ + ГКС	-	-	4	8,9%
ММФ + ГКС	4	8,9%	-	-

полнена пункционная биопсия трансплантата. Результаты гистологического исследования оценивались в соответствии с Международной стандартизированной классификацией Banff 1995 г. и 1997 г. пересмотра [12].

Статистический анализ. Значения показателей в данной статье представлены преимущественно в виде Me (25-75), где Me – Медиана, а 25-75 – интерквартильный размах между 25-й и 75-й процентилями. Для оценки нормальности распределения количественных признаков использовался критерий Шапиро-Уилка. Для сравнения двух выборок применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Результаты считали статистически значимыми при уровне значимости $p \leq 0,05$. С целью оценки диагностической значимости разработанной модели на основе уравнения логит-регрессии применено построение ROC-кривой с определением площади под ней (AUC).

Результаты и обсуждение

Среди участников исследования 36 (80%) мужчин и 9 (20%) женщин. Медиана среднего возраста пациентов в группе без отторжения составила 47 лет (31; 54), в группе с отторжением – 49 лет (39; 57). Срок наблюдения после трансплантации печени у пациентов был 4 (3; 5) года и 5 (4; 6) лет, соответственно. Клинико-демографические характеристики в группах исследования статистически не различались.

Результаты гистологического исследования биоптатов трансплантатов печени показали, что 14 пациентов (31%) из 45 имели морфологические признаки отторжения.

Как показали результаты цитофлуометрического исследования, данные гистологического исследования у пациентов с иммунологической дисфункцией трансплантата коррелировали с абсолютным количеством терминально-дифференцированных эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов (табл. 3).

Таблица 3. – Содержание цитотоксических CD8+ Т-лимфоцитов и субпопуляции терминально-дифференцированных CD8+ Temra лимфоцитов в периферической крови у пациентов после трансплантации печени (по результатам пункционной биопсии печени)

Table 3. – A number of cytotoxic CD8+ T-lymphocytes and subpopulations of terminally differentiated CD8+ Temra lymphocytes in the peripheral blood of patients after liver transplantation according to the results of liver transplant biopsies

Показатели	Без отторжения (по биопсии), n=31	С отторжением (по биопсии), n=14	M-W тест, p
CD8+ Т-лимфоциты, $10^9/л$	0,46 (0,23; 0,51)	0,81 (0,42; 0,89)	0,08
CD8+ Т-лимфоциты, %	24,8 (17; 52,4)	38 (24,1; 62,8)	0,28
Терминально-дифференцированные CD8+ Temra лимфоциты, $10^9/л$	0,09 (0,034; 0,16)	0,23 (0,14; 0,38)	0,034
Терминально-дифференцированные CD8+ Temra лимфоциты, %	20,7 (18; 31,3)	29,5 (21,9; 43,1)	0,062

Как видно из таблицы 3, у пациентов с отторжением достоверно более высокий уровень абсолютного количества CD8+ Temra-клеток, что составило $0,23 (0,14; 0,38) \times 10^9/л$ по сравнению с пациентами без отторжения – $0,09 (0,034; 0,16) \times 10^9/л$ ($p=0,034$). Установлена также тенденция к увеличению уровня относительно содержания абсолютного количества CD8+ Temra-клеток в группе REJ, что составило 29,5% (21,9; 43,1) vs 20,7% (18; 31,3), соответственно ($p=0,062$, рис. 1).



Рисунок 1. – Различие абсолютного содержания терминально-дифференцированных CD8+ Т-лимфоцитов: более высокий уровень Temra клеток в группе пациентов с отторжением трансплантата печени
Figure 1. – Difference in terminally differentiated CD8+ T-lymphocytes absolute number: a higher level of Temra cells in a group of patients with liver graft rejection

Полученные данные о статистически достоверной разнице абсолютного содержания CD8+ Temra лимфоцитов у пациентов с нормальной функцией трансплантата и с отторжением позволили нам рассматривать этот показатель как биомаркер поздней иммунологической дисфункции трансплантата печени.

Для оценки диагностической значимости абсолютного количества терминально-дифференцированных эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов в крови в качестве маркера отторжения был выполнен ROC-анализ (Receive operative characteristic) с построением и расчетом площади под кривой (AUC) и определением оптимальной точки отсечения «cut-off» для количества лимфоцитов, достоверного для отторжения.

Характеристики диагностической ценности уровня абсолютного количества CD8+ Temra-клеток, установленные при проведении ROC-анализа, представлены в таблице 4. При проведении расчетов площадь под ROC-кривой составила 0,855 (95% ДИ 0,716-0,943), уровень значимости $p < 0,001$.

На рисунке 2. представлена ROC-кривая и распределение участников исследования относительно установленного оптимального порога отсечения.

Результаты построения ROC-кривой показали, что наиболее оптимальным порогом отсечения уровня CD8+ Temra-лимфоцитов при диагностике иммунологической дисфункции трансплантата печени в отдаленном периоде оказалось значение $0,1882 \times 10^9/\text{л}$ (табл. 5). Такой «cut-off» обладает оптимальной чувствительностью и специфичностью, 73,33 (95% ДИ: 44,9-92,0) и 96,55 (95% ДИ: 82,2-99,4), соответственно.

Таблица 4. – Результаты ROC-анализа оценки качества регрессионной модели по верификации развития отторжения трансплантата печени

Table 4. – Results of ROC-analysis of regressive model quality assessment based on liver allograft rejection development verification

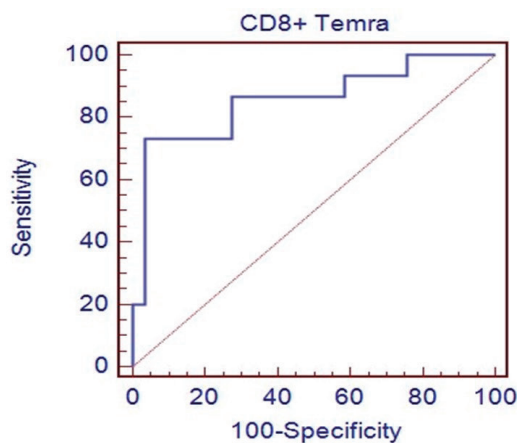
Площадь под ROC-кривой (AUC)	0,814
Стандартная ошибка оценки	0,0668
95% доверительный интервал	0,668 - 0,915
Уровень статистической значимости (p)	0,0001

Таблица 5. – Чувствительность и специфичность порогов отсечения («cut off») для абсолютной численности терминально-дифференцированных эффекторных CD8+ Т-лимфоцитов

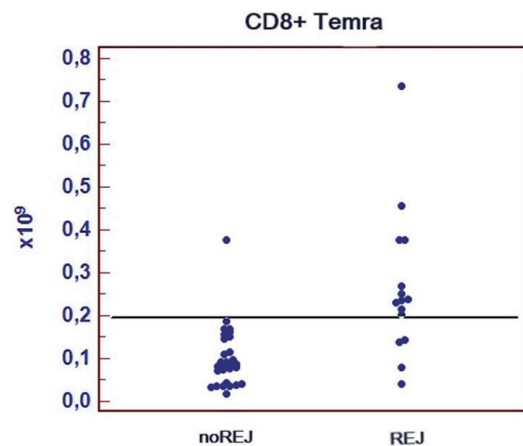
Table 5. – Sensitivity and specificity of “cut off” thresholds for terminally differentiated effector CD8+ T-lymphocytes absolute number

Критерий	Чувствительность (95% ДИ)	Специфичность (95% ДИ)
>0,0399	100,00 (78,0-100,0)	24,14 (10,3-43,5)
>0,0418	93,33 (68,0-98,9)	24,14 (10,3-43,5)
>0,0797	93,33 (68,0-98,9)	41,38 (23,5-61,1)
>0,0802	86,67 (59,5-98,0)	41,38 (23,5-61,1)
>0,1149	86,67 (59,5-98,0)	72,41 (52,8-87,2)
>0,1444	73,33 (44,9-92,0)	72,41 (52,8-87,2)
>0,1882 *	73,33 (44,9-92,0)	96,55 (82,2-99,4)
>0,3759	20,00 (4,6-48,1)	96,55 (82,2-99,4)

Данные показатели свидетельствовали о «хорошей» диагностической ценности абсолютного уровня цитотоксических Temra-лимфоцитов как прогностического биомаркера развития отторжения трансплантата печени.



A)



B)

Рисунок 2. – А) графическое отображение ROC-кривой абсолютного уровня CD8+ Temra лимфоцитов; В) распределение пациентов относительно оптимального порога отсечения
Figure 2. – a) graphic display of CD8+ Temra lymphocytes absolute number ROC-curve; b) distribution of patients relative to the optimal “cut off” threshold

Диагностика субклинических форм отторжения печёночного трансплантата. При сопоставлении результатов стратификации пациентов в зависимости от наличия эпизодов отторжения по клиническому признаку и по результатам пункционной биопсии выявлено, что у 5 пациентов (11%), которые после трансплантации печени по течению послеоперационного периода были оценены как иммунологически толерантные (noREJ), т. е. не имели клинических признаков отторжения и получали стандартную иммуносупрессивную монотерапию такролимусом, иммунофенотип лимфоцитов соответствовал таковому у пациентов, имеющих (по данным биопсии) признаки отторжения. Результаты пункционной биопсии печени у этих пациентов диагностировали субклинический вариант иммунологического повреждения трансплантатов.

Этим пациентам была эскалирована иммуносупрессивная терапия, что привело к формированию толерантного иммунофенотипа. При контрольной пункционной биопсии морфологических признаков отторжения не определялось.

Результаты проведенного нами исследования показали, что увеличение абсолютной численности терминально-дифференцированных эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов обладает диагностической значимостью у пациентов с иммунологической дисфункцией трансплантата в позднем посттрансплантационном периоде.

Полученные данные не случайны и объясняются тем, что CD8⁺ Темга-лимфоциты являются ключевым эффекторным звеном реакции отторжения. Цитотоксический эффект CD8⁺ Темга объясняется миграцией и лимфоидной инфильтрацией тканей трансплантированного органа, а также выраженной экспрессией цитотоксических молекул (перфорин, гранзим-В), которые в совокупности обуславливают повреждение и деструкцию пересаженного органа. При этом CD8⁺ Т-лимфоциты могут самостоятельно, ми-

нуя фазу активации их антиген-презентирующими клетками, вступать в контакт с антигеном, распознавать его и инициировать каскад иммунологических реакций, дающих начало процессу отторжения [13]. Кроме того, цитотоксические Т-лимфоциты способны активировать отторжение графта при отсутствии помощи CD4⁺ Т-лимфоцитов (хелперов), а их повышенный уровень в крови у реципиентов трансплантированных органов может являться предиктором гуморального отторжения [14,15]. Все это определяет CD8⁺ Темга-лимфоциты как основную движущую силу повреждения графта при отторжении.

Выводы

Высокая чувствительность и специфичность порога отсечения абсолютного количества CD8⁺ Темга-лимфоцитов у пациентов после трансплантации печени, а также статистически достоверная разница между количеством клеток у пациентов с нормальным послеоперационным течением, имеющих иммунологическую дисфункцию трансплантата, позволяют нам рассматривать данную субпопуляцию Т-лимфоцитов как прогностический биомаркер отторжения в позднем посттрансплантационном периоде. Корреляция этого показателя с результатами морфологического исследования делает его альтернативным, и самое главное, неинвазивным и безопасным способом ранней диагностики отторжения.

Проведение пациентам цитофлуориметрического анализа при контрольных обследованиях с определением уровня CD8⁺ терминально-дифференцированных эффекторных клеток памяти позволит выявлять субклинические формы отторжения трансплантата, проводить своевременную коррекцию иммуносупрессивной терапии и, соответственно, улучшать результаты лечения данной категории пациентов.

References

- Gonzalez MG, Madrazo CP, Rodriguez AB, Gutiérrez MG, Herrero JI, Pallardó JM, Ortiz de Urbina J, Paricio PP. An open, randomized, multicenter clinical trial of oral tacrolimus in liver allograft transplantation: a comparison of dual vs. triple drug therapy. *Liver Transpl.* 2005;11(5):515-524. doi: 10.1002/lt.20382.
- Piccinino F, Sagnelli E, Pasquale G, Giusti G, Battocchia A, Bernardi M, Bertolazzi R, Bianchi FB, Brunelli E, Budillon G, Buscarini L, Cargnel A, Carrara G, Carulli N, Caruso L, Cataldi V, Celle G, Chiandussi L, Chiesa L, Colombo M, Coltorti M, De Bac C, Del Vecchio Blanco C, Di Marco G, Fiaccadori F, et al. Complications following percutaneous liver biopsy: A multicentre retrospective study on 68,276 biopsies. *J Hepatol.* 1986;2(2):165-173. doi: 10.1016/s0168-8278(86)80075-7.
- Benichou G, Gonzalez B, Marino J, Ayasoufi K, Valujskikh A. Role of Memory T Cells in Allograft Rejection and Tolerance. *Front Immunol.* 2017;8:170. doi: 10.3389/fimmu.2017.00170.
- Tilly G, Yap M, Brouard S, Degauque N. TEMRA CD8 T-Cells Are Highly Cytopathic Cells That Escape From Costimulatory Based-Therapy. *Transplantation.* 2015;98:318-319. doi: 10.1097/00007890-201407151-01012.
- Yap M, Boeffard F, Clave E, Pallier A, Danger R, Giral M, Dantal J, Foucher Y, Guillot-Gueguen C, Toubert A, Souillou JP, Brouard S, Degauque N. Expansion of Highly Differentiated Cytotoxic Terminally Differentiated Effector Memory CD8⁺ T Cells in a Subset of Clinically Stable Kidney Transplant Recipients. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(8):1856-1868. doi: 10.1681/ASN.2013080848.
- Irure J, Ballesteros M, Iturbe D, Merino D, Mora V, Mons R, Fernández-Rozas S, Asensio E, Gómez-Román J, Cifrián J, López-Hoyos M, Segundo DS. CD8 T Effector Memory T Cells as Predictive Biomarker of Severe Acute Rejection in Lung Transplantation. *Transplantation.* 2013;102:S682. doi: 10.1097/01.tp.0000543627.01804.d6.
- Yap M, Boeffard F, Pallier A, Danger R, Giral M, Dantal J, Foucher Y, Guillot-Gueguen C, Souillou J, Brouard S, Degauque N. A Subset of Patients Accumulated Highly Differentiated CD4 and CD8 T Memory Cells Despite Having Long-Term Stable Graft Function. *Transplantation.* 2014;98:877. doi: 10.1097/00007890-201407151-02992.

8. Sarwal MM, Jani A, Chang S, Huie P, Wang Z, Salvatierra O Jr, Clayberger C, Sibley R, Krensky AM, Pavlakis M. Granulysin expression is a marker for acute rejection and steroid resistance in human renal transplantation. *Human Immunol.* 2001;62(1):21-31. doi: 10.1016/s0198-8859(00)00228-7.
9. Tilly G, Doan-Ngoc T-M, Yap M, Caristan A, Jacquemont L, Danger R, Cadoux M, Bruneau S, Giral M, Guerif P, Nicol B, Garcia A, Laplaud DA, Brouard S, Pecqueur Hellman C, Degauque N. IL-15 Harnesses Pro-inflammatory Function of TEMRA CD8 in Kidney-Transplant Recipients. *Front Immunol.* 2017;8:778. doi: 10.3389/fimmu.2017.00778.
10. Akoglu B, Lafferton B, Kalb S, Yosuf SE, Herrmann E, Zeuzem S, Goßmann J, Kachel HG, Scheuermann EH, Faust D. Rejection quantity in kidney transplant recipients is associated with increasing intracellular interleukin-2 in CD8+ T-cells. *Transpl Immunol.* 2014;31(1):17-21. doi: 10.1016/j.trim.2014.05.004.
11. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Acs A, Adam A, Adam-Klages S, Agace WW, Aghaeepour N, Akdis M, Allez M, Nogueira Almeida L, Alvisi G, Anderson G, Andrà I, Annunziato F, Anselmo A, Bacher P, Baldari CT, Bari S, Barnaba V, Barros-Martins J, Battistini L, Bauer W, Baumgart S, Baumgarth N, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (2nd edition). *Eur J Immunol.* 2019;49(10):1457-1973. doi: 10.1002/eji.201970107.
12. Banff schema for grading liver allograft rejection: an international consensus document. *Hepatology.* 1997;25(3):658-663. doi: 10.1002/hep.510250328.
13. Halamay KE, Kirkman RL, Sun L, Yamada A, Fragoso RC, Shimizu K, Mitchell RN, McKay DB. CD8 T cells are sufficient to mediate allorecognition and allograft rejection. *Cell Immunol.* 2002;216(1-2):6-14. doi: 10.1016/s0008-8749(02)00530-0.
14. Gerlach UA, Vogt K, Schlickeiser S, Meisel C, Streitz M, Kunkel D, Appelt C, Ahrlich S, Lachmann N, Neuhaus P, Pascher A, Sawitzki B. Elevation of CD4+ Differentiated Memory T Cells Is Associated With Acute Cellular and Antibody-Mediated Rejection After Liver Transplantation. *Transplantation.* 2013;95(12):1512-1520. doi: 10.1097/TP.0b013e318290de18.
15. Delfs MW, Furukawa Y, Mitchell RN, Lichtman AH. CD8+ T cell subsets TC1 and TC2 cause different histopathologic forms of murine cardiac allograft rejection. *Transplantation.* 2001;71(5):606-610. doi: 10.1097/00007890-200103150-00005.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Соответствие принципам этики. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Сведения об авторах:

Коротков Сергей Владимирович, канд. мед. наук, доц., ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»; e-mail: skorotkov@tut.by; ORCID: 0000-0002-8536-6911.

Смоляникова Виктория Владимировна; ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»; ORCID: 0000-0001-5947-8285.

Гриневич Виктория Юрьевна; ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»; ORCID: 0000-0002-4505-4884.

Лебедь Ольга Александровна; УЗ «Городское клиническое патологоанатомическое бюро»; ORCID: 0000-0002-0218-462X.

Василенко Максим Николаевич; ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»; ORCID: 0000-0002-3857-7759.

Ефимов Денис Юрьевич, канд. мед. наук; ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»; ORCID: 0000-0002-2875-2146.

Федорук Алексей Михайлович, д-р мед. наук, проф.; ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»; ORCID: 0000-0001-9993-1929.

Щерба Алексей Евгеньевич, д-р мед. наук, доц.; ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»; ORCID: 0000-0003-0569-6150.

Кривенко Светлана Ивановна, д-р мед. наук, доц.; ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»; ORCID: 0000-0002-6813-4465.

Руммо Олег Олегович, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Бел.; ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»; ORCID: 0000-0001-7023-4767.

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

Financing. The study was performed without external funding.

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

Information about authors:

Korotkov Sergey V., PhD (Medicine), Associate Professor; Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology; e-mail: skorotkov@tut.by; ORCID: 0000-0002-8536-6911.

Smolnikova Viktoryia V.; Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology; ORCID: 0000-0001-5947-8285.

Hrynevich Viktoryia Yu.; Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology; ORCID: 0000-0002-4505-4884.

Lebed Olga A.; City Clinical Pathologoanatomic Bureau, Minsk, Republic of Belarus; ORCID: 0000-0002-0218-462X.

Vasilenka Maksim N.; Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology; ORCID: 0000-0002-3857-7759.

Efimov Denis Y.; Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology; ORCID: 0000-0002-2875-2146.

Fedoruk Aliaksei M., PhD, MD (Medicine), Professor; Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology; ORCID: 0000-0001-9993-1929.

Shherba Aliaksei E., PhD, MD (Medicine), Associate Professor; Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology; ORCID: 0000-0003-0569-6150.

Krivenko Svetlana I., PhD, MD (Medicine), Associate Professor; Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology; ORCID: 0000-0002-6813-4465.

Rummo Oleg O., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus; Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk Scientific and Practical Center for Surgery, Transplantology and Hematology; ORCID: 0000-0001-7023-4767.

Поступила: 04.06.2020

Принята к печати: 18.06.2020

Received: 04.06.2020

Accepted: 18.09.2020