

DOI: 10.15825/1995-1191-2016-2-46-55

ЗНАЧЕНИЕ ЭКСТРАКОРПОРАЛЬНОЙ ФОТОХИМИОТЕРАПИИ В ИНГИБИРОВАНИИ ПРОЦЕССОВ ОТТОРЖЕНИЯ ПОЧЕЧНОГО ТРАНСПЛАНТАТА

В.А. Федулкина¹, А.В. Ватазин¹, А.В. Кильдюшевский¹, А.Я. Ольшанский², А.П. Фаенко¹

¹ ГБУЗ Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского», отдел трансплантологии, нефрологии и искусственных органов, Москва, Россия

² Московский городской центр СПИДа Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Целью исследования явилось определение значения экстракорпоральной фотохимиотерапии (ЭФХТ) в индукции тканевой толерантности при трансплантации почки. ЭФХТ применена у 24 реципиентов почечного трансплантата в раннем послеоперационном периоде, контрольную группу составили реципиенты парных трансплантатов. В группе с применением ЭФХТ на протяжении трехлетнего периода наблюдения не отмечено ни клинических, ни гистологических симптомов реакции отторжения. В контрольной группе гистологически подтвержденное отторжение отмечено в 4 наблюдениях, в 2 – трансплантатэктомия по поводу острого отторжения. Также отмечено снижение частоты инфекционных осложнений в основной группе по сравнению с контрольной (4 и 19 случаев соответственно) и случаев госпитализации по различным причинам (8 и 47 в основной и контрольной группе соответственно). Трехлетняя выживаемость трансплантата составила 100 и 83,3% в основной и контрольной группе соответственно. С помощью иммунологических тестов через 30 дней после трансплантации показано стабильное количество клеток, экспрессирующих молекулы коактивации ($57,7 \pm 18,2$ и $52,7 \pm 23,2\%$ соответственно, $p > 0,05$) и плотность их коэкспрессии ($22,7 \pm 6,0$ и $19,6 \pm 7,0$ ед. соответственно, $p > 0,05$), в то время как в основной группе обнаружено выраженное и статистически достоверное уменьшение как количества клеток, экспрессирующих коактивационные рецепторы (с $57,7 \pm 18,2$ до $34,5 \pm 11,4\%$, $p < 0,05$), так и плотности этих рецепторов на наивных хелперных Т-лимфоцитах (с $22,7 \pm 6,0$ до $16,8 \pm 5,1$ ед., $p < 0,05$). Таким образом, отмечено, что ЭФХТ обеспечивает индукцию толерантности к антигенам главного комплекса гистосовместимости при трансплантации почки, что обусловлено снижением экспрессии коактивационных молекул, обеспечивающих второй сигнальный путь активации Т-клеточного рецептора.

Ключевые слова: трансплантация почки, экстракорпоральная фотохимиотерапия, иммунологическая толерантность, иммуносупрессия.

THE VALUE OF EXTRACORPOREAL PHOTOCHEMOTHERAPY IN RENAL TRANSPLANT REJECTION INHIBITION

V.A. Fedulkina¹, A.V. Vatazin¹, A.V. Kildyushevsky¹, A.Ya. Olshansky², A.P. Faenko¹

¹ M.F. Vladimirsky Moscow Regional Research and Clinical Institute, Division of transplantation, nephrology and artificial organs, Moscow, Russian Federation

² Moscow AIDS Center, Moscow City Health Department, Russian Federation

The aim of the study was to determine the value of extracorporeal photochemotherapy (EPCT) in the induction of tissue tolerance in renal transplantation. EPCT was applied to 24 renal transplant recipients in early post-operative period, the control group consisted of paired transplant recipients. In the group using EPCT over a three-year period of observation no clinical or histological signs of rejection were observed. In the control group, histologically confirmed rejection was observed in 4 cases, in 2 cases transplantectomy due to acute rejection. The reducing incidence of infectious complications in the study group compared with the control one (4 and

Для корреспонденции: Федулкина Вероника Андреевна. Адрес: 140032, Московская область, Люберецкий р-н., п. Малаховка, ул. Комсомольская, д. 3, кв. 81. Тел. (926) 398-67-03. E-mail: v.fedulkina@mail.ru.

For correspondence: Fedulkina Veronika Andreevna. Address: 140032, Moscow region, Luberetskiy district, Malakhovka, Komsomolskaya st., 3–81. Tel. (926) 398-67-03. E-mail: v.fedulkina@mail.ru.

19 cases, respectively) and decreasing number of hospitalizations on various reasons (8 and 47 cases in the study and control groups, respectively) were also noted. Three-year graft survival was 100% and 83.3% in the study and the control groups, respectively. Using immunological tests in 30 days after transplantation the stable number of cells expressing coactivation molecules (57.7 ± 18.2 and $52.7 \pm 23.2\%$, respectively, $p > 0.05$) and the density of their co-expression (22.7 ± 6.0 and 19.6 ± 7.0 units, respectively, $p > 0.05$) were demonstrated, while in the study group, the pronounced and statistically significant reduction both in the amount of cells expressing co-activation receptors (from 57.7 ± 18.2 to $34.5 \pm 11.4\%$, $p < 0.05$) and in the density of these receptors on naive helper T-lymphocytes (from 22.7 ± 6.0 to 16.8 ± 5.1 units, $p < 0.05$) was revealed. Thus, it is noted that EPCT provides induction of tolerance to MHC antigens in kidney transplantation due to reducing expression of coactivation molecules which promote the second signaling pathway to T-cell receptor activation.

Key words: kidney transplantation, extracorporeal photochemotherapy, immunological tolerance, immunosuppression.

ВВЕДЕНИЕ

Иммунологическая толерантность – состояние организма, при котором иммунная система устойчиво воспринимает чужеродный антиген как собственный и не отвечает на него. Толерантность есть неотвечаемость, терпимость. Незрелые лимфоциты реагируют на связывание их антигенраспознающего рецептора не активацией, как зрелые клетки, а гибелью. В результате в процессе онтогенеза происходит гибель (делеция) клонов, специфичных к аутоантителам (чувствительных к собственным тканям). Нарушение иммунной толерантности к собственным антигенам приводит к развитию аутоиммунных заболеваний. Таким образом, открытие в 1953 г. П. Медавара и его коллегами иммунологической толерантности (явления, обратного по своей природе иммунологической реактивности) позволило М. Бернету определить иммунитет как способ дифференцировки всего «своего» от всего «чужого», а изучение механизмов индуцированной толерантности (non-self tolerance) и механизмов толерантности к собственным антигенам (self tolerance) слилось в единое направление исследований, задача которого – понять главный, определяющий принцип работы иммунной системы [1].

Нами был исследован новый метод индукции тканевой толерантности – экстракорпоральная фотохимиотерапия (ЭФХТ), основанный на клеточных технологиях, позволяющий избирательно воздействовать на процессы активации рецепторно-лигандных взаимодействий на уровне транскрипции или трансляции белковых молекул, участвующих в процессах отторжения. Методика применяется во всем мире в качестве терапии заболеваний, обусловленных нарушением Т-клеточной системы иммунитета [2], и зарекомендовала себя как эффективный метод предупреждения и лечения отторжения при трансплантации сердца, легких и печени [3–6]. Известны результаты нескольких исследований, где курсы ЭФХТ были с успехом использованы для купирования устойчивых эпизодов отторжения почечного аллотрансплантата (ПАТ) [7, 8].

Несмотря на то что острое отторжение ПАТ, возникающее в 23,1–32,5% случаев, чаще всего купируется медикаментозно, любое отторжение приводит к уменьшению количества действующих нефронов, изменению структуры канальцев и паренхимы почки, и эти изменения уже носят необратимый характер. Приблизительно 5–10% реципиентов в течение 1 года после пересадки почки возвращаются к программам гемодиализа в связи с дисфункцией трансплантата, а с удлинением времени после трансплантации таких пациентов становится все больше [9]. Поэтому целью лечения или профилактики отторжения должно быть не просто спасение пересаженного органа в данный момент, но и предупреждение последствий криза, приводящих в дальнейшем к ухудшению и постепенной утрате функции трансплантата, а также предотвращение осложнений усиленной иммуносупрессивной нагрузки, минимизация инфекций, онкологических заболеваний, сахарного диабета и нефротоксичности. Так, например, в исследовании Lamioni A. авторы предполагают возможность толерогенного эффекта ЭФХТ, применяемой в качестве адъювантной терапии после трансплантации почки в качестве предотвращения хронического отторжения [8].

В отличие от большинства зарубежных авторов, применяющих ЭФХТ при трансплантации почки, в нашем исследовании введение протокола фотофереза в терапию раннего посттрансплантационного периода направлено именно на предупреждение реакции отторжения с целью минимизации ее последствий и последующего нормального функционирования почечного аллотрансплантата. Подобные публикации стали появляться относительно недавно и носят единичный характер исследований. Так, например, имеются сообщения Kuzstal et al. 2011 г. о протокольном, профилактическом опыте использования ЭФХТ при пересадке почки у 10 пациентов [10]. Ни в одной из подобных публикаций нет контрольной группы парных трансплантатов, в результате чего не учитываются особенности консервации органа, возможная до-

норская патология и многие другие факторы, которые могут сделать результаты исследования недостоверными. Поэтому целью данного исследования являлось определение значения экстракорпоральной фотохимиотерапии в индукции тканевой толерантности относительно профилактики отторжения ПАТ в сравнении с группой проспективного контроля.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено проспективное рандомизированное исследование эффективности ЭФХТ в качестве предупреждения отторжения у 24 реципиентов почечного трансплантата. Для исключения влияния на результат исследования донорской патологии в трансплантате или особенностей консервации органов контролем явились 24 реципиента, парных исследуемой группе. В основную группу вошли 14 мужчин и 10 женщин в возрасте $40,4 \pm 11,2$ года, в группу сравнения – 13 мужчин и 11 женщин в возрасте $39,1 \pm 12,1$ года. Пациенты в двух группах существенно не отличались по полу, возрасту, структуре первичных заболеваний, длительности заместительной почечной терапии до трансплантации и назначенной медикаментозной иммуносупрессивной терапии. Пациенты основной группы помимо общепринятой медикаментозной иммуносупрессии получали процедуры ЭФХТ, группе сравнения назначалась только иммуносупрессивная терапия. Рандомизация проводилась методом слепой выборки.

Процедуры ЭФХТ проводились пациентам исследуемой группы в первые 2 недели после трансплантации почки с кратностью 2 раза в неделю, в последующие 2 недели – 1 раз в неделю, в течение 2-го месяца – 1 раз в 2 недели, 1 раз в течение 3-го месяца и завершались одной процедурой на 180-е сутки после трансплантации почки. В качестве фотосенсибилизатора использовался Oxoralen (Gerot Pharmzeutika, Австрия) в дозе 0,6 мг/кг массы тела, который принимался пациентом за 2 часа до проведения процедуры. Методика ЭФХТ заключалась в сепарации и накоплении в экстракорпоральном контуре моноклеарных клеток с помощью аппаратов «Uvar XTS® System» Therakos или «Naemonetics MCS+», США. За одну процедуру выделяли от 40 до 70 мл концентрата моноклеарных клеток, которые ресуспендировали в 0,9% р-ре хлористого натрия, доводя общий объем до 200,0 мл. Клеточную суспензию подвергали ультрафиолетовому воздействию при длине волны 320–400 нм. Общая доза экспозиции составляла 1,2–2,0 дж/см². После 90 минут инкубационного периода при температуре 37 °С клетки реинфузировали пациенту в течение 30 мин.

Базовая иммуносупрессивная терапия в двух группах состояла из такролимуса (Програф или Адваграф). Стартовая доза составила 0,12 мг/кг массы тела в сутки с последующей коррекцией дозы в зависимости от концентрации препарата в крови. Преднизолон назначали всем пациентам по 30 мг в сутки. С 14-го дня дозу преднизолона снижали по 2,5 мг в 3 дня до дозы 20 мг/сут к концу месяца. Микофенолаты (Селлсепт, Майсепт, Майфортик) назначали в стартовой дозе 1,5, 1,5 и 1,08 г/сут соответственно. Метилпреднизолон (метипред) вводили в/в капельно по 0,25 г во время операции, а также на 2-е и 4-е сутки после трансплантации, симулект – по 0,2 г во время операции и на 4-е сутки после операции. При развитии острого отторжения трансплантата, подтвержденного гистологическим исследованием биоптата почечного аллотрансплантата, больным проводили пульс-терапию внутривенным введением метилпреднизолона по 250 мг в течение трех последовательных суток. При развитии острого гуморального отторжения у одного пациента контрольной группы помимо пульс-терапии метилпреднизолоном применялся ритуксимаб в дозе 650 мг, у другого – антиtimoцитарный глобулин в дозе 4 мг/кг массы тела.

С помощью клинических, лабораторных и инструментальных данных проведен анализ полученных клинических результатов, сравнивалась продолжительность жизни трансплантата и реципиента по Kaplan Meyer, общее количество тех или иных событий в двух группах и влияние их на число госпитализаций. Протокольное морфологическое исследование биоптатов трансплантированных почек проводилось на 30-е и 180-е сутки после аллотрансплантации, а также при дисфункции трансплантата. Гистологическое исследование биопсийного материала проводилось в ФГБУ «ФНЦТИО им. академика В.И. Шумакова» в соответствии с классификацией острого отторжения трансплантата Банфф 2007 года.

Имунофенотипические исследования проводили в Московском городском центре СПИДа Департамента здравоохранения города Москвы с использованием проточных цитометров: Beckman Coulter «Cytomics FC 500». Предподготовка проводилась на автоматической станции TQ-rper. Для клинического анализа крови использовали гематологический анализатор Sysmex ICX-21. Помимо этого проводился 5-параметровый проточно-цитофлуориметрический субпопуляционный анализ с использованием коммерческих моноклональных антител фирмы Beckman Coulter с реактогенной направленностью против дифференцировочных антигенов и маркеров активации: CD3, CD4, CD8, CD45RA, CD45RO, HLA-DR, CD28, CD27, конъюгированных FITC, PE, ECD, PC5, и PC7. В качестве контроля применяли коммерческие сыворотки, содержащие изотипиче-

ские антимышьяные Ig, конъюгированные соответствующим флюорохромом. При анализе гистограмм оценивался уровень антиген-позитивных клеток (%) и интенсивность флюоресценции (MFI). По показателю MFI (ед.) судили о плотности присутствия соответствующего антигена, что косвенно отражает его функциональную активность. Результаты сравнивались с группой здоровых доноров и в процессе лечения.

Статистический и корреляционный анализ иммунологических параметров проводили с использованием программы Statistica v.6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Клинические результаты

На момент проведения исследования 2 пары реципиентов достигли 1 года после ТП, 9 пар – 2 года, 4 пары – 3 года и 9 пар – 4 года после ТП. При проведении сравнительного анализа установлено, что в основной группе реципиентов на протяжении всего периода наблюдения (3 года) не было отмечено ни клинических, ни гистологических симптомов реакции отторжения. В контрольной группе клинические симптомы отторжения наблюдались в 4 наблюдениях, в 2 – трансплантатэктомия по поводу острого отторжения. Данными протокольной биопсии трансплантатов также подтверждены признаки хронической трансплантационной нефропатии (ХТН) в отдаленном периоде у пациентов без применения ЭФХТ (табл. 1).

Особенное значение имеет отмеченное нами снижение частоты инфекционных осложнений в основной группе, в результате чего пациенты группы сравнения были подвержены более частым госпита-

лизациям и дополнительной терапии с одновременным снижением медикаментозной иммуносупрессии, и следовательно, риском развития отторжения трансплантата.

Как следует из табл. 1, доля пациентов контрольной группы, вновь госпитализированных после выписки из стационара, составила от 14 до 100% случаев в различные сроки анализируемого периода. Причем основная масса госпитализаций приходится на 1-й год после трансплантации (22 госпитализации), из чего следует вывод о том, что каждый реципиент группы без применения ЭФХТ был хотя бы один раз госпитализирован по тем или иным причинам, а некоторым из них даже дважды потребовалось стационарное лечение. Что касается основной группы, какие-либо события среди пациентов, получавших курсы ЭФХТ, носили единичный характер и выявлены в основном в течение первого года после трансплантации.

Именно поэтому особо интересными представляются результаты сравнительного анализа выживаемости трансплантата (рис. 1), на котором показано, что выживаемость трансплантатов составила 100 и 83,3% в основной и контрольной группе соответственно. Три пациента контрольной группы перенесли трансплантатэктомию в течение первого года после ТП по причинам рецидивирующего пиелонефрита ПАТ, острого отторжения ПАТ и тромбоза вены ПАТ, одна трансплантатэктомия выполнена через 1 год после ТП (фокально-сегментарный гломерулосклероз (ФСГС) по данным биопсии). В анализ выживаемости трансплантата не включен пациент контрольной группы, который умер в результате развившейся на фоне усиленной иммуносупрессии пневмоцистной пневмонии.

Таблица 1

Общая таблица событий в двух группах
Comparison table of events in the two groups

Событие	Основная группа				Контрольная группа			
	1 год (n = 24)	2 года (n = 22)	3 года (n = 13)	4 года (n = 9)	1 год (n = 20)	2 года (n = 17)	3 года (n = 9)	4 года (n = 7)
Отторжение					4			
ХТН	3		1		7	2	3	1
Инфекция:								
– легочная	2				8	1	1	
– мочевая	2				6	2	1	
– хирургическая	1							
ФСГС					1	1		
Трансплантатэктомия					3	1		
Смерть пациента					1			
Итого событий по периодам	8		1		48	7	5	1
Всего событий	9				61			
Число госпитализаций	6		2		22	17	7	1
Число госпитализаций на 1 пациента	0,25		0,15		1,1	1	0,78	0,14

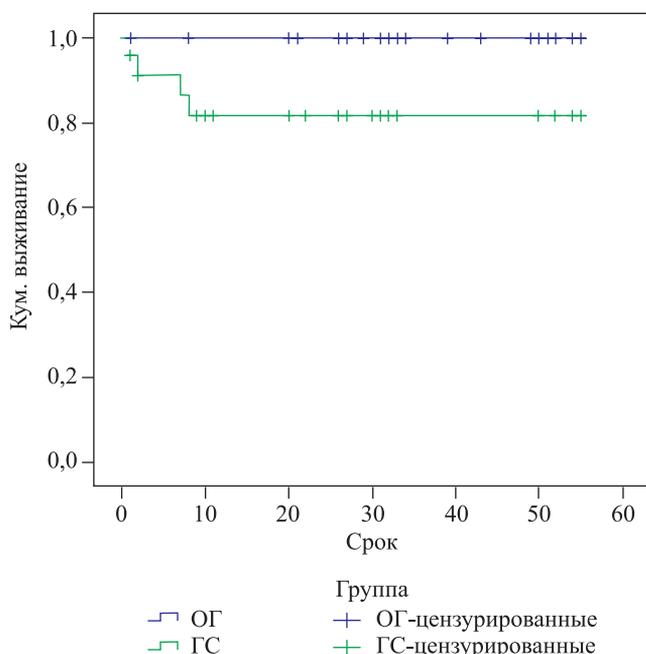


Рис. 1. Выживаемость трансплантата в двух группах реципиентов (месяцы) (Kaplan–Meier): ОГ – основная группа; GS – группа сравнения

Fig. 1. Graft surviving to in both groups of recipients (months) (Kaplan–Meier)

Результаты иммунологических исследований

Динамика изменения активности молекулы коактивации CD28 на наивных хелперных Т-лимфоцитах, имеющих фенотип CD3+CD4+CD27+CD28+CD45RO-, у больных после трансплантации почки и у здоровых людей представлена в табл. 2. Исходные иммунологические параметры двух групп больных (основной и контрольной) объединялись.

Выявлено, что эта молекула представлена на поверхности практически всего пула наивных хелперных Т-лимфоцитов (96,6 ± 3,23%). Однако плотность ее экспрессии подвержена значительной вариабельности, что отражается значением MFI (33,7 ±

22,7). Это указывает на то, что в норме регуляция процессов активации зависит от степени выраженности CD28 на наивных лимфоцитах, отражающей функциональную активность этого рецептора.

В результате воздействия иммуносупрессивной терапии на 4-е сутки после трансплантации количество клеток, экспрессирующих коактивационные молекулы CD28, было почти в 2 раза меньше, чем в норме у здоровых людей (рис. 2).

При этом плотность коэкспрессии их на наивных лимфоцитах уменьшалась пропорционально количеству этих клеток, что подтверждалось прямой достоверной корреляционной зависимостью MFI и процентом клеток, экспрессирующих эти маркеры (r = 0,58, p = 0,01) (рис. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что общепринятая иммуносупрессивная терапия не обладает избирательным действием в отношении подавления активности 2-го коактивационного сигнального пути активации Т-клеточного рецептора.

Через 30 дней после трансплантации в контрольной группе больных не происходило существенного изменения как количества клеток, экспрессирующих молекулы коактивации (57,7 ± 18,2 и 52,7 ± 23,2% соответственно, p > 0,05), так и плотности их коэкспрессии (22,7 ± 6,0 и 19,6 ± 7,0 ед. соответственно, p > 0,05) (рис. 4).

Значительная вариабельность этих показателей в течение первого месяца после трансплантации может свидетельствовать о разной степени чувствительности иммунных рецепторов к иммуносупрессивным препаратам у разных пациентов.

В то же время в основной группе больных с включением в стандартный протокол иммуносупрессивной терапии курса ЭФХТ было обнаружено выраженное и статистически достоверное уменьшение как количества клеток, экспрессирующих коактивационные рецепторы (с 57,7 ± 18,2 до 34,5 ± 11,4%, p < 0,05), так и плотности этих рецепторов на наивных хелперных Т-лимфоцитах (с 22,7 ± 6,0 до

Таблица 2

Динамика изменения активности молекулы коактивации CD28 на наивных хелперных Т-лимфоцитах у больных после трансплантации почки и здоровых людей (M ± m)

Dynamics of CD28 coactivation molecule activity on naive helper T lymphocytes in patients after kidney transplant and healthy people (M ± m)

№	Этап исследования	% наивных хелперных Т-лимфоцитов, коэкспрессирующих CD28	MFI CD28 (ед.) (средняя интенсивность флюоресценции)
1	Здоровые (n = 11)	96,6 ± 3,23	33,7 ± 22,7
2	Исходные значения на 4-е сутки после АТП (n = 38)	57,7 ± 18,2	22,7 ± 6,0
3	30-е сутки после АТП, контрольная группа (n = 19)	52,7 ± 23,2	19,6 ± 7,0
4	30-е сутки после АТП, основная группа (n = 19)	34,5 ± 11,4	16,8 ± 5,1

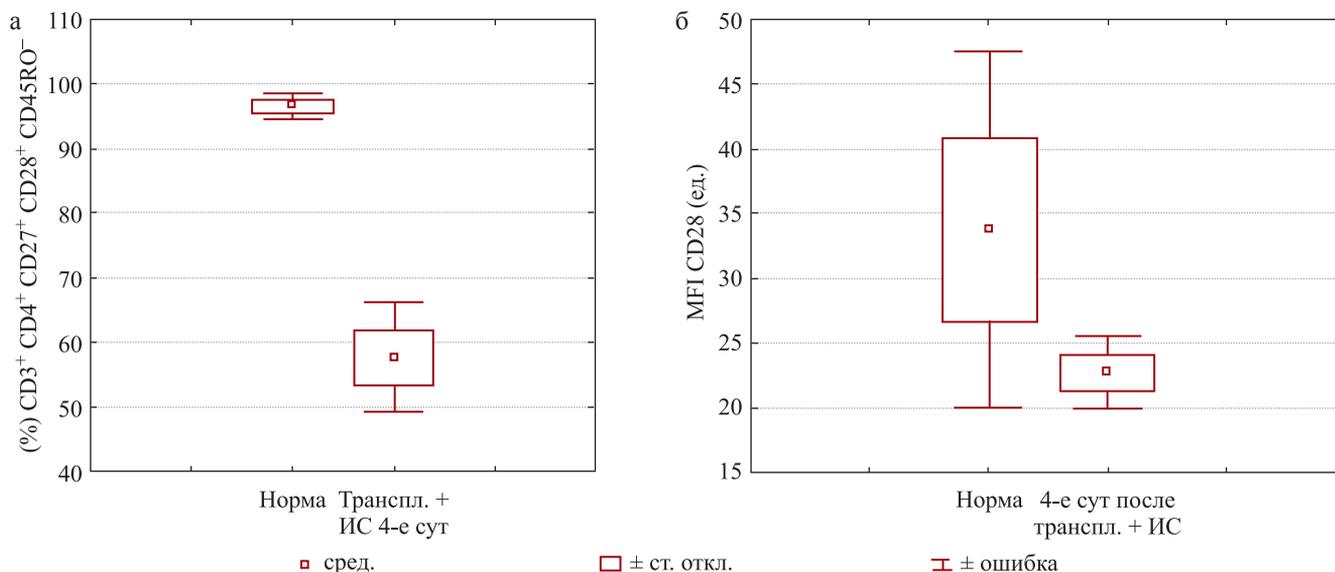


Рис. 2. а – коэкспрессия CD28 на наивных CD4⁺ лимфоцитах на 4-е сутки после трансплантации почки и стандартной иммуносупрессии в сравнении с нормой; б – MFI CD28 на наивных CD4⁺ лимфоцитах в норме и у реципиентов на 4-е сутки после трансплантации почки и иммуносупрессии

Fig. 2. а – the coexpression of CD28 on CD4⁺ naive lymphocytes on the 4th day after kidney transplantation and standard immunosuppression in comparison with the norm; б – MFI CD28 on naive CD4⁺ lymphocytes in normal and recipients on the 4th day after renal transplantation and immunosuppression

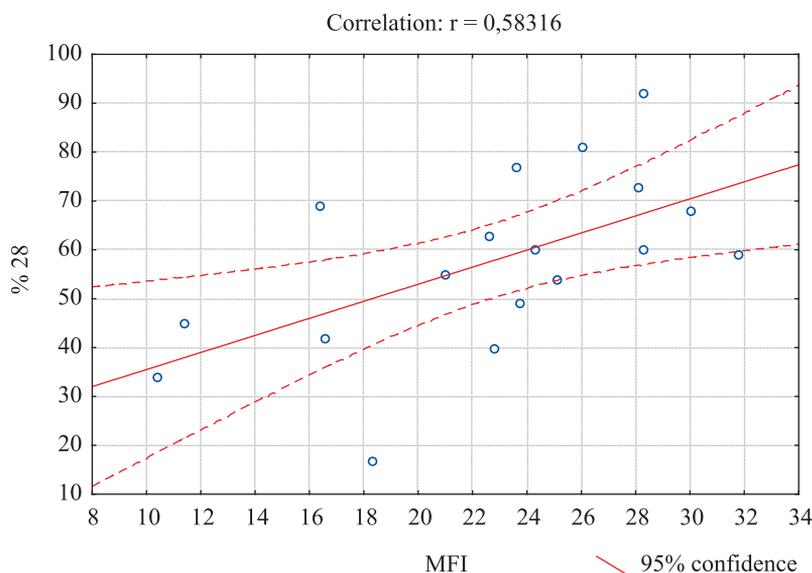


Рис. 3. Корреляция между % лимфоцитов, экспрессирующих молекулу CD28 и MFI на 4-е сутки после назначения иммуносупрессии

Fig. 3. The correlation between lymphocytes % expressing CD28 molecule and MFI on the 4th day after administration of immunosuppression

16,8 ± 5,1 ед., p < 0,05) (рис. 5). При этом видно, что вариабельность полученных результатов была значительно меньше, чем в группе контроля. Это может свидетельствовать об универсальности и большей чувствительности данного метода лечения в отношении ингибирования коактивационных молекул на наивных Т-лимфоцитах, которое в меньшей степени зависит от индивидуальных особенностей пациента.

При анализе экспрессии Т-клеточных линейных антигенов было установлено, что в результате медикаментозной иммуносупрессии на 4-е сутки после трансплантации у всех пациентов отмечалось снижение общего количества Т-лимфоцитов, сокращение хелперной субпопуляции, в результате чего иммунорегуляторный индекс составлял в среднем 1,4 ед. Через 30 дней после начала иммуносупрес-

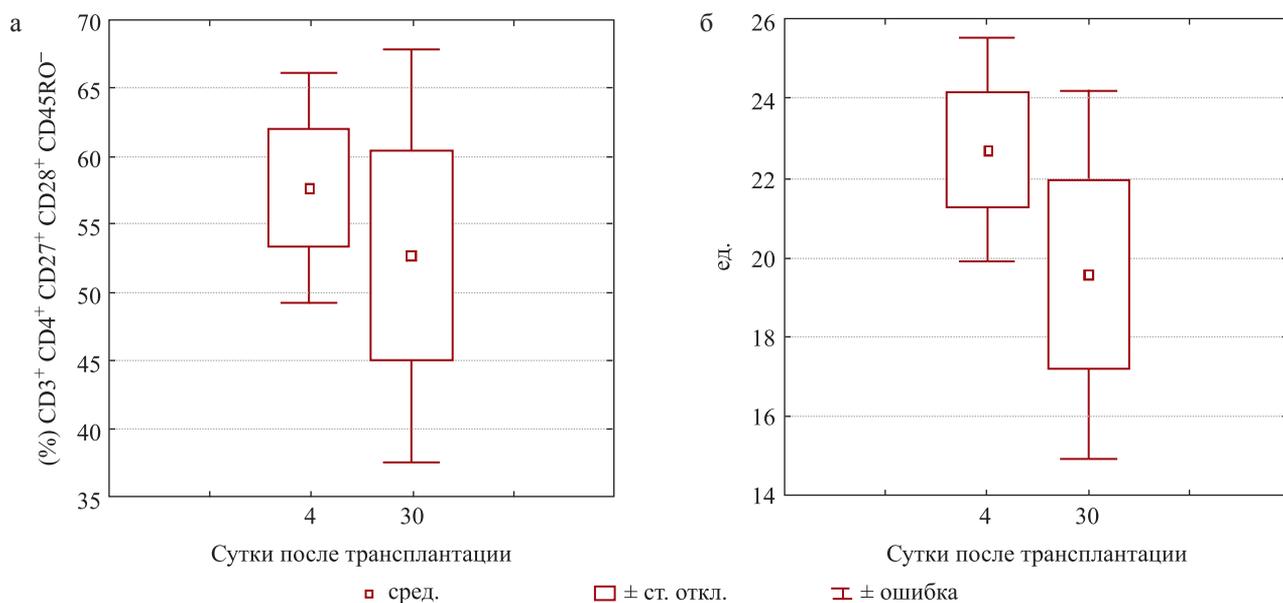


Рис. 4. а – динамика коэкспрессии CD28 на наивных CD4⁺ лимфоцитах у реципиентов группы контроля в ближайшем посттрансплантационном периоде; б – динамика средней интенсивности флюоресценции (MFI) CD28 на наивных CD4⁺ лимфоцитах у реципиентов группы контроля в ближайшем посттрансплантационном периоде

Fig. 4. а – the dynamics of CD28 coexpression on naive CD4⁺ lymphocytes in the control group of recipients in the immediate post-transplant period; б – the dynamics of the average fluorescence intensity (MFI) CD28 on naive CD4⁺ lymphocytes in the control group of recipients in the immediate post-transplant period

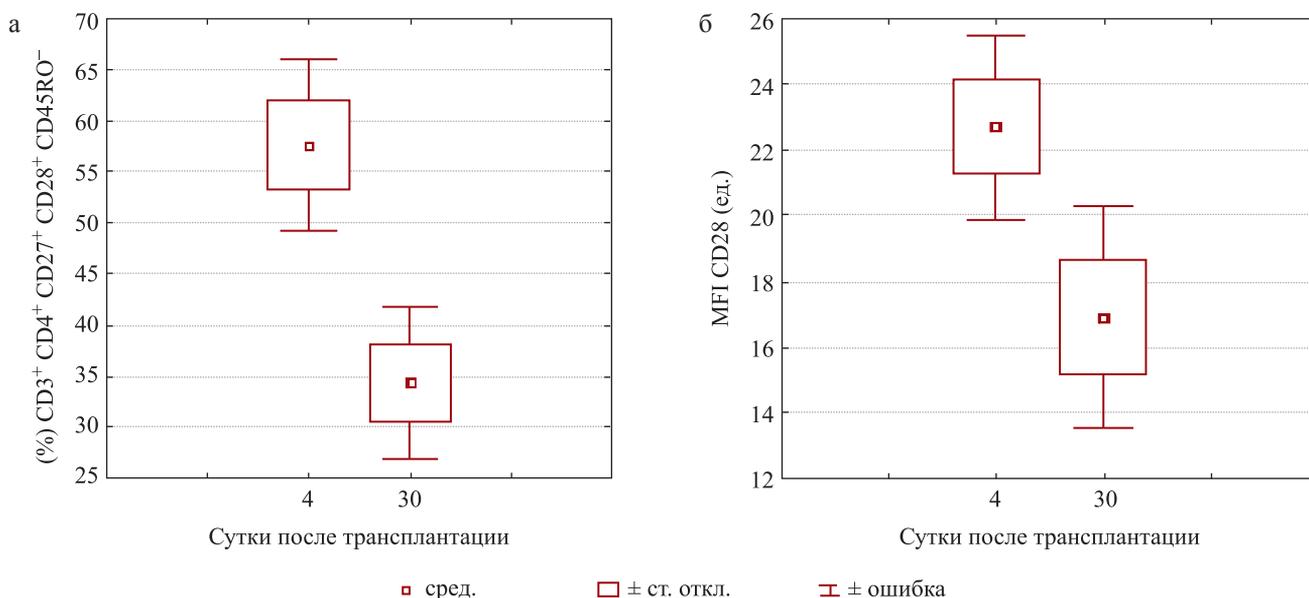


Рис. 5. а – динамика коэкспрессии CD28 на наивных CD4⁺ лимфоцитах у реципиентов основной группы в ближайшем посттрансплантационном периоде; б – динамика средней интенсивности флюоресценции (MFI) CD28 на наивных CD4⁺ лимфоцитах у реципиентов основной группы в ближайшем посттрансплантационном периоде

Fig. 5. а – the dynamics of CD28 coexpression on naive CD4⁺ lymphocytes in recipients of the core group in the immediate post-transplant period; б – the dynamics of the average fluorescence intensity (MFI) CD28 on naive CD4⁺ lymphocytes in recipients of the core group in the immediate post-transplant period

сии (контрольная группа) происходило равномерное увеличение экспрессии как хелперной, так и супрессорной субпопуляции. В результате иммунорегуляторный индекс практически не изменялся и составлял в среднем 1,5 ед. (табл. 3).

В основной группе через 30 дней после трансплантации и включения в стандартный иммуносупрессивный протокол ЭФХТ наблюдалось статистически значимое увеличение экспрессии CD4⁺ Т-лимфоцитов и снижение количества эффекторных

Таблица 3

Динамика экспрессии линейных Т-клеточных маркеров в посттрансплантационном периоде в двух группах больных (M ± m)

The dynamics of linear expression of T cell markers in post-transplant period in the two groups (M ± m)

№	Этап исследования	% CD3	% CD4	% CD8	ИРИ (ед.)
1	Здоровые (n = 11)	71,25 ± 8,3	42,25 ± 10,7	25,0 ± 5,8	1,7
2	Исходные значения на 4-е сутки после трансплантации и иммуносупрессии в обеих группах больных (n = 38)	66,7 ± 7,7	37,5 ± 8,5	26,4 ± 10,1	1,4
3	30-е сутки после трансплантации и иммуносупрессии (контрольная группа) (n = 18)	73,3 ± 4,4	45,5 ± 6,0	30,8 ± 6,5	1,5
4	30-е сутки после трансплантации, иммуносупрессии и ЭФХТ (основная группа) (n = 20)	75,3 ± 5,2	57,0 ± 5,1	21,5 ± 2,4	2,6

цитолитических Т-клеток. При этом относительное количество эффекторных цитолитических Т-клеток в контрольной группе через 30 дней после трансплантации увеличилось, в то время как в основной группе, с дополнительным включением ЭФХТ, их количество уменьшилось. Таким образом, ИРИ возрос в среднем до 2,6 ед.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования полностью согласуются с классическим представлением о механизме отторжения донорского органа. Ключевыми регуляторами Т-клеточных ответов является второй – коактивационный сигнальный путь, реализующийся путем взаимодействия молекул коактивации семейства В-7 (CD80 и CD86) и CD40 на антигенпрезентирующих клетках, с соответствующими им лигандами – CD28 или CTLA-4 (цитолитический Т-лимфоцитарный антиген), CD 40 (CD152) и CD40L (CD154) на поверхности Т-лимфоцита. Молекула CD28 при этом является первичным Т-клеточным костимулятором рецептором, стимулирующий эффект которой обеспечивает положительный сигнал, приводящий к полной активации и пролиферации Т-клеток, усилению продукции IL-2 и других цитокинов, в том числе и антиапоптотических, предотвращая гибель Т-клеток (рис. 6).

В нашем исследовании мы показали, что в процессе лечения ЭФХТ мы добиваемся выраженного и статистически достоверного снижения экспрессии молекулы CD28. Такие результаты указывают на то, что в механизмах регуляции иммунологической реакции, помимо взаимодействия Т-клеточного рецептора с молекулой ГКГ (главного комплекса гистосовместимости) и ее пептидом может быть задействован ряд молекул коактивации, на что в литературе также указывают некоторые зарубежные авторы [10–13].

В отличие от этих авторов мы показали, что курсы ЭФХТ приводят не только к уменьшению относительного количества клеток, экспрессирующих

данный маркер, но также и уменьшается плотность его присутствия по сравнению с группой контроля. Это дает нам основания сделать предположение о том, что при снижении плотности экспрессии этого антигена на лимфоцитах или блокировании коактивационного пути специфическими антителами коактивационный сигнал переключается с молекулы CD28 на другой В7 рецептор – CTLA-4, который проявляет с ним определенную степень структурной гомологии и также играет важную роль в процессе коактивации. Подтверждением этого служат литературные данные, свидетельствующие об авидности CTLA-4 к молекулам класса В7, в сотни раз превышающей авидность CD28 к тем же молекулам, поэтому при снижении экспрессии молекулы CD28 тормозное взаимодействие CTLA-4/В7 в конечном итоге преобладает, что ведет к прекращению иммунного ответа [12–15]. Еще в трех работах, опубликованных в 2015 году, авторы резюмируют свои исследования схожими выводами о том, что взаимодействие CD28, CTLA-4 с их лигандами CD80 и CD86 в процессе костимуляции является основополагающим фактором в индукции и супрессии иммунных ответов [16–18].

Индукция толерогенных процессов по отношению к донорской ткани приводит к уменьшению выработки специфических цитолитических Т-лимфоцитов, инфильтрирующих периваскулярные пространство и интерстиций трансплантата и выполняющих там свою основную функцию – прямой лизис клеток донора [18, 19]. Данное снижение также зафиксировано в нашем исследовании и подтверждается данными протокольной биопсии и многочисленными зарубежными публикациями. Например, уменьшение количества мононуклеарных клеток – Т-клеток и моноцитов, продуцирующих провоспалительные цитокины – IFγ, TNFα, – было продемонстрировано и Bladon J. et al. [20]. При этом не только уменьшается количество этих клеток, но и меняется их функциональное состояние: этим же коллективом авторов было продемонстрировано, что после процедуры ЭФХТ снижается способность Т-клеток

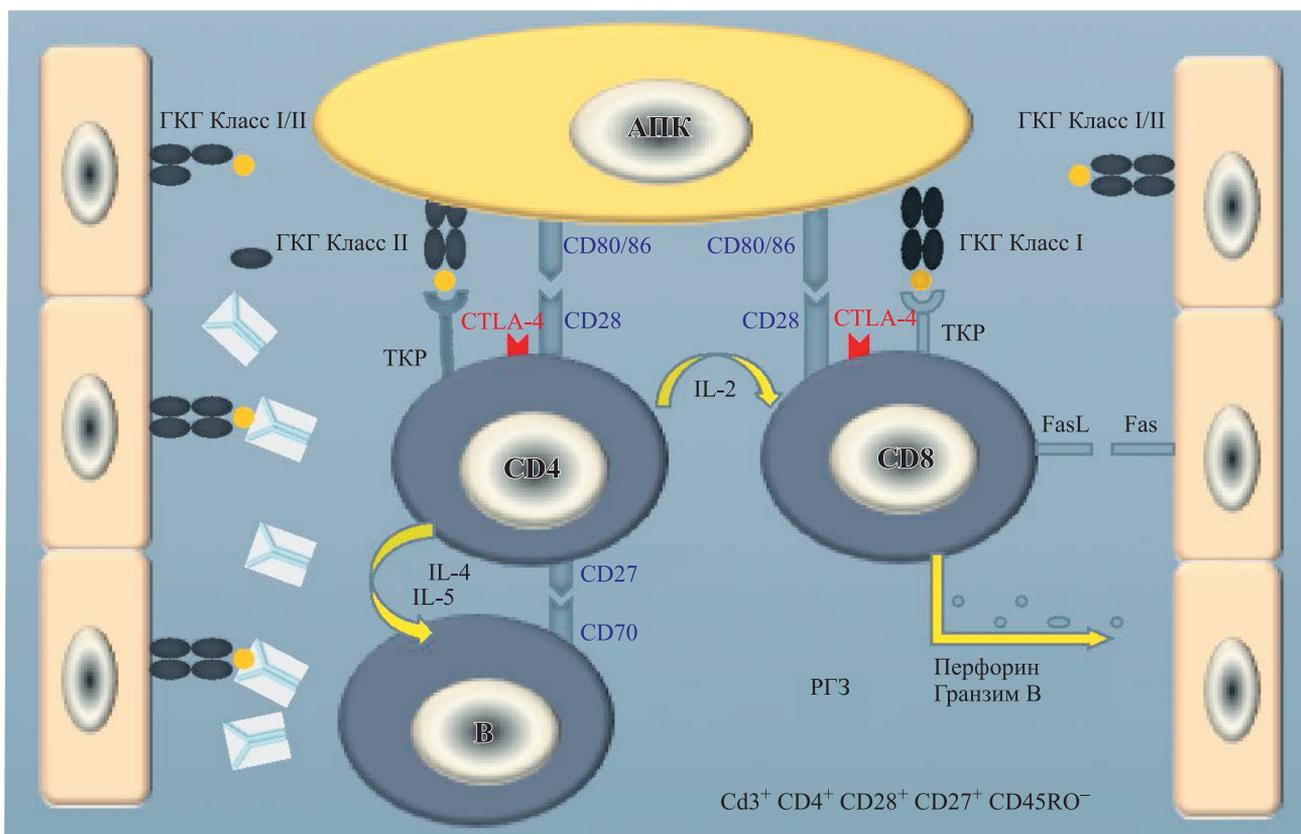


Рис. 6. Механизмы отторжения трансплантата: ГКГ – главный комплекс гистосовместимости; АПК – антигенпрезентирующая клетка; ТКР – Т-клеточный рецептор; IL-2 – интерлейкин-2

Fig. 6. Mechanisms of graft rejection

к продукции IF γ , TNF α , IL-2 и способность моноцитов к продукции TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 и IL-8. Изменяется также и регуляторный потенциал Т-клеток: Т-клетки, подвергшиеся воздействию ЭФХТ, снижают цитокин-продуцирующую способность даже не подвергшихся этой процедуре моноцитов после совместной инкубации [21]. Это выгодно отличает ЭФХТ от классической медикаментозной противокризисовой и базовой иммуносупрессивной терапии, направленной на неселективное сокращение популяции Т-клеток или нарушение их функции [22–24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют охарактеризовать ЭФХТ как очень перспективный метод, основывающийся на индукции процессов толерантности к антигенам гистосовместимости донорского органа. Применяя эту методику в раннем послеоперационном периоде при трансплантации почки, в дальнейшем мы можем предотвратить отторжение на доклиническом уровне, что приведет к улучшению качества жизни больного, снизит общий уровень иммуносупрессивной нагрузки, уменьшит количество инфекционных

и других осложнений, улучшит продолжительность жизни трансплантата и пациента. В результате применение ЭФХТ снизит число повторных трансплантаций, и соответственно, сократит очередь реципиентов в листе ожидания на трансплантацию почки.

Иммунологические данные, приведенные нами и подтвержденные многочисленными публикациями, создают благоприятные предпосылки к существенному уменьшению иммуносупрессивной нагрузки, что также благоприятно повлияет на качество жизни больного и длительность жизни трансплантата. Дальнейшее проведение исследований, касающихся глубоких механизмов иммуногенных и толерогенных процессов, даст основания для совершенствования новых, эффективных подходов к разработке методов, индуцирующих иммунологическую толерантность к ткани аллогенного органа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Ярилин АА. Иммунология: Учебник. 2010: 434. Yarinlin AA. Immunologiya: Uchebnik. 2010: 434.
2. Кильдюшевский АВ, Федулкина ВА, Фомина ОА, Фолин АМ. Применение экстракорпоральной фотохимиотерапии при лимфомах кожи и трансплантации солидных органов. Альманах клинической медицины. 2014; 30: 61–69. Kil'djushevskij AV, Fedulkina VA, Fomina OA, Folin AM.

- mina OA, Fomin AM. Primenenie jekstrakorporal'noj fotohimioterapii pri limfomah kozhi i transplantacii solidnyh organov. *Al'manah klinicheskoy mediciny*. 2014; 30: 61–69.
3. Barten MJ, Dieterlen MT. Extracorporeal photopheresis after heart transplantation. *Immunotherapy*. 2014; 6 (8): 927–944.
 4. Dieterlen MT, Bittner HB, Pierzchalski A, Dhein S, Mohr FW, Barten MJ. Immunological monitoring of extracorporeal photopheresis after heart transplantation. *Clinical & Experimental Immunology*. 2014; 176 (1): 120–128.
 5. Sato M, Waddell TK, Wagnetz U, Roberts HC, Hwang DM, Haroon A et al. Restrictive allograft syndrome (RAS): a novel form of chronic lung allograft dysfunction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2011; 30 (7): 735–742.
 6. Rummler S, Barz D. Extracorporeal photopheresis – a beneficial treatment for cardiac and lung transplant rejection. *Transplant international*. 2011; 24: 5.
 7. Jardine MJ, Bhandari S, Wyburn KR et al. Photopheresis for Problematic Renal Allograft Rejection. *J. of Clin. Apheresis*. 2009; 24: 161–169.
 8. Lamioni A, Carsetti R, Legato A et al. Induction of regulatory T cells after prophylactic treatment with photopheresis in renal transplant recipient. *Transplantation*. 2007; 83: 1393–1396.
 9. Лубенников АЕ, Трушкин РН, Артюхина ЛЮ. Современные взгляды на проблему удаления почечного трансплантата. *Московский хирургический журнал*. 2014; 4: 49–56. Lubennikov AE, Trushkin RN, Artjuhina LJ. Sovremennye vzgljady na problemu udalenija pochechnogo transplantata. *Moskovskij hirurgicheskij zhurnal*. 2014; 4: 49–56.
 10. Kusztal M, Kościelska-Kasprzak K, Gdowska W, Zabińska M, Myszka M, Klak R et al. Extracorporeal photopheresis as an antirejection prophylaxis in kidney transplant recipients: preliminary results. *Transplant Proc*. 2011 Oct; 43 (8): 2938–2940.
 11. Yamada AI, Salama AD, Sayegh MH. The role of novel T cell costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Feb; 13 (2): 559–575.
 12. Holtick U, Wang XN, Marshall SR, Scheid C, von Bergwelt-Baildon M, Dickinson AM. *In vitro* PUVA treatment preferentially induces apoptosis in alloactivated T cells. *Transplantation*. 2012; 94 (5): e31–34.
 13. Pilat N, Sayegh MH, Wekerle T. Costimulatory pathways in transplantation. *Semin immunol*. 2011; 23 (4): 293–303.
 14. Hannani D, Gabert F, Laurin D, Sall M, Molens JP, Hequet O et al. Photochemotherapy induces the apoptosis of monocytes without impairing their function. *Transplantation*. 2010; 89 (5): 492–499.
 15. Esposito P, Grosjean F, Rampino T, Libetta C, Gregorini M, Fasoli G et al. Costimulatory pathways in kidney transplantation: pathogenetic role, clinical significance and new therapeutic opportunities. *International Reviews of Immunology*. 2014; 33 (3): 212–233.
 16. Matthews NC, Faith A, Pfeffer P, Lu H, Kelly FJ, Hawrylowicz CM, Lee TH. Urban particulate matter suppresses priming of T helper type 1 cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor-activated human dendritic cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2014; 50 (2): 281–291.
 17. Ville S, Poirier N, Blancho G, Vanhove B. Co-stimulatory Blockade of the CD28/CD80-86/CTLA-4 Balance in Transplantation: Impact on Memory T-Cells? *Frontiers in Immunology*. 2015; 10 (6): 411.
 18. Vogel I, Kasran A, Cremer J, Kim YJ, Boon L, Van Gool SW, Ceuppens JL. CD28/CTLA-4/B7 costimulatory pathway blockade affects regulatory T-cell function in autoimmunity. *European Journal of Immunology*. 2015; 45 (6): 1832–1841.
 19. Walker LS, Sansom DM. Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends In Immunology*. 2015; 36 (2): 63–70.
 20. Karczewski J, Karczewski M, Glyda M, Wiktorowicz K. Role of TH1/TH2 cytokines in kidney allograft rejection. *Transplantation Proceedings*. 2008; 40 (10): 3390–3392.
 21. Bladon J, Taylor P. Extracorporeal photopheresis reduces the number of mononuclear cells that produce pro-inflammatory cytokines, when tested ex-vivo. *J. Clin. Apher*. 2002; 17 (4): 177–182.
 22. Bladon J, Taylor PC. Lymphocytes treated by extracorporeal photopheresis can down-regulate cytokine production in untreated monocytes. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 2005; 21 (6): 293–302.
 23. Thorp EB, Stehlik C, Ansari MJ. T-cell exhaustion in allograft rejection and tolerance. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2015; 20 (1): 37–42.
 24. Ruffoni E, Seveso M, Marson P, Tison T, Cozzi E. Role of antibodies in kidney transplant. *G Ital Nefrol*. 2012; 29 (54): 54–60.
 25. Ватазин АВ, Зул'карнаев АБ, Кильдюшевский АВ. Некоторые механизмы действия экстракорпоральной фотохимиотерапии при трансплантации солидных органов. *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. 2014; XVI; 1: 76–84. Vatazin AV, Zul'karnev AB, Kil'djushevskij AV. Nekotorye mehanizmy dejstvija jekstrakorporal'noj fotohimioterapii pri transplantacii solidnyh organov. *Vestnik transplantologii i iskusstvennyh organov*. 2014; XVI; 1: 76–84.

Статья поступила в редакцию 17.03.2016 г.
The article was submitted to the journal on 17.03.2016