

Функциональный профиль $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов с IgA-нефропатией

Д.Б. Нижегородова^{1,2}, К.С. Комиссаров^{1,3}, Е.И. Минченко⁴, А.Ю. Адамович¹, В.С. Пилотович¹, М.М. Зафранская^{1,2}

¹ Белорусская медицинская академия последипломного образования, 220013, Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3, Республика Беларусь

² Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ, 220070, Минск, ул. Долгобродская, 23/1, Республика Беларусь

³ Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, 220045, Минск, ул. Семашко, 8, Республика Беларусь

⁴ Учреждение здравоохранения «1-я Городская клиническая больница», 220013, Минск, пр. Независимости, 64, Республика Беларусь

Для цитирования: Нижегородова Д.Б., Комиссаров К.С., Минченко Е.И. и соавт. Функциональный профиль $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов с IgA-нефропатией. Нефрология и диализ. 2022; 24(1):72-81. doi: 10.28996/2618-9801-2022-1-72-81

The function profile of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in patients with IgA-nephropathy

D. Nizheharodava^{1,2}, K. Komissarov^{1,3}, E. Minchenko⁴, A. Adamovich¹, V. Pilotovich¹, M. Zafranskaya^{1,2}

¹ Belarusian Medical Academy of Post-Graduate Education, 3/3 P. Brovki, Minsk, 220013, Republic of Belarus

² International Sakharov Environmental Institute, Belarusian State University, 23/1 Dolgobrodskaya str., Minsk, 220070, Republic of Belarus

³ Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, 8 Semashko str., Minsk, 220045, Republic of Belarus

⁴ 1st City Clinical Hospital, 64 Nezavisimosti Ave., Minsk, 220013, Republic of Belarus

For citation: Nizheharodava D., Komissarov K., Minchenko E. et al. The function profile of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in patients with IgA-nephropathy. Nephrology and Dialysis. 2022; 24(1):72-81. doi: 10.28996/2618-9801-2022-1-72-81

Ключевые слова: IgA-нефропатия, гломерулонефрит, $\gamma\delta$ T-лимфоциты, проточная цитофлуориметрия, диагностика, патогенез, иммунология

Резюме

Актуальной задачей современной нефрологии и иммунологии является идентификация новых биомаркеров, которые можно использовать в качестве потенциальных ключевых патогенетических мишеней для мониторинга и прогнозирования эффективного лечения IgA-нефропатии. Принимая во внимание, что роль В-лимфоцитов и хелперных популяций $\alpha\beta$ T-клеток в иммунопатогенезе IgA-нефропатии достаточно хорошо изучена, перспективным направлением является исследование механизмов вовлечения популяции неклассических $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, эффекторная роль которых продемонстрирована при многих аутоиммунных заболеваниях.

Целью работы явилась оценка фенотипических и функциональных особенностей $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с IgA-нефропатией.

Материалы и методы исследования. Материалом исследования явилась периферическая венозная кровь 27 пациентов с диагнозом IgA-нефропатия, который подтверждали гистологическим исследованием биоптатов с использованием Оксфордской классификации (MEST-C). Идентификацию

Адрес для переписки: Дарья Борисовна Нижегородова
e-mail: nzh@tut.by

Corresponding author: Dr. Darya B. Nizheharodava
e-mail: nzh@tut.by

фенотипических и функциональных маркеров лимфоидных клеток периферической крови осуществляли методом проточной цитометрии. Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 8.0.

Результаты. У пациентов с IgA-нефропатией установлено увеличение количества $\gamma\delta$ T-лимфоцитов ($p < 0,01$) с преимущественным цитотоксическим $CD8^+CD56^+CD314^+$ фенотипом в сочетании с увеличением процента эффекторных $\gamma\delta$ T-клеток памяти ($p < 0,05$) в периферической крови относительно группы сравнения. При этом экспрессия киллерного рецептора CD314 на $\gamma\delta$ T-клетках обратно пропорционально коррелировала со скоростью клубочковой фильтрации ниже 60 мл/мин ($R = -0,62$, $p < 0,01$). Показано, что преимущественно у пациентов с высоким уровнем протеинурии (> 500 мг/сутки) количество эффекторных $\gamma\delta$ T-клеток памяти превышало аналогичный показатель в группе пациентов с низким риском прогрессирования снижения почечной функции ($p < 0,05$) и коррелировало с тяжестью морфологического повреждения почечной ткани, в частности, мезангиальной пролиферацией ($R = 0,60$; $p < 0,01$) и сегментарным гломерулосклерозом ($R = 0,61$; $p < 0,01$).

Заключение. Функциональный профиль циркулирующих $\gamma\delta$ T-лимфоцитов может быть использован в качестве биомаркера высокого риска прогрессирования IgA-нефропатии, а сами клетки представляют собой терапевтическую мишень для последующей разработки методов специфической иммунокорректирующей терапии болезни.

Abstract

An actual challenge of current nephrology and immunology is the identification of new biomarkers that can be used as the potential key pathogenetic targets for monitoring, predicting, and effective treatment of IgA-nephropathy. The role of B-lymphocytes and $\alpha\beta$ T-helpers in IgA-nephropathy immunopathogenesis is well studied. A promising direction is the investigation of mechanisms of non-classical $\gamma\delta$ T-lymphocytes involvement, the effector role of which has been demonstrated in many autoimmune diseases.

The aim of the work was to assess the phenotypic and functional characteristics of $\gamma\delta$ T-lymphocytes in the peripheral blood of patients with IgA-nephropathy.

Materials and methods. The material of the study was the peripheral venous blood of 27 patients with IgA-nephropathy, which was confirmed by histological examination of biopsies using the Oxford classification (MEST-C). Phenotypic and functional markers of peripheral blood lymphoid cells were identified by the flow cytometry method. The data were processed using the Statistica 8.0 software.

Results. The increase in the $\gamma\delta$ T-lymphocytes number ($p < 0,01$) with a predominant cytotoxic $CD8^+CD56^+CD314^+$ phenotype was established in association with the expansion of effector memory $\gamma\delta$ T-cells percentage ($p < 0,05$) in peripheral blood of patients with IgA-nephropathy compared with healthy donors. The level of the killer receptor CD314 expression on $\gamma\delta$ T-cells correlated with the glomerular filtration rate under 60 ml/min ($R = -0,62$, $p < 0,01$). It was shown that predominantly in patients with a high level of proteinuria (> 500 mg/day) the number of effector memory $\gamma\delta$ T-cells exceeded their number in the group of patients with a low risk of progressive decline in renal function ($p < 0,05$) and correlated with the severity of renal tissue morphological damage, in particular, mesangial proliferation ($R = 0,60$; $p < 0,01$) and segmental glomerulosclerosis ($R = 0,61$; $p < 0,01$).

Conclusion. The functional profile of $\gamma\delta$ T-lymphocytes can be used as a biomarker of the high risk of IgA-nephropathy progression as well as a therapeutic target for the subsequent development of specific immune-correction therapy.

Key words: IgA-nephropathy, glomerulonephritis, $\gamma\delta$ T-lymphocytes, flow cytometry, diagnostics, pathogenesis, immunology

Введение

В 1967 г. J. Berger и N. Hinglais описали новую клинко-гистологическую форму гломерулонефрита, которую охарактеризовали как «мезангиальное отложение депозитов IgA/IgG» [1]. В последующем J. Berger дополнил свое определение как болезнь почек с умеренными пролиферативными изменениями мезангиальных клеток, ассоциирующихся с микроскопической гематурией, в 15-20% случаев – с эпизодами макрогематурии, и носящей благоприятный характер, которая в настоящее время

идентифицируется как иммуноглобулин А нефропатия (ИГАН) [2].

Согласно клиническим рекомендациям по лечению гломерулонефритов (2011 г.), разработанных инициативной группой по Улучшению Глобальных Исходов Заболеваний Почек (Kidney Disease: Improving Global Outcomes, KDIGO), ИГАН диагностируется при биопсии почки на основании доминирующего или кодоминирующего окрашивания на иммуноглобулин А (IgA) при иммуногистохимическом исследовании и условии исключения волчаночного нефрита [3]. Причиной развития ИГАН могут выступать не только генетическая предрас-

положенность, но и различные факторы окружающей среды (инфекционные агенты, аллергены и др. ксенобиотики) [4]. По данным эпидемиологических наблюдений до 30% пациентов с данной формой гломерулонефрита могут достигать терминальной стадии хронической болезни почек в течение 10 лет с момента постановки диагноза [5].

В настоящее время принята мульти-«hit» гипотеза патогенеза, предложенная Suzuki и соавт., которая включает 4 этапа («hit») прогрессирования ИГАН. Вначале происходит избыточный синтез агалактозилированного IgA подкласса 1 («hit» 1), который выступает в роли аутоантигена, стимулирующего выработку аутоантител класса IgG («hit» 2), из которых в последующем образуются нефритогенные циркулирующие иммунные комплексы («hit» 3), депонирующиеся в почечных клубочках и инициирующие развитие мезангиальной пролиферации и локальной воспалительной реакции («hit» 4) [6]. При этом иммунопатогенез ИГАН характеризуется активацией как клеточного, так и гуморального звена иммунной системы. Если роль В-лимфоцитов и хелперных популяций классических $\alpha\beta$ T-лимфоцитов (Th2, Tfh, Th17, Th22) в образовании агалактозилированного IgA при ИГАН хорошо изучена, то механизмы вовлечения популяции $\gamma\delta$ T-лимфоцитов как на начальных стадиях нарушения гуморального иммунитета, так и на поздних стадиях, характеризующихся повреждением почечной ткани, до сих пор остаются объектом пристального внимания [4, 7, 8].

$\gamma\delta$ T-лимфоциты представляют собой гетерогенную субпопуляцию лимфоцитов с $\gamma\delta$ T-клеточным рецептором, которая является минорным пулом T-клеток периферической крови (1-10%) при одновременном доминировании в слизистых оболочках организма и тканях. С одной стороны, данная популяция относится к клеткам врожденного иммунитета благодаря своей способности распознавать консервативные непептидные антигены поврежденных клеток или различных патогенов. С другой стороны, подобно клеткам приобретенного иммунитета, $\gamma\delta$ T-лимфоциты подвергаются клональной экспансии и формируют пул антиген-специфических клеток памяти. При этом $\gamma\delta$ T-лимфоциты функционально отличны от классических $\alpha\beta$ T-лимфоцитов и обладают широким спектром биологических функций, включающих прямую и опосредованную цитотоксичность, антиген-презентирующую функцию, а также способность к регуляции иммунного ответа (прайминг классических T-клеток, хелперная помощь В-лимфоцитам, индукция созревания дендритных клеток, обеспечение выживания нейтрофилов и моноцитов) [9-11].

В настоящее время данные об антигенной специфичности и роли $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в патогенезе ИГАН немногочисленны и противоречивы. Частая ассоциация ИГАН с аутоиммунной патологией слизистых оболочек (целиакия, воспалительные за-

болевания кишечника) предполагает активное вовлечение мукозальных лимфоидных клеток, в том числе $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, в процессы нарушения синтеза IgA В-лимфоцитами и его галактозилирования при посттрансляционной модификации [12]. Показано, что $\gamma\delta$ T-лимфоциты, наряду с $\alpha\beta$ T-клетками, обнаруживаются среди тубулоинтерстициальных инфильтратов в нефробиопсийном материале при прогрессирующих формах ИГАН [13]. Поэтому важным остается изучение количественных характеристик и оценка функционального профиля $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, что может быть впоследствии использовано в качестве биомаркеров в диагностике аутоиммунной патологии почек.

В связи с этим, целью данного исследования являлась оценка фенотипических и функциональных особенностей $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с IgA-нефропатией.

Материалы и методы исследования

В исследование включены 27 пациентов с диагнозом «ИГАН», находившихся на стационарном лечении в нефрологических отделениях УЗ «1-я городская клиническая больница» г. Минска и ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии» (Республика Беларусь). Средний срок наблюдения от момента выполнения пункционной нефробиопсии до включения в исследование составил $25,4 \pm 14,6$ месяцев. 74% пациентов получали лекарственные средства, влияющие на ренин-ангиотензиновую систему. Основными критериями включения явились: возраст 18-65 лет; гистопатологически верифицированный диагноз ИГАН; наличие информированного согласия на участие в исследовании; сохраненная или умеренно сниженная почечная функция, определяющаяся по скорости клубочковой фильтрации (СКФ) выше 40 мл/мин. Критерии исключения: вторичные формы ИГАН; проведенное лечение иммуносупрессантами в анамнезе; сахарный диабет; гистологически доказанное сочетание ИГАН и нефропатии минимальных изменений, проявляющихся клиникой нефротического синдрома; наличие критерия «Г2» Оксфордской гистопатологической классификации ИГАН (MEST-C). В исследовании у пациентов не осуществляли учет сопутствующей патологии, ассоциированной с поражением слизистых оболочек.

Пациентам проводили стандартный набор лабораторных тестов. Уровни суточной протеинурии (ПУ), эритроцитурии и СКФ оценивали как средне-временные величины, которые определяли каждые 3 месяца с последующим расчётом среднего значения за весь период наблюдения. Допустимым нормальным количеством теряемого белка с мочой считали не более 0,15 г/сутки. Частичную клинико-лабораторную ремиссию расценивали при суточной протеинурии менее, чем 0,5 г. Микрогематурией счи-

Таблица 1 | Table 1

Клинико-демографическая и морфологическая характеристика пациентов с ИГАН

Clinical, demographic and morphological characteristics of patients with IgA-nephropathy

Количество пациентов, n	27
Пол, м/ж	18/9
Возраст, лет	33,0 (27,5 ÷ 37,5)
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	77,0 (61,5 ÷ 96,5)
Протеинурия, мг/сут	1000 (450 ÷ 1805)
Креатинин, мкмоль/л	92,0 (77,5 ÷ 107,0)
Гематурия, клеток в поле зрения	20 (5 ÷ 35)
M1, n (%)	25 (92,6%)
E1, n (%)	10 (37,0%)
S1, n (%)	22 (81,5%)
T1, n (%)	5 (18,5%)
C1, n (%)	6 (22,2%)

Примечание: M – мезангиальная пролиферация, E – эндотелиальная пролиферация, S – сегментарный гломерулосклероз, T – тубулярная атрофия, C – наличие полулуний, n – количество пациентов, у которых выявлены указанные изменения.

Note: M – mesangial proliferation, E – endothelial proliferation, S – segmental glomerulosclerosis, T – tubular atrophy/interstitial fibrosis, C – crescent formation, n – the number of patients with established morphological changes.

тали среднюю величину более 5 эритроцитов под большим увеличением при световой микроскопии с использованием окуляра 10× и объектива 40×. Величину почечной функции оценивали на основании величины сывороточного креатинина с использованием формулы СКД-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) [14]. Клинико-демографическая характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Группу сравнения составили 18 здоровых доноров, из них 9 мужчин и 9 женщин, медианный возраст 40,0 (36,0 ÷ 45,0) лет.

Морфологический метод. Диагноз ИГАН ставляли на основании гистологического исследования при выполнении стандартных и гистохимических окрасок, а также иммунофлуоресцентного исследования. Образцы ткани почки, фиксированные в 10% растворе забуференного формалина, проводили через серию спиртов, заливали в парафин, делали срезы толщиной до 2-3 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином, реактивом Шиффа, трихромом по Массону, конго-красным, серебром по Джонсу. Прямое иммунофлуоресцентное исследование проводили для выявления IgG, IgA, IgM, фибриногена, компонентов комплемента C3 и C1q, κ и λ легких цепей (Dako, Дания). Интенсивность свечения определяли полуколичественно (от 0 до 3+), где 0 – отсутствие свечения, 1+ – минимальное свечение, 2+ – умеренное и 3+ – максимальное свечение. Основным критерием постановки диагноза являлось наличие изолированного преимущественного гранулярного отложения в мезангии гломерул депозитов IgA, с возможным менее интенсивным

кодминирующим свечением IgG и/или IgM, C3-компонентом комплемента. Морфологический диагноз включал оценку показателей мезангиальной гиперклеточности (M), эндотелиальной пролиферации (E), сегментарного склероза (S), тубулярной атрофии с интерстициальным фиброзом (T) и количества клубочков с клеточными и фибрино-клеточными полулуниями (C) согласно дополненной Оксфордской классификации MEST-C [15]. Гистопатологическая характеристика пациентов с ИГАН представлена в таблице 1.

Метод проточной цитофлуориметрии. Популяции лимфоидных клеток определяли с применением панели моноклональных антител CYTO-STAT tetraCHROME (CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5) в сочетании с CD5-PC7, панели моноклональных антител DuraClone IM TCRs (TCR $\gamma\delta$ -FITC/TCR $\alpha\beta$ -PE/CD8-A700/CD3-APC-A750/CD45-KrO) (Beckman Coulter, США). Для идентификации функциональных субпопуляций $\gamma\delta$ T-лимфоцитов использовали моноклональные антитела CD3-FITC, CD314-PE, CD45RO-ECD, TCR $\gamma\delta$ -PC5, CD56-PC7, CD45-KRO (Beckman Coulter, США). Для иммунофенотипирования 100 мкл цельной крови добавляли в пробирку с моноклональными антителами, перемешивали и инкубировали в темноте течение 15 минут. Результаты регистрировали на 1000 событий $\gamma\delta$ T-лимфоцитов с использованием 10-канального проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter, США).

Статистический метод. Статистическую обработку данных выполняли в программе STATISTICA 8.0. Нормальность распределения проверяли с использованием теста Колмогорова-Смирнова. Для описательной статистики исследуемых групп использовали показатели медианы (Me) и интерквартильного интервала (25-й процентиль ÷ 75-й процентиль), представленные как Me (Q25 ÷ Q75). Сравнение независимых групп проводили непараметрическим критерием Манна-Уитни. Корреляционный анализ осуществляли с применением рангового коэффициента корреляции непараметрических данных Спирмена (R). Различия считались статистически значимыми при уровнях $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,01$ (***)

Результаты исследования

Для определения субпопуляционного состава лимфоидных клеток у пациентов с ИГАН и группы сравнения исследовано количество основных ($\alpha\beta$ T-лимфоциты, B-лимфоциты и NK-клетки) и вторичных ($\gamma\delta$ T-лимфоциты, B1-клетки и NKT-клетки) популяций лимфоидных клеток в периферической крови. Установлено увеличение абсолютного ($p < 0,01$) и относительного ($p < 0,01$) количества $\gamma\delta$ T-лимфоцитов на фоне снижения относительного содержания классической популяции $\alpha\beta$ T-клеток

Таблица 2 | Table 2

Количество лимфоидных клеток в периферической крови у пациентов с ИГАН, Me (Q25 ÷ Q75)
The number of lymphoid cells in peripheral blood of patients with IgA-nephropathy, Me (Q25 ÷ Q75)

Иммунологический показатель	ИГАН (n=27)	Группа сравнения (n=18)	p	
Лимфоциты, $\times 10^9/\text{л}$	7,00 (5,90 ÷ 7,60)	6,90 (6,23 ÷ 7,90)	n.s.	
Лимфоциты, %	37,00 (28,50 ÷ 45,00)	34,00 (32,00 ÷ 39,50)	n.s.	
CD3 ⁺ T-лимфоциты	$\alpha\beta$ T-клетки, %	68,20 (58,63 ÷ 70,27)	70,57 (67,75 ÷ 75,98)	$p < 0,05$
	$\alpha\beta$ T-клетки, $\times 10^6/\text{л}$	1612,10 (1214,40 ÷ 2148,30)	1890,27 (1278,22 ÷ 2134,00)	n.s.
	$\gamma\delta$ T-клетки, %	6,71 (4,13 ÷ 9,64)	2,86 (2,34 ÷ 5,25)	$p < 0,01$
	$\gamma\delta$ T-клетки, $\times 10^6/\text{л}$	129,39 (55,25 ÷ 201,57)	46,30 (37,43 ÷ 70,11)	$p < 0,01$
CD19 ⁺ B-лимфоциты	B ₂ -клетки, %	9,34 (6,87 ÷ 10,03)	9,45 (7,27 ÷ 12,58)	n.s.
	B ₂ -клетки, $\times 10^6/\text{л}$	206,80 (154,20 ÷ 299,10)	213,21 (174,83 ÷ 250,86)	n.s.
	B ₁ -клетки, %	14,22 (9,34 ÷ 19,37)	15,65 (11,65 ÷ 23,97)	n.s.
	B ₁ -клетки, $\times 10^6/\text{л}$	29,40 (12,20 ÷ 44,90)	34,64 (14,08 ÷ 53,46)	n.s.
CD56 ⁺ NK-клетки	NK-клетки, %	13,67 (10,39 ÷ 19,95)	12,66 (10,70 ÷ 16,18)	n.s.
	NK-клетки, $\times 10^6/\text{л}$	335,10 (234,55 ÷ 554,70)	296,65 (205,01 ÷ 386,99)	n.s.
	NKT-клетки, %	3,50 (1,23 ÷ 6,74)	4,34 (2,15 ÷ 13,58)	n.s.
	NKT-клетки, $\times 10^6/\text{л}$	5,20 (1,50 ÷ 12,85)	13,47 (4,48 ÷ 36,81)	n.s.

Примечание: n.s. – статистически значимые различия отсутствуют.

Note: n.s. – no significant differences.

Таблица 3 | Table 3

Абсолютное количество субпопуляций $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с ИГАН, Me (Q25 ÷ Q75)
The absolute number of $\gamma\delta$ T-cells subsets in peripheral blood of patients with IgA-nephropathy, Me (Q25 ÷ Q75)

Иммунологический показатель	ИГАН (n=27)	Группа сравнения (n=18)	p
$\gamma\delta$ TCR ⁺ CD8 ⁺ T-клетки, $\times 10^6/\text{л}$	41,83 (20,01 ÷ 97,68)	12,56 (7,82 ÷ 16,63)	$p < 0,001$
$\gamma\delta$ TCR ⁺ CD56 ⁺ T-клетки, $\times 10^6/\text{л}$	32,98 (14,32 ÷ 100,45)	21,87 (9,59 ÷ 31,80)	$p < 0,05$
$\gamma\delta$ TCR ⁺ CD314 ⁺ T-клетки, $\times 10^6/\text{л}$	97,37 (40,89 ÷ 193,42)	37,28 (28,01 ÷ 58,54)	$p < 0,05$
$\gamma\delta$ TCR ⁺ CD45RO ⁺ T-клетки, $\times 10^6/\text{л}$	29,62 (17,74 ÷ 44,77)	23,81 (10,67 ÷ 28,61)	$p < 0,05$

($p < 0,05$) у пациентов с ИГАН относительно аналогичных показателей в группе сравнения. При этом количество основных и минорных популяций B-лимфоцитов и NK-клеток в исследуемых группах статистически значимо не отличалось (таблица 2).

В связи с выявленными изменениями у пациентов с ИГАН охарактеризован функциональный фенотип циркулирующих $\gamma\delta$ T-клеток по экспрессии маркеров цитотоксической активности (ко-рецепторной молекулы CD8, молекулы клеточной адгезии CD56 и киллерного рецептора CD314) и маркера клеток иммунологической памяти CD45RO. На рисунке 1 представлены индивидуальные гистограммы пациента с ИГАН и здорового донора, отражающие общую тенденцию экспрессии функциональных маркеров на $\gamma\delta$ T-лимфоцитах в исследуемых группах.

Показано, что у пациентов с ИГАН наблюдается статистически значимое увеличение экспрессии всех маркеров цитотоксичности (CD8, CD56, CD314) на популяции $\gamma\delta$ T-лимфоцитов относительно группы сравнения (рисунок 1). Аналогичные различия прослеживались в абсолютном ко-

личестве данных функциональных субпопуляций $\gamma\delta$ T-клеток в исследуемых группах (таблица 3). При этом у пациентов с ИГАН экспрессия CD314 на $\gamma\delta$ T-лимфоцитах обратно пропорционально коррелировала с СКФ ниже 60 мл/мин ($R = -0,62$, $p < 0,01$).

Помимо цитотоксического функционального профиля $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, который преимущественно важен в качестве неспецифического механизма первой линии защиты организма и характеризует $\gamma\delta$ T-лимфоциты как клетки врожденного иммунитета, у пациентов с ИГАН исследована экспрессия маркера клеток памяти специфического иммунного ответа – CD45RO. Установлено статистически значимое увеличение относительного (рисунок 1) и абсолютного (таблица 3) количества $\gamma\delta$ TCR⁺CD45RO⁺T-клеток памяти у пациентов с ИГАН относительно группы сравнения. Анализ субпопуляционного состава $\gamma\delta$ T-лимфоцитов свидетельствует об увеличении эффекторных CD45RO⁺CD27⁻ $\gamma\delta$ T-клеток памяти у пациентов с ИГАН до 19,30 (16,71 ÷ 47,99)% или 26,90 (12,61 ÷ 42,51) $\times 10^6/\text{л}$ ($p < 0,01$), в то время как в группе сравнения аналогичный показатель

составил 3,20 (2,14 ÷ 4,14)% или 1,40 (1,00 ÷ 3,12) × 10⁶/л. При этом количество эффекторных $\gamma\delta$ T-клеток памяти в периферической крови пациентов с ИГАН коррелировало со степенью повреждения ткани согласно гистопатологическим маркерам сегментарного склероза и тубулярной атрофии с интерстициальным фиброзом (R=0,39, p<0,05).

Принимая во внимание установленную взаимосвязь иммунофенотипа $\gamma\delta$ T-лимфоцитов с клинико-морфологическими показателями, проведена сравнительная характеристика экспрессии функциональных маркеров $\gamma\delta$ T-клеток лимфоцитов в зависимости от уровня суточной ПУ, как одного из лабораторных маркеров риска прогрессирования хронической болезни почек. Результаты исследования функционального фенотипа $\gamma\delta$ T-лимфоцитов в периферической крови у пациентов с высоким (ПУ >500 мг/сутки) и низким (ПУ <500 мг/сутки) риском прогрессирования снижения почечной функции представлены на рисунке 2.

У пациентов из группы риска прогрессирования ИГАН установлено статистически значимое увеличение абсолютного и относительного количества CD314-позитивных $\gamma\delta$ T-клеток, а также эффекторных $\gamma\delta$ TCR⁺CD45RO⁺CD27⁻T-клеток памяти по сравнению с аналогичными показателями пациентов с ПУ <500 мг/сутки.

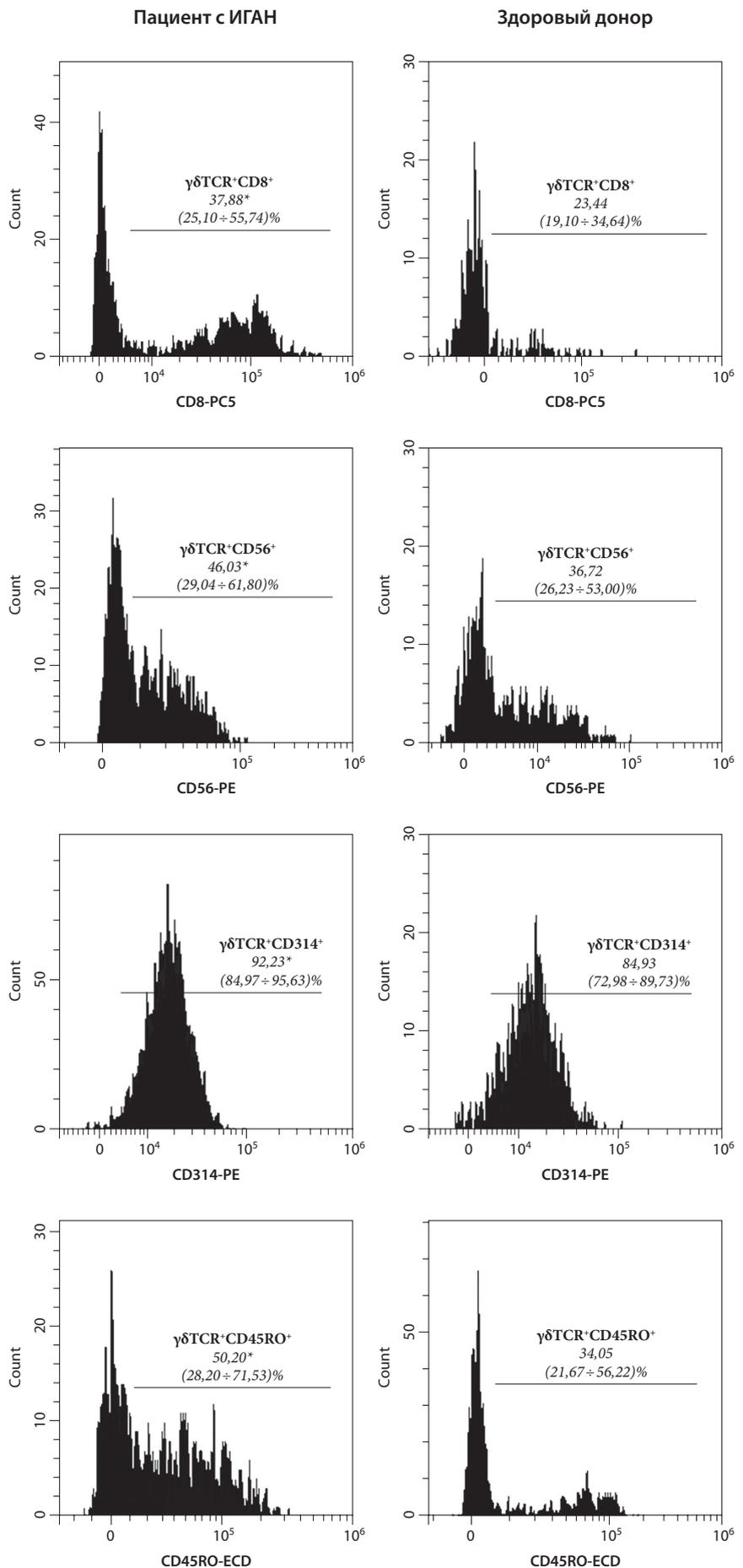


Рис. 1. Субпопуляции $\gamma\delta$ T-лимфоцитов (%) в периферической крови у пациентов с ИГАН и группы сравнения, Me (Q25 ÷ Q75)

Примечание: * – p<0,05.

Fig. 1. $\gamma\delta$ T-lymphocytes subsets (%) in peripheral blood of patients with IgA-nephropathy and comparative group, Me (Q25 ÷ Q75)

Note: * – p<0,05.

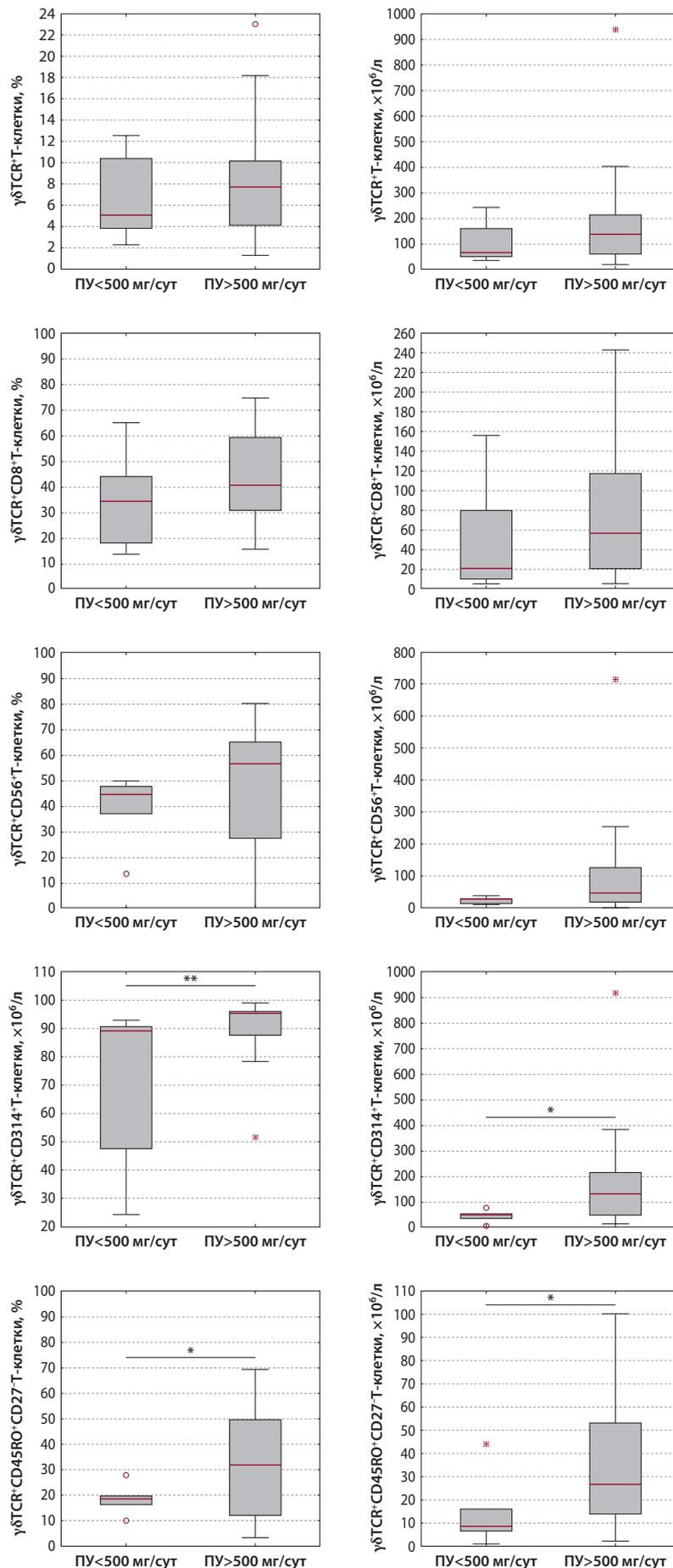


Рис. 2. Количество $\gamma\delta\text{T}$ -лимфоцитов в периферической крови у пациентов с ИГАН с высоким и низким риском прогрессирования снижения почечной функции (Me (Q25 ÷ Q75))

Примечание: \square – Me (Q25 ÷ Q75); I – минимальное и максимальное значение; \circ – выбросы; $*$ – экстремальные значения; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Fig. 2. The number of $\gamma\delta\text{T}$ -lymphocytes (%) in peripheral blood of patients with IgA-nephropathy with high and low risk of renal function impairment progression, Me (Q25 ÷ Q75)

Notes: \square – Me (Q25 ÷ Q75); I – non-outlier range; \circ – outliers; $*$ – extremes; * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

При этом количество эффекторных Т-клеток памяти в периферической крови пациентов с высоким риском прогрессирования ИГАН коррелировало с мезангиальной пролиферацией и сегментарным гломерулосклерозом ($R=0,61$; $p < 0,01$) в почечной ткани.

Обсуждение

Т-лимфоциты, экспрессирующие $\alpha\beta\text{T}$ -клеточный рецептор, вовлекаются в патогенез ИГАН на различных стадиях заболевания: популяции Т-хелперы 2-го (Th2) и 17-го типа (Th17) участвуют в процессе aberrantного галактозилирования IgA1 во время посттрансляционной модификации («hit1»); фолликулярные Т-хелперы (Thf) стимулируют продукцию аутоантител к галактозо-дефицитному IgA1 («hit2»), что часто сопряжено с мукозальной инфекцией; Th22 инициируют процессы фиброзирования, а цитотоксические Т-клетки участвуют в прямом повреждении клеток почечных клубочков («hit4») [4]. Наряду с этим, роль $\gamma\delta\text{T}$ -лимфоцитов, представляющих собой гетерогенную популяцию клеток с широким спектром биологического действия, недостаточно исследована в контексте каждой стадии патогенеза ИГАН. Принимая во внимание преимущественную локализацию $\gamma\delta\text{T}$ -лимфоцитов в слизистых оболочках, а также их способность быстро и активно синтезировать цитокины [10], можно предположить, что выявленное увеличение данной минорной популяции в периферической крови

пациентов с ИГАН может отражать их участие, наряду с Th2 и Th17, в процессе эпигенетического нарушения галактозилрования IgA1 («hit1»). Так, Suzuki с соавт. (2014) и Lin с соавт. (2018) продемонстрировали на IgA1-секретирующих клеточных линиях человека роль цитокинов IL-4 [16] и IL-17 [17], синтезируемых, соответственно, Th2- и Th17-клетками, в гиперметилировании участков генов *C1GALT1* и *C1GALT1C1*, что приводит к снижению активности β 1,3-галактозилтрансферазы, и, как следствие, нарушению терминального гликозилрования секретируемого IgA1. Известно, что $\gamma\delta$ T-клетки также являются источником IL-17 и его продукция более выражена на ранних стадиях иммунного ответа по сравнению с таковой $\alpha\beta$ T-лимфоцитами, в том числе в условиях формирования аутоиммунного воспаления, так как не требует антиген-специфического праймирования или клональной экспансии лимфоцитов [10, 11]. Поэтому $\gamma\delta$ T-клетки потенциально способны намного раньше приводить к IL-17-медианному снижению мРНК *C1GALT1* и *C1GALT1C1*, способствуя увеличению продукции галактозо-дефицитного IgA. Кроме того, еще одним возможным патогенетическим механизмом $\gamma\delta$ T-лимфоцитов при ИГАН является их способность синтезировать трансформирующий фактор роста бета (TGF β) и тем самым усиливать гиперпродукцию мукозального абберантного IgA B-лимфоцитами [18].

Наряду с увеличением абсолютного и относительного количества $\gamma\delta$ T-лимфоцитов у пациентов с ИГАН в данном исследовании выявлено повышение количества CD8-позитивных $\gamma\delta$ T-клеток (в отдельных случаях свыше 50%), что свидетельствует об их преимущественной способности участвовать подобно цитотоксическим $\alpha\beta$ T-лимфоцитам в механизмах контактного киллинга и повреждать клетки почечных клубочков посредством перфорин-гранзимового пути цитолиза [19, 20]. Помимо этого, увеличение экспрессии CD56 (neural cell adhesion molecule, NCAM) характеризует $\gamma\delta$ T-лимфоциты у пациентов с ИГАН как более дифференцированные цитотоксические эффекторные клетки, способные подобно CD56^{dim}NK-клеткам синтезировать большое количество цитокинов и вовлекаться в механизмы антитело-зависимой клеточной цитотоксичности [21, 22]. Повышение конститутивной экспрессии рецептора естественной цитотоксичности CD314 (natural killer group 2 member D, NKG2D) предполагает активное участие $\gamma\delta$ T-лимфоцитов пациентов в распознавании маркеров клеточного повреждения (неклассических молекул главного комплекса гистосовместимости или белков теплового шока), что может приводить к последующей клеточной активации, синтезу провоспалительных цитокинов (фактора некроза опухоли α и др.) и усилению их цитолитического потенциала в патогенезе ИГАН [23, 24].

Известно, что в зависимости от ко-экспрессии молекулы CD27 (рецептора суперсемейства фактора

некроза опухоли α) различают не проявляющие цитотоксических свойств центральные клетки памяти (CD27⁺) и эффекторные клетки памяти (CD27⁻), способные быстро реализовывать литические механизмы [25]. Выявленное увеличение количества субпопуляции эффекторных CD45RO⁺CD27⁻ $\gamma\delta$ T-клеток памяти у пациентов с ИГАН отражает их длительную персистенцию в организме и участие в повторном распознавании антигенных структур, что может способствовать постоянной абберантной стимуляции клеточного иммунитета, формированию хронического воспаления и повреждению ткани наряду с $\alpha\beta$ T-клетками памяти. Согласно литературным данным CD27⁻ $\gamma\delta$ T-лимфоциты являются преимущественно IL-17-синтезирующими клетками, что также подтверждает их способность вовлекаться в нарушение гликозилрования IgA при посттрансляционной модификации [26].

В экспериментальных исследованиях Rosenkranz A. и соавт. продемонстрировали, что эффекторные $\gamma\delta$ T-клетки способны мигрировать в почечную ткань, где секретируют провоспалительные цитокины, инициирующие привлечение макрофагов в очаг воспаления, синтез ими биологически активных медиаторов (оксиданты, протеазы и др.), связывание компонентов комплемента и последующее образование фибриновых депозитов, что приводит к повреждению гломерулярной базальной мембраны и развитию ПУ [27]. Показано, что T-клеточный рецептор мигрировавших $\gamma\delta$ T-лимфоцитов способен распознавать компоненты белков теплового шока бактериального происхождения и имеет перекрестную реактивность к мембранным протеинам клеток почечной паренхимы [28], в связи с чем эффект молекулярной мимикрии может являться одним из патогенетических механизмов ИГАН.

Заключение

В настоящее время исследования иммунопатогенеза ИГАН сконцентрированы на дисрегуляции B-лимфоцитов, а также нарушении продукции и посттрансляционной модификации IgA, однако проведенные рандомизированные контролируемые клинические исследования ритуксимаба (моноклональных антител к CD20 антигену B-лимфоцитов) показали отсутствие его эффекта на снижение уровня ПУ и сывороточного агалактозилрованного IgA1 или антител к нему [29]. Это еще раз указывает на необходимость более тщательного изучения T-клеточного звена иммунитета, а в особенности популяции $\gamma\delta$ T-лимфоцитов, которая может намного быстрее, чем другие T-клеточные популяции, вовлекаться в механизмы иммунологической защиты организма и участвовать в формировании хронического иммунного воспаления.

В периферической крови пациентов с ИГАН выявлено повышение количества $\gamma\delta$ T-лимфоцитов,

преимущественно с фенотипом CD8⁺CD56⁺CD314⁺, что характеризует цитотоксический функциональный профиль данной популяции. Наряду с этим у пациентов с высоким уровнем ПУ треть популяции является эффекторными $\gamma\delta$ T-клетками памяти, уровень которых коррелирует с тяжестью морфологического повреждения, что указывает на высокий риск прогрессирования заболевания и может быть использовано в качестве биомаркера в ранней диагностике ИГАН. При этом цитофлуориметрическое определение $\gamma\delta$ T-лимфоцитов имеет потенциальное диагностическое преимущество перед определением уровня галактозилированного IgA в плане доступности реагентов, их стоимости и методики определения.

Таким образом, $\gamma\delta$ T-лимфоциты представляют собой новую потенциальную терапевтическую мишень для лечения ИГАН: с одной стороны, данную популяцию клеток можно блокировать моноклональными антителами к $\gamma\delta$ T-клеточному рецептору, а с другой – изменять *ex vivo* цитотоксический профиль $\gamma\delta$ T-лимфоцитов на иммунорегуляторный.

Никто из авторов не имеет конфликтов интересов.

Исследования проведены в рамках гранта №20192184 Министерства Здравоохранения Республики Беларусь.

The authors have declared that no conflict of interest exists.

This study was supported by a Grant for Scientific Research №20192184 from the Ministry of Health of Republic of Belarus.

Вклад авторов: Д.Б.Н., К.С.К., В.С.П., М.М.З. – концепция и дизайн исследование, окончательное редактирование текста рукописи; К.С.К. и Е.И.М. – сбор и обработка клинических данных, биохимические и морфологические исследования; Д.Б.Н. и А.Ю.А. – проведение иммунологических исследований; Д.Б.Н. и К.С.К. – статистическая обработка данных, написание исходного варианта текста.

Author's Contributions: D.N., K.K., V.P., M.Z. – concept and design research, final editing of the manuscript; K.K. and E.M. – collection and processing of clinical data, biochemical and morphological studies; D.N. and A.A. – immunological studies fulfillment; D.N. and K.K. – statistical data processing, writing the original version of the manuscript.

Список литературы

- Berger J., Hinglais N. Les dépôts intercapillaires d'IgA-IgG. *J. Urol. Nephrol.* 1968; 74: 694-695. PMID: 4180586.
- Berger J. *IgA glomerular deposits in renal disease. Transplant. Proc.* 1969; 1: 939-944. PMID: 4107073.
- Roberts I.S., Cook H.T., Trojanov S. et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney Int.* 2009; 76: 546-556. doi: 10.1038/ki.2009.168.
- Ruszkowski J., Lisowska K., Pindel M. T cells in IgA nephropathy: role in pathogenesis, clinical significance and potential therapeutic target. *Clin. Exp. Nephrol.* 2019; 23: 291-303. doi: 10.1007/s10157-018-1665-0.
- Barbour S.J., Espino-Hernandez G., Reich H.N. et al. The MEST score provides earlier risk prediction in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 2016; 89: 167-75. doi: 10.1038/ki.2015.322.
- Suzuki H., Kiryluk K., Novak J. et al. The pathophysiology of IgA nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2011; 22: 1795-803. doi: 10.1681/ASN.2011050464.
- Kabelitz D. Gamma Delta T Cells ($\gamma\delta$ T Cells) in Health and Disease: In Memory of Professor Wendy Havran. *Cells.* 2020; 9: 1-7. doi: 10.3390/cells9122564.
- Chang S., Li X. The Role of Immune Modulation in Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Front. Med.* 2020; 7(92): 1-15. doi: 10.3389/fmed.2020.00092.
- Peters C., Kabelitz D., Wesch D. Regulatory functions of $\gamma\delta$ T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 2018; 75(12): 1-14. DOI: 10.1007/s00018-018-2788-x.
- Paul S., Giri S., Lal G. Role of gamma-delta ($\gamma\delta$) T Cells in autoimmunity. *J. Leukoc. Biol.* 2015; 97: 259-271. doi: 10.1189/jlb.3RU0914-443R.
- Fichtner A.S., Ravens S., Prinz I. Human $\gamma\delta$ TCR Repertoires in Health and Disease. *Cells.* 2020; 9(800): 1-14. doi: 10.3390/cells9040800.
- Yeo S.C., Cheung C.K., Barratt J. New insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. *Pediatr. Nephrol.* 2018; 33: 763-777. doi: 10.1007/s00467-017-3699-z.
- Wu H., Clarkson A.R., Knight J.F. Restricted $\gamma\delta$ T-cell receptor repertoire in IgA nephropathy renal biopsies. *Kidney Int.* 2001; 60: 1324-31. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00937.x.
- Levey A.S., Stevens L.A., Schmid C.H. et al. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann. Intern. Med.* 2009; 150(5): 604-612. doi: 10.7326/0003-4819-150-9-200905050-00006.
- Trimarchi H. Oxford Classification of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA Nephropathy Classification Working Group. *Kidney Int.* 2017; 91(5): 1014-1021. doi: 10.1016/j.kint.2017.02.003.
- Suzuki H., Raska M., Yamada K. et al. Cytokines alter IgA1 O-glycosylation by dysregulating C1GalT1 and ST6GalNAc-II enzymes. *J. Biol. Chem.* 2014; 289: 5330-9. doi: 10.1074/jbc.M113.512277.
- Lin J.-R., Wen J., Zhang H. et al. Interleukin-17 promotes the production of underglycosylated IgA1 in DAKIKI cells. *Ren. Fail.* 2018; 40: 60-7. doi: 10.1080/0886022X.2017.1419972.
- Toyabe S., Harada W., Uchiyama M. Oligoclonally expanding gamma delta T lymphocytes induce IgA switching in IgA nephropathy. *Clin. Exp. Immunol.* 2001; 124: 110-7. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01494.x.
- Gibbins D., Befus A.D. CD4 and CD8: An inside-out coreceptor model for innate immune cells. *J. Leukoc. Biol.* 2009; 86: 251-259. doi: 10.1189/jlb.0109040.

20. *Fonseca S., Pereira V., Lau C.* Human Peripheral Blood Gamma Delta T Cells: Report on a Series of Healthy Caucasian Portuguese Adults and Comprehensive Review of the Literature. *Cells*. 2020; 9: 729. doi: 10.3390/cells9030729.

21. *Montaldo E., Zotto G.D., Chiesa M.D.* Human NK Cell Receptors/Markers: A Tool to Analyze NK Cell Development, Subsets and Function. *Cytometry Part A*. 2013; 83A: 702-713. doi: 10.1002/cyto.a.22302.

22. *Van Acker H.H., Capsomidis A., Smits E.L. et al.* CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front. Immunol.* 2017; 8: 892. doi: 10.3389/fimmu.2017.00892.

23. *Vantourout P. and Hayday A.* Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13(2): 88-100. doi:10.1038/nri3384.

24. *Gogoi D. and Chiplunkar S.V.* Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: Bench to bedside. *Indian J. Med. Res.* 2013; 138: 174-180. doi: PMID: 24434328.

25. *Mahnke Y.D., Brodie T.M., Sallusto F. et al.* The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *Eur. J. Immunol.* 2013; 43: 2797-2809. doi: 10.1002/eji.201343751.

26. *Lalor S.J. and McLoughlin R.M.* Memory gd T Cells—Newly Appreciated Protagonists in Infection and Immunity. *Trends Immunol.* 2016; 37(10): 690-702. doi: 10.1016/j.it.2016.07.006.

27. *Rosenkranz A., Knight S., Sethi S. et al.* Regulatory interactions of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2000; 58(3): 1055-1066. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.00263.x.

28. *Falk M.C., Ng G., Zhang G.Y. et al.* Infiltration of the kidney by $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells: effect on progression in IgA nephropathy. *Kidney Int.* 1995; 47: 177-85. doi: 10.1038/ki.1995.21.

29. *Lafayette R.A., Canetta P.A., Rovin B.H. et al.* A randomized, controlled trial of rituximab in IgA nephropathy with proteinuria and renal dysfunction. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2017; 28: 1306-13. doi: 10.1681/ASN.2016060640.

Дата получения статьи: 27.08.2021

Дата принятия к печати: 10.01.2022

Submitted: 27.08.2021

Accepted: 10.01.2022