

DOI: 10.28996/2618-9801-2018-4-385-393

Субпопуляции Т- и В-лимфоцитов у пациентов с терминальной стадией хронической болезни почек

Б.Т. Джумабаева, Л.С. Бирюкова, Н.М. Капранов, И.В. Гальцева,
Ю.О. Давыдова, Н.В. Пурло, Л.Р. Карапетян

ФГБУ национальный медицинский исследовательский центр Гематологии МЗ РФ, Москва, Россия

Subpopulations of T- and B-lymphocytes in patients with end-stage chronic kidney diseases

B.T. Dzhumabaeva, L.S. Biryukova, N.M. Kapranov, I.V. Galtseva,
Yu.O. Davydova, N.V. Purlo, L.R. Karapetyan

National medical research center of Hematology, Moscow, Russian Federation

Ключевые слова: хроническая болезнь почек (ХБП), гемодиализ, субпопуляция Т-лимфоцитов, В1, В2, В-клетки памяти

Резюме

Пациенты с терминальной стадией хронической болезни почек подвержены инфекционным осложнениям, что обусловлено подавлением иммунной системы.

Цель исследования: определение изменений субпопуляций Т- и В-клеточного иммунитета в зависимости от длительности заместительной почечной терапии у пациентов с хронической болезнью почек 5 стадии (ХБП 5).

Материалы и методы: в исследование включен 21 диализ-зависимый пациент с ХБП 5, без инфекционных осложнений. Медиана возраста 43 года, муж – 15, жен – 6. Пациенты были разделены на 3 группы в зависимости от длительности получаемого планового гемодиализа (ПГД). В 1-ю группу включены пациенты, находившиеся на ПГД от 1 до 2 лет ($n=6$); во 2-ю группу – от 2 до 3 лет ($n=8$); в 3-ю – 3 и более лет ($n=7$). Группу контроля составили 20 здоровых доноров крови. Относительное и абсолютное количество субпопуляций Т- и В-лимфоцитов определялись в образцах пре-диализной периферической крови пациентов и у здоровых доноров крови методом проточной цитометрии (BD FACSCanto II).

Результаты: у пациентов, находившихся на ПГД до 3 лет не выявлены изменения в Т- и В-клеточном иммунитете. У пациентов при продолжительном ГД (3 и более лет) количество CD3+, CD4+, CD8+ лимфоцитов, НК-клетки, популяции В-клеток, а также соотношение CD4/CD8 не отличались от контрольной группы, но выявлено снижение абсолютного количества наивных CD4+, доли эффекторных CD4+ клеток памяти и количества Т-регуляторных клеток, а также количество наивных CD8+ клеток. Доли CD4+ и CD8+ клеток центр памяти и количества терминальных эффекторных CD4+ клеток повышались.

Заключение: полученные данные позволяют лучше понять патогенетические механизмы изменения клеточного иммунитета при гемодиализе у пациентов с ХБП 5, в перспективе корректировать вероятные изменения и определить тактику терапевтического ведения.

Abstract

Patients with end-stage chronic kidney diseases are prone to infectious complications due to suppression of the immune system.

Адрес для переписки: Джумабаева Болдурыз Толгонбаевна
e-mail: bola.blood@yandex.ru

Corresponding author: Boldukyz T. Djumabaeva
e-mail: bola.blood@yandex.ru

The aim of the study was to identify changes in subpopulations of T- and B-cells depending on the duration of renal replacement therapy in patients with chronic kidney disease stage 5 (CKD-5).

Materials and methods: twenty-one hemodialysis patients with CKD-5 and without infectious complications were studied (median age 43, m/f ratio was 15/6). The patients were divided into 3 groups depending on the duration of the hemodialysis. The 1st group included patients who were on hemodialysis from 1 to 2 years ($n=6$); in the 2nd group – from 2 to 3 years ($n=8$); in the 3rd – 3 and more years ($n=7$). The 20 healthy blood donors were used as controls.

The percentage and absolute numbers of T- and B-lymphocytes' subsets were determined in patients' pre-dialysis peripheral blood samples and in blood samples of healthy donors by flow cytometric analysis (BD FACSCanto II).

Results: the changes in subsets of T- and B-cells were not detected in patients who received hemodialysis up to 3 years.

In patients with long-term hemodialysis (3 and more years) the number of CD3+, CD4+, CD8+ lymphocytes, NK-cells, B-cells subsets and the ratio of CD4/CD8 did not differ from the control group. But the absolute number of Naive CD4+, and the percentage of Effector memory CD4+ cells, and the total number of Treg cells and of Naive CD8+ cells were decreased. The percentage number of the Central memory CD4+ and CD8+ cells and the total number of the Terminal effector CD4+ cells were increased.

Conclusion: the data obtained allow us to better understand the pathogenesis of cellular immunity changes in patients with CKD-5. This could help to correct such changes and therapeutic tactics in the future

Key words: chronic kidney disease, hemodialysis, T-lymphocyte subsets, B1, B2, B-cell memory

Сокращения

ХБП 5 – хроническая болезнь почек в 5 (терминальной) стадии;

ЗПТ – заместительной почечной терапии;

ГД – гемодиализ

NV (Naïve cell) – наивные клетки;

CM (Central memory) – центральные клетки памяти;

TM (Transitory memory cells) – транзиторные клетки памяти;

EM (Effector memory cells) – эффекторные клетки памяти;

TE (Terminal effector) – терминальные эффекторные клетки;

Treg (T-regulatory cells) – регуляторные Т-клетки

НК-клетки (Natural killer cells) – естественные (натуральные) киллеры

Хроническая болезнь почек 5 стадии характеризуется системным воспалением и иммунной недостаточностью, которая обусловлена:

- снижением количества гранулоцитов, моноцитов и фагоцитарной функции макрофагов [1, 2, 3, 4];
- уменьшением количества антиген-презентирующих дендритных клеток [5];
- уменьшением количества В-клеток, производящих антитела [1, 6, 7];
- изменением Т-клеточного иммунитета.

Т-клетки представляют основной компонент адаптивной иммунной системы и играют центральную роль в клеточном иммунитете. По данным ряда авторов, у пациентов с ХБП 5 наблюдалось снижение соотношения CD4/CD8, увеличение Th1/Th2 и истощение наивных и центральных CD4 и CD8 клеток памяти [8, 9, 10]. По результатам исследований других авторов, отмечено уменьшение популяции

наивных CD4+ и CD8+ клеток, а также эффекторных CD8-клеток памяти, но не выявлено снижение клеток центральной памяти [11]. У пациентов с наличием инфекционных осложнений отмечено снижение абсолютного количества CD3+ лимфоцитов, хелперов и супрессоров, а у пациентов без инфекций наблюдалось снижение CD3+ лимфоцитов, хелперов, в то время как CD8+ и НКТ лимфоциты оставались без изменений [4]. Причина таких разноречивых данных не ясна. Влияние длительности проводимой заместительной почечной терапии на изменение Т- и В-субпопуляций лимфоцитов в литературе не освещена.

Целью настоящего исследования было определение количественного изменения субпопуляций Т- и В-лимфоцитов у пациентов с ХБП 5 в зависимости от длительности заместительной почечной терапии.

Материалы и методы

В исследование включен 21 пациент с ХБП 5 без инфекционных осложнений. Медиана возраста 43 года, мужчин – 15, женщин – 6. В зависимости от длительности получаемой плановой заместительной почечной терапии (ЗПТ) пациенты были разделены на 3 группы. В 1-ю группу включены пациенты, находившиеся на программном гемодиализе (ГД) от 1 до 2 лет ($n=6$); во 2-ю группу – от 2 до 3 лет ($n=8$); в 3-ю – 3 и более лет ($n=7$). Контрольную группу составили 20 здоровых доноров крови.

Методом проточной цитометрии (BD FACS-Canto II) у диализ-зависимых пациентов ХБП5 и у здоровых доноров крови определяли относительное и абсолютное количество CD3+, CD4+, CD8+ Т-лимфоцитов, наивных (NV) Т-клеток, Т-клеток центральной памяти (СМ), транзиторных Т-клеток памяти (ТМ), эффекторных Т-клеток памяти (ЕМ), терминальных эффекторных Т-клеток (ТЕ), регуляторных Т-клеток (Тreg), НК-клеток, наивных В-клеток (В1, В2) и В-клеток памяти.

Сравнение между показателями пациентов и контрольной группой проводили с помощью критерия Крускала-Уоллиса с поправкой на множественные сравнения. Значимыми признавались отличия при $p < 0,05$.

Результаты

Абсолютное количество лейкоцитов у пациентов соответствовало контрольной группе и не зависело от продолжительности ЗПТ во всех группах. Доля и абсолютное количество CD3+, CD4+, CD8+, как у всей совокупности пациентов, так и в группах, отличающихся по продолжительности ЗПТ, не отличались достоверно от показателей контрольной группы (Рис. 1, 2, 3). Изменений в соотношении CD4 и CD8 (иммунорегуляторный индекс) не выявлено.

Общее количество наивных CD4+ клеток у пациентов было таким же, как в контрольной группе, но их абсолютное количество в 3-й группе было статистически значимо ниже (Рис. 2б). Доля СМ CD4+ клеток у пациентов была значимо выше

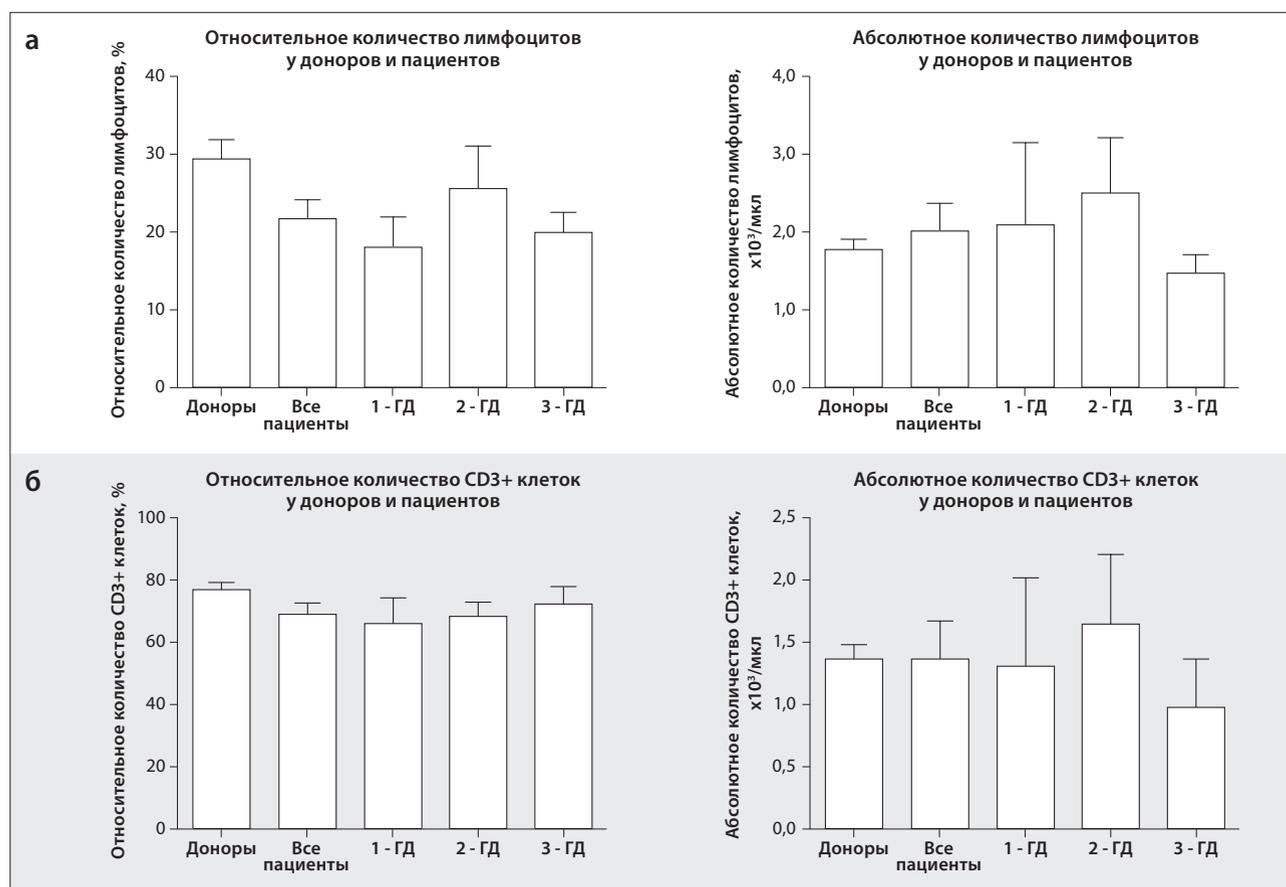


Рис. 1. Относительное и абсолютное количество лейкоцитов, CD3+ клеток

По оси абсцисс: доноры крови – контрольная группа; все пациенты – общее количество пациентов; 1-я группа – пациенты, находившиеся на ГД от 1 до 2 лет; 2-я группа – пациенты, находившиеся на ГД от 2 до 3 лет; 3-я группа – пациенты, находившиеся на ГД от 3 и более лет.

Fig. 1. Relative and absolute number of leukocytes, CD3+ cells

X-line: blood Donors – control group; all patients – the total number of patients; 1st group – patients on hemodialysis (HD) from 1 to 2 years; 2nd group – patients on HD from 2 to 3 years; 3d group – patients from 3 and more years of HD.

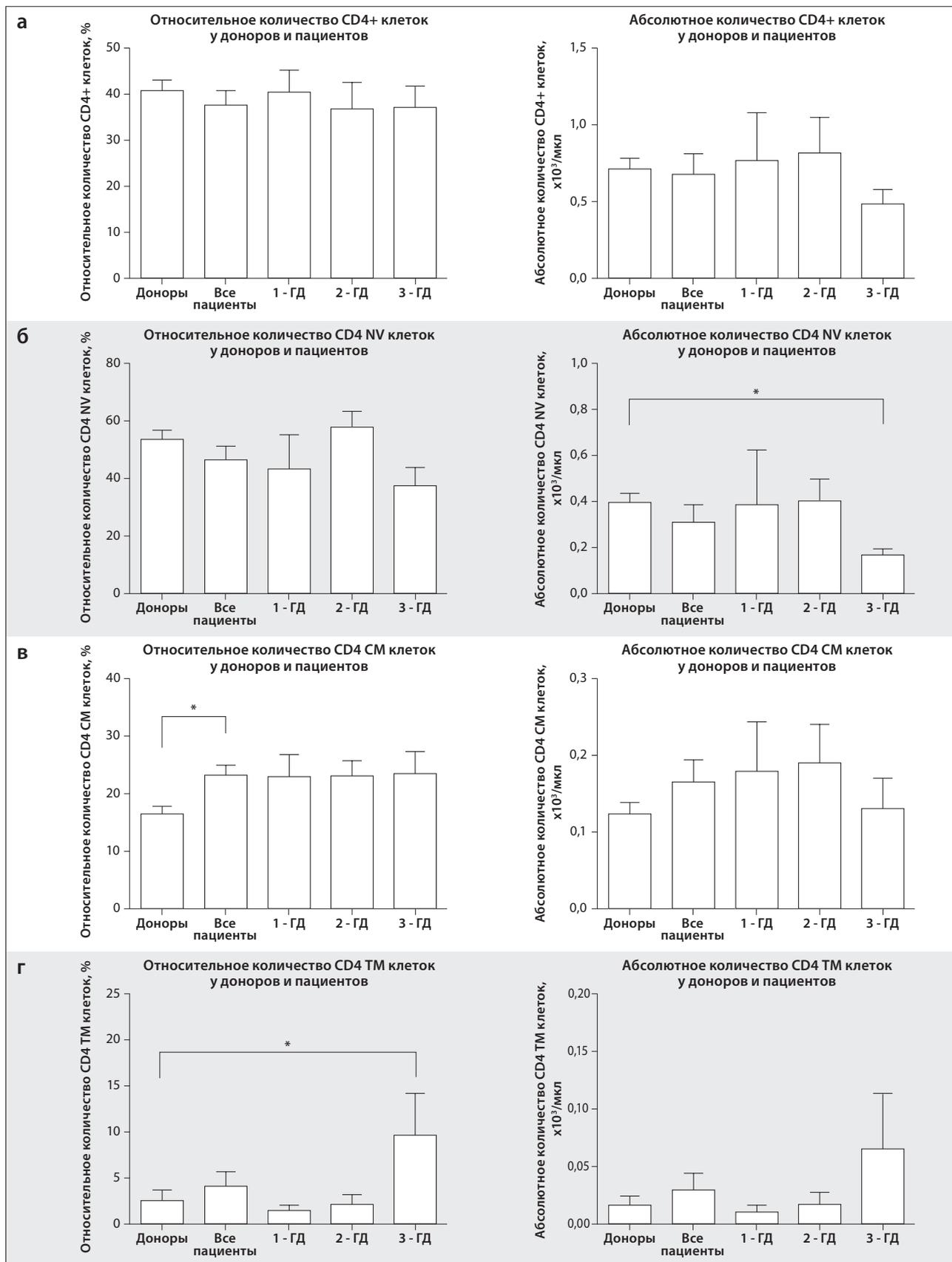


Рис. 2 (а-г). Относительное и абсолютное количество субпопуляции CD4+ Т-лимфоцитов
 * – между сравниваемыми группами $p=0,05$; ** – между сравниваемыми группами $p=0,01$

Fig. 2. Relative and absolute number of CD4+ T-lymphocytes subpopulation
 * – between comparing groups $p=0,05$; ** – between comparing groups $p=0,01$

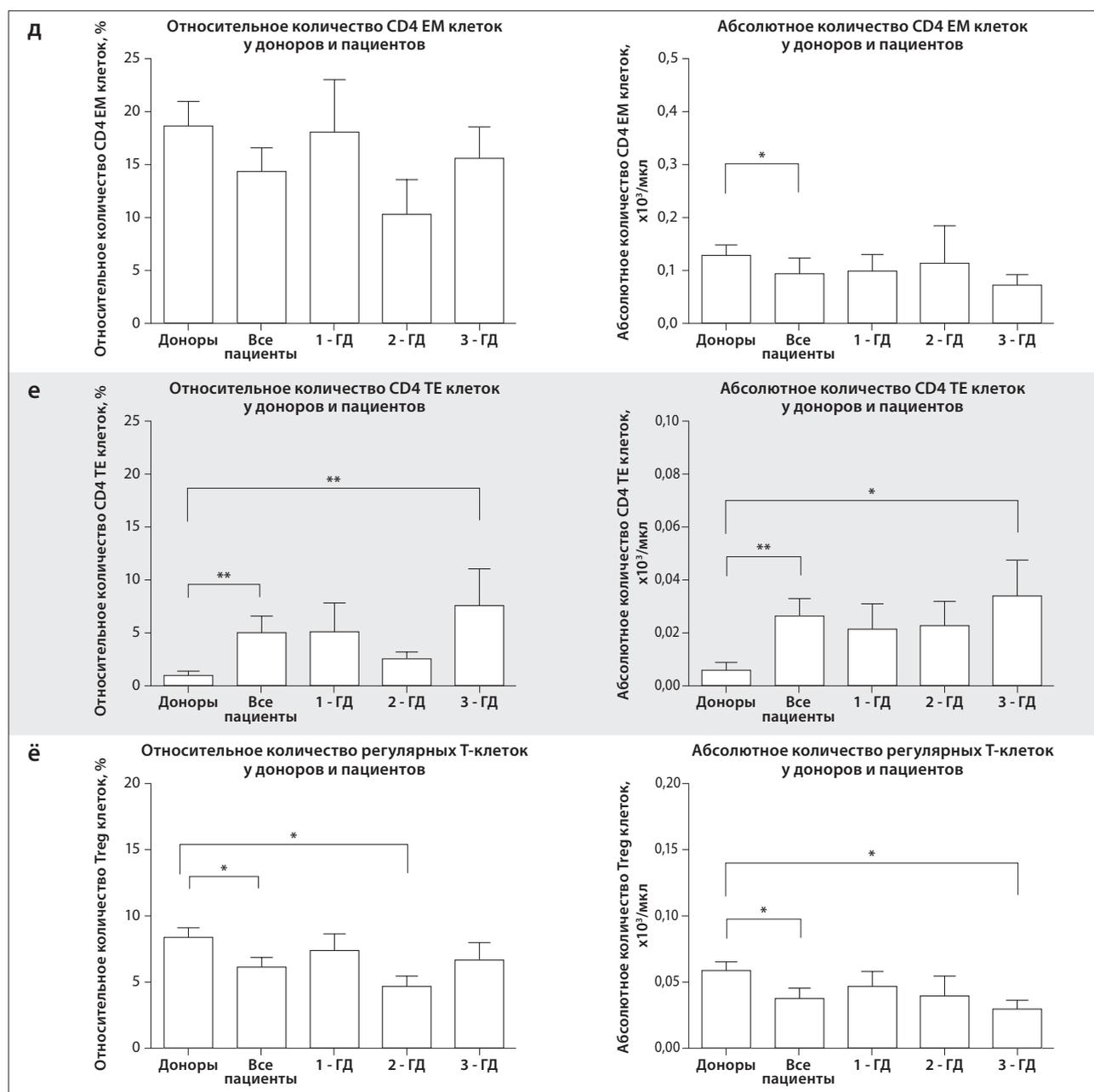


Рис. 2 (д–ё). Относительное и абсолютное количество субпопуляции CD4+ Т-лимфоцитов
* – между сравниваемыми группами $p=0,05$; ** – между сравниваемыми группами $p=0,01$

Fig. 2. Relative and absolute number of CD4+ T-lymphocytes subpopulation
* – between comparing groups $p=0,05$; ** – between comparing groups $p=0,01$

($p < 0,05$), чем в контрольной группе, но абсолютное их количество не отличалось от данных контрольной группы (Рис. 2в). Доля ТМ CD4+ клеток у пациентов 3 группы была значимо выше, чем в контрольной группе. Отличий в абсолютном количестве ТМ CD4+ обнаружено не было (Рис. 2г). Относительное количество эффекторных клеток памяти CD4+ у пациентов не отличалось от контрольной группы, при этом их абсолютное количество в 1-й группе было значимо ниже контрольной группы (Рис. 2а). Доля и абсолютное количество ТЕ CD4+ клеток у всей совокупности пациентов, а также в группе с наиболее продолжительной ЗПТ,

были значимо выше, чем в контрольной группе (Рис. 2е).

Доля и абсолютное количество Treg клеток были значимо ниже в общей и в 3-й группе пациентов по сравнению с контрольной группой (Рис. 2ё).

Количество наивных CD8+ клеток было снижено в общей группе и в 3-й группе пациентов по сравнению с контрольной группой (Рис. 3б). Доля СМ CD8+ была значимо выше в общем количестве пациентов и в 3-й группе (Рис. 3в). Не было обнаружено значимых отличий в количестве ТМ, ЕМ и ТЕ CD8+ клеток у пациентов от контрольной группы.

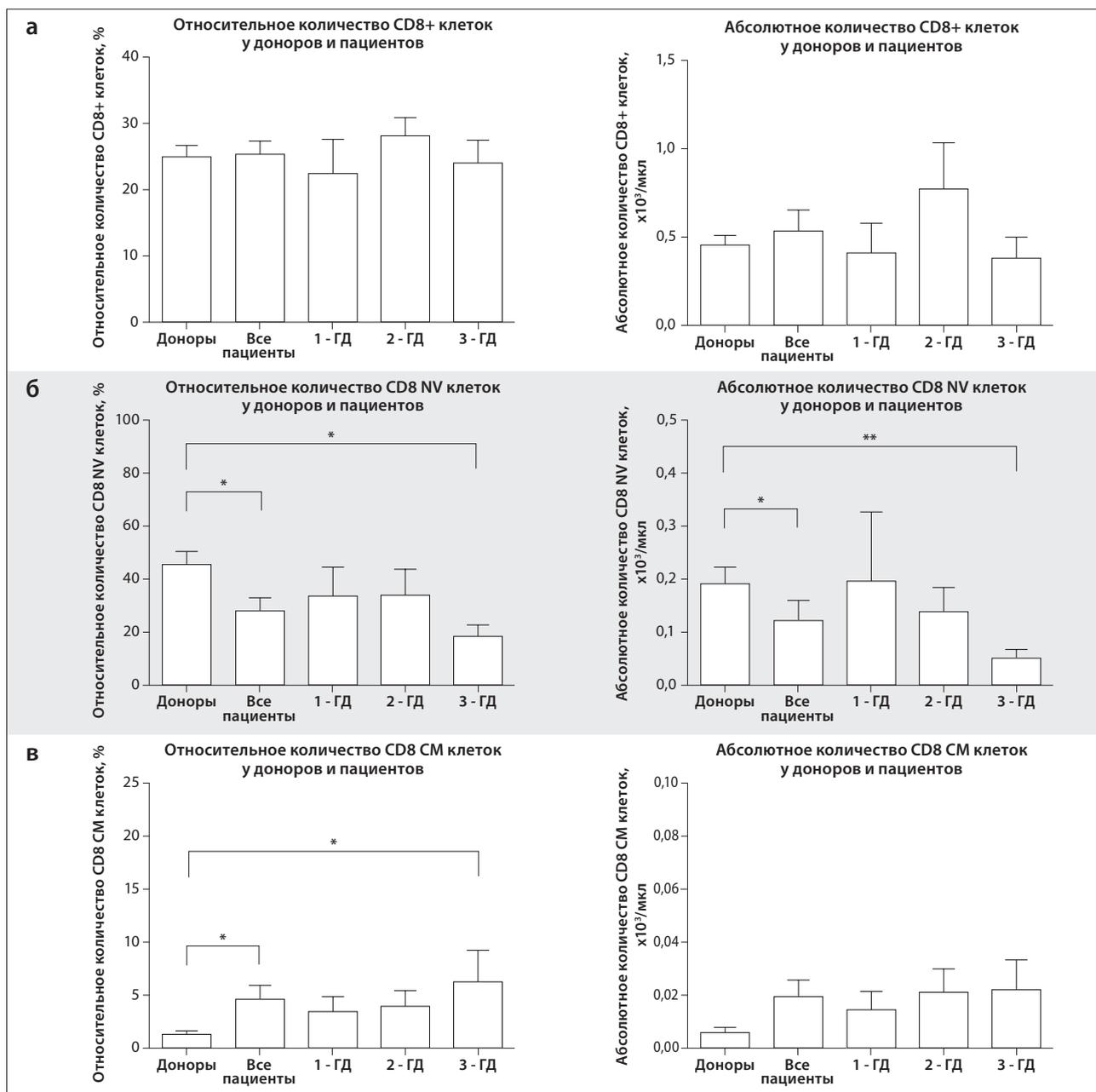


Рис. 3. Относительное и абсолютное количество субпопуляции CD8+ Т-лимфоцитов
 * – между сравниваемыми группами $p=0,05$; ** – между сравниваемыми группами $p=0,01$

Fig. 3. Relative and absolute number of CD8+ T-lymphocytes subpopulation
 * – between comparing groups $p=0,05$; ** – between comparing groups $p=0,01$

Количество НК Т-клеток во всей совокупности пациентов и в отдельных группах оставалось без изменений (Рис. 4). Количества В-клеток памяти и В1- и В2-клеток, также оставались без изменений во всех трех группах (Рис. 5).

Таким образом, количество лимфоцитов, CD3+, CD4+, CD8+, НК-клетки, В-клеток памяти и В1- и В2-клеток у пациентов с ХБП 5 соответствует показателям контрольной группы и от продолжительности ЗПТ не зависит, соотношение CD4/CD8 клеток также остается без изменений.

Однако отмечены изменения в соотношении субпопуляций клеток при продолжительной ЗПТ.

Абсолютное количество NV CD4+ и количество NV CD8+, Treg ниже в 3-й группе пациентов, а доля CM CD4+ и количество CM CD8+ во всех группах и TM CD4+, TE CD4+ в 3-й группе пациентов превышала показатели контрольной группы.

Обсуждение

Прогрессивное снижение почечной функции при ХБП связано с изменением клеточного иммунитета, которое известно, как уремический иммунный дефицит. Ключевой функцией иммунной системы является обнаружение, разрушение

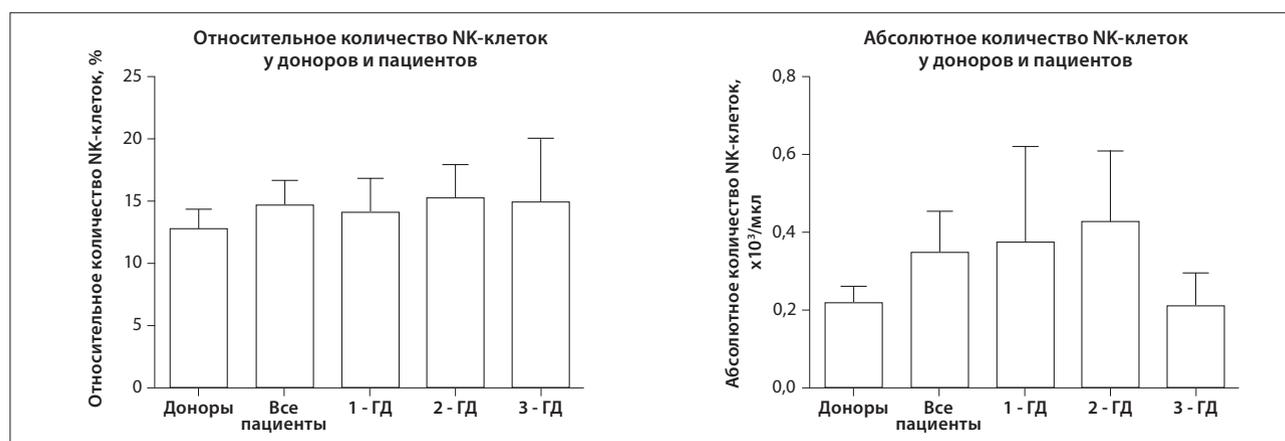


Рис. 4. Относительное и абсолютное количество NK T-клетки

Fig. 4. Relative and absolute number of NK T-cells

вторгшегося микроба, опухолевых клеток и участие в восстановлении ткани, поврежденной инфекционным, токсическим, ишемическими и аутоиммунными процессами. Иммунная защита осуществляется врожденной и адаптивной иммунной системой. Врожденная иммунная система включает циркулирующие моноциты и их тканевые аналоги, макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, естественные киллеры, тучные клетки, эозинофилы, базофилы. Адаптивные иммунные клетки включают Т- и В-лимфоциты.

В уремической среде наблюдается изменение как количественного состава субпопуляций Т-клеток, так и их функциональных способностей. В наше исследование были включены диализ-зависимые пациенты с ХБП 5 без признаков инфекции. Изменения в количественном содержании лимфоцитов, CD3+, CD4+, CD8+, NK-клеток, В-клеток памяти и В1- и В2-клеток, иммунорегуляторном индексе при продолжительной ЗПТ не было выявлено. Непродолжительная (до 3-х лет) ЗПТ не привела к значимым изменениям иммунной системы. Но после продолжительной ЗПТ (3 и более лет) обнаружено снижение абсолютного количества наивных CD4+ и CD8+ клеток и повышение доли центральных CD4+ и CD8+ клеток памяти, ТМ CD4+ и абсолютного количества ЕМ CD4+ по сравнению с показателями контрольной группы. Наивные и центральные Т-клетки памяти играют решающую роль в организации иммунного ответа на воздействие de novo и повторное воздействие патогенов. Уменьшение количества наивных клеток при продолжительной ЗПТ может быть обусловлено как истощением компенсаторных механизмов, направленных на поддержание постоянного количества клеток, так и увеличением апоптоза клеток [12]. Известна отрицательная корреляция между тяжестью азотемии, оксидативным стрессом, гиперфосфатемией, перегрузкой железом, воспалением и количеством наивных Т-клеток [11].

Наивные Т-клетки, встречая антиген, активируются и дифференцируются до стадии Т-клеток памяти, а затем и до эффекторных Т-клеток. Повышение доли СМ CD4+ и ТМ CD4+ на 3 год ГД параллельно со снижением в этот же период наивных клеток, возможно, поддерживает общее количество CD4+ клеток. Эффекторные Т-клетки выполняют свою функцию через секрецию цитокинов и разрушение клеток-мишеней. После завершения специфической иммунной реакции популяция эффекторных Т-клеток сокращается, следовательно, снижение абсолютного количества эффекторных CD4+ клеток памяти в нашей работе, вероятно, обусловлено указанным механизмом, что требует дальнейшего исследования. Механизм повышения количества терминальных эффекторных CD4+ клеток, наблюдавшегося у пациентов с продолжительной ЗПТ (3 и более лет), остается неясным.

Регуляторные Т-клетки (клетки Treg) играют центральную роль в поддержании иммунологической толерантности, ограничивают воспалительный ответ на чужеродный антиген и подавляют Т-клеточную активацию после завершения иммунной реакции, а также угнетают аутореактивные Т-клетки, которые избегают негативной селекции в тимусе. Активированные Treg подавляют пролиферацию и эффекторные функции В-лимфоцитов, моноцитов, и других Т-клеток.

При терминальной стадии ХБП снижается не только количество регуляторных клеток, но и их способность ингибировать пролиферацию CD4+ клеток, что приводит к снижению их противовоспалительной способности [13, 14]. Нами определено, что количество Treg в первые годы ЗПТ соответствует контрольной группе и только со второго года проведения гемодиализа начинается снижение их количества, при этом общее количество хелперов и супрессоров, а также популяция В-клеток оставались без особой динамики и соответствовали контрольной группе.

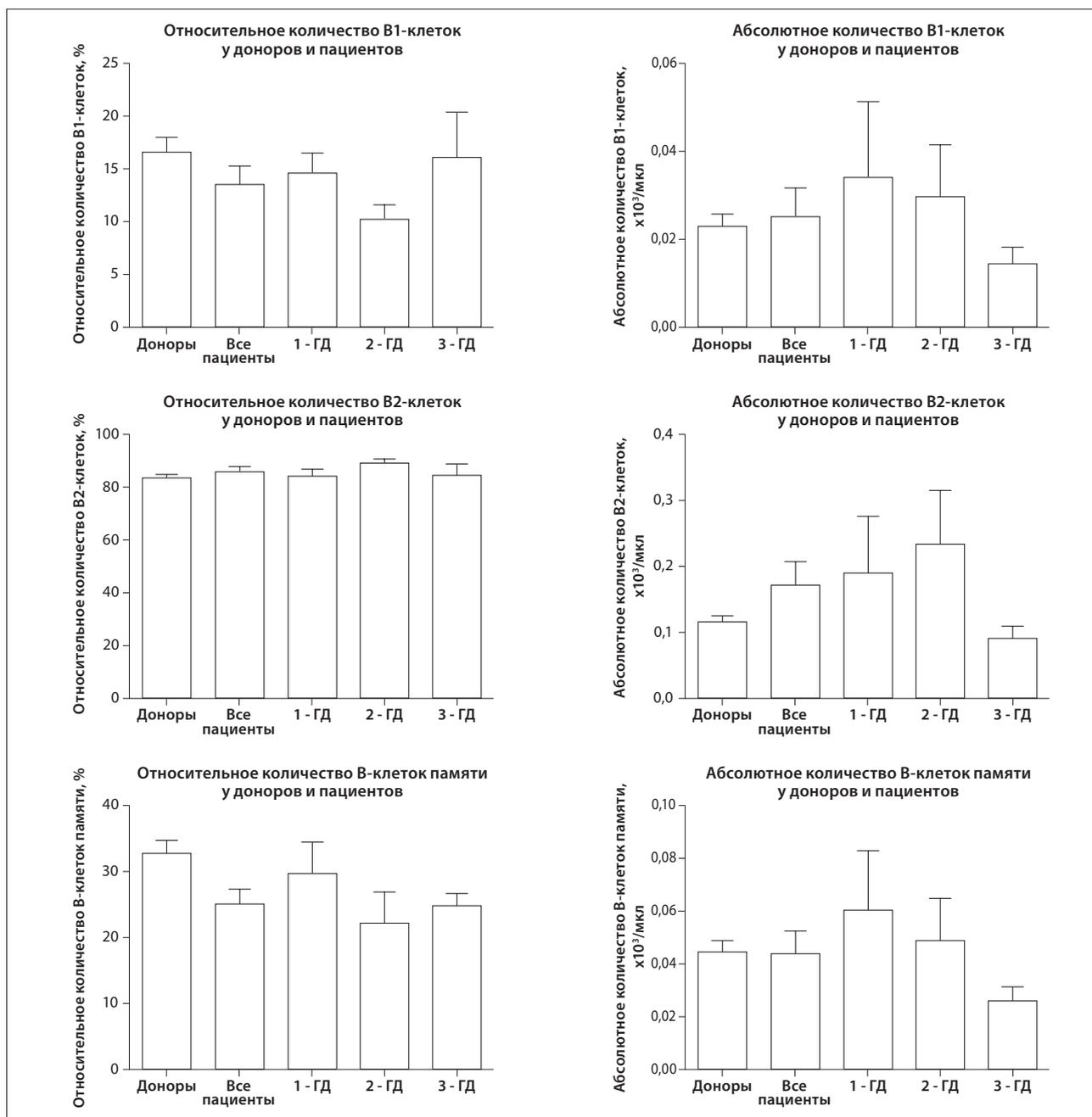


Рис. 5. Относительное и абсолютное количество субпопуляции В-лимфоцитов

Fig. 5. Relative and absolute number of B-lymphocyte subpopulation

Заключение

У диализ-зависимых пациентов с ХБП 5 без инфекционных осложнений не наблюдается количественных изменений CD3+, CD4+, CD8+, NK T-клеток, популяции В-клеток, а также изменений соотношения CD4/CD8. При продолжительном гемодиализе (3 и более лет) снижается абсолютное количество NV CD4+ и количество NV CD8+ клеток, а также уменьшается доля EM CD4+ и количество Т-регуляторных клеток, в то время как доля SM CD4+ и CD8+, и количество TE CD4+ клеток повышаются.

Авторы не имеют конфликта интересов

The authors declare no conflict of interests

Список литературы

- Girndt M, Sester M, Sester U, Kaul H, Kohler H. Molecular aspects of T- and B-cell function in uremia. *Kidney Int Suppl.* 2001;78:206-211. Review. Doi:10.1046/j.1523-1755.2001.59780206.
- Alexienvicz JM, Smogorzewski M, Fadda GZ, Massry SG. Impaired phagocytosis in dialysis patients: studies on mechanisms. *Am J Nephrol.* 1991;11(2):102-111 Doi:10.1159/000168284

3. *Massry S, Smogorzewski M.* Dysfunction of polymorphonuclear leukocytes in uremia: role of parathyroid hormone. *Kidney Int.* 2001;78:195-196. Doi:10.1046/j.1523-1755.2001.59780195.x
4. *Степанова Е.Н., Синушкин В.Н., Сивков А.В., Арзуманов С.В., Коробова Т.А.* Показатели иммунитета у больных с терминальной стадией почечной недостаточности и уремический токсин пара-крезол (обзор литературы и собственные исследования). Экспериментальная клиническая урология. 2016; 1:112-119.
Stepanova E. N., Sinyukhin V. N., Sivkov A. V., Arzumano S. V., Korobova T. A. Immunity Indices in patients with end-stage renal failure and uremic toxin para-cresol (literature review and own research). *Experimental and clinical urology.* 2016; 1: 112-119
5. *Agrawal S, Gollapudi P, Elahimebr R, Pabl MV, Vaziri ND.* Effects of end-stage renal disease and haemodialysis on dendritic cell subsets and basal and LPS-stimulated cytokine production. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(3):737-46. doi: 10.1093/ndt/gfp580.
6. *Beaman M, Michael J, MacLennan IC, Adu D.* T-cell-independent and T-cell-dependent antibody responses in patients with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant.* 1989;4:216-221.
7. *Pabl MV, Gollapudi S, Sepassi L, Gollapudi P, Elahimebr R, Vaziri ND.* Effect of end-stage renal disease on B-lymphocyte subpopulations, IL-7, BAFF and BAFF receptor expression. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(1):205-12. doi: 10.1093/ndt/gfp397.
8. *Meier P, Dayer E, Blanc E, Wauters JP.* Early T cell activation correlates with expression of apoptosis markers in patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(1):204-212.
9. *Matsumoto Y, Shinzato T, Amano I, et al.* Relationship between susceptibility to apoptosis and Fas expression in peripheral blood T cells from uremic patients: a possible mechanism for lymphopenia in chronic renal failure. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;215(1):98-105. Doi:10.1006/bbrc.1995.2438
10. *Moser B, Roth G, Brunner M, et al.* Aberrant T cell activation and heightened apoptotic turnover in end-stage renal failure patients: a comparative evaluation between non-dialysis, haemodialysis, and peritoneal dialysis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308(3):581-585.
11. *Yoon J, Gollapudi S, Pabl M, Vaziri N.* Naïve and Central Memory T-cell lymphopenia in end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2006;70(2):371-376 Doi:10.1038/sj.ki.5001550
12. *Nosratola D, Vaziri, Madeleine V Pabl, Albert Crum, and Keith Norris.* Effect of uremia on structure and function of immune system. *J Ren Nutr.* 2012; 22(1): 149-156. doi: 10.1053/j.jrn.2011.10.020
13. *Hendriks TK, van Gurp EA, Mol WM, Schoordijk W, Sengobind VD, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC.* End-stage renal failure and regulatory activities of CD4+CD25bright+FoxP3+ T-cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(6):1969-1978. doi: 10.1093/ndt/gfp005
14. *Mansouri L, Nopp A, Jacobson SH, Hylander B, Lundahl J.* Hemodialysis Patients Display a Declined Proportion of Th2 and Regulatory T Cells in Parallel with a High Interferon- γ Profile. *Nephron.* 2017;136(3):254-260. doi: 10.1159/000471814.

Дата получения статьи: 03.10.2018

Дата принятия к печати: 17.11.2018

Submitted: 03.10.2018

Accepted: 17.11.2018