



## Ukrainian Journal of Nephrology and Dialysis

Scientific and Practical, Medical Journal

### Founders:

- State Institution «Institute of Nephrology NAMS of Ukraine»
- National Kidney Foundation of Ukraine

ISSN 2304-0238;

eISSN 2616-7352

Journal homepage: <https://ukrjnd.com.ua>

### Original Papers

O. Vroniak, R. Zograban

doi: 10.31450/ukrjnd.3(75).2022.05

### The first experience of cord blood stem cells application in kidney transplantation: A descriptive study

SI «Shalimov's National Institute of Surgery and Transplantation NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

#### Citation:

Vroniak O, Zograban R. The first experience of cord blood stem cells application in kidney transplantation: A descriptive study. Ukr J Nephrol Dial. 2022;3(75):34-42. doi: 10.31450/ukrjnd.3(75).2022.05.

**Abstract.** *Kidney transplantation is recognized as the optimal method of end-stage kidney disease treatment, but chronic renal allograft rejection remains an unresolved issue and leads to transplanted organ function loss. Recent studies show positive effects of stem cell injections in a variety of diseases, including kidney transplantation.*

*The present study aimed to analyze the first experience of umbilical cord blood stem cells application in living-related kidney transplantation in Shalimov's National Institute of Surgery and Transplantation, give a preliminary assessment of their effectiveness and safety, evaluate the clinical course and especially the dynamics of laboratory parameters in the recipient's postoperative period.*

*Methods.* The study group included 6 male, adult recipients of kidney transplants, who performed the first kidney allotransplantation from a living family donor in the Shalimov's National Institute of Surgery and Transplantation in 2020 – 2021. Before surgery, all patients received intravenous administration of a fraction of nuclear cells from human umbilical cord blood at a dose of 2-3 x 10<sup>6</sup>/kg body weight in combination with standard three-component immunosuppressive therapy. Immune system studies were performed before kidney transplantation, on the first and third days of the postoperative period, at the end of the first and second week, as well as on the first, third, sixth, and twelfth months, following kidney transplantation. Renal graft function was assessed by serum creatinine and glomerular filtration rate. Monitoring of clinical and laboratory parameters of blood and urine, the concentration of calcineurin inhibitors (C0) was carried out regularly three times a week for the first month, twice a month for 2-3 months, and once a month until the end of the year.

*Puncture biopsy of the transplanted kidney was performed three months after surgery to diagnose the pathology of the graft, namely the manifestations of acute and chronic rejection, the nature and degree of which were determined according to the Banff classification.*

*The state of the immune system of the recipients was characterized by indicators of cellular and humoral immunity.*

*Statistical processing of research results was performed using the statistical package StatSoft (2010) STATISTICA 9.1 for Windows StatSoft Inc, Tulsa.*

*Results.* All patients received cord blood stem cells without complications. On the first day after surgery, an average diuresis was 9415 ± 928.1 ml. Normalization of graft function was observed on the second or third day (GFR more than 90 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>). There were no rejections of grafts and signs of opportunistic infections in the patients during 1 year follow-up period. Morphological studies did not reveal signs of significant pathological changes in transplanted kidneys in patients who received stem cells as induction therapy.

*The study of the state of the immune system of recipients in the dynamics, given the insufficient number of patients, requires further research.*

*Conclusions.* The administration of cord blood stem cells to recipients prior to kidney transplantation is safe and promotes rapid recovery of renal allograft function. There were no signs of morphological proven chronic graft rejection, which allows us to predict its long-term functioning in the future. To assess the response of the recipient's immune system to the application of cord blood stem cells requires the accumulation of additional data.

**Keywords:** kidney transplantation, induction immunosuppressive therapy, umbilical cord blood stem cells, chronic renal failure.

**Conflict of interest statement.** The authors declare no competing interest.

© O. Vroniak, R. Zograban, 2022.

Correspondence should be addressed to Oleksii Vroniak [dr.vroniak@gmail.com](mailto:dr.vroniak@gmail.com)

#### Article history:

Received May 11, 2022

Received in revised form  
June 03, 2022

Accepted June 05, 2022



© Вороняк О. С., Зограб'ян Р. О., 2022

УДК: 616.61-089.843:576.3/.7

О.С. Вороняк, Р.О. Зограб'ян

## Перший досвід використання стовбурових клітин у реципієнтів ниркового алотрансплантата: описове дослідження

ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології імені О.О.Шалімова НАМН України», Київ, Україна

**Резюме.** Трансплантація нирки визнана оптимальним методом лікування термінальної ниркової недостатності, проте хронічна реакція відторгнення ниркового трансплантата залишається невирішеною проблемою і призводить до втрати функції пересаженого органу. Дослідження останніх років виявили позитивні ефекти від введення стовбурових клітин при різних захворюваннях, в тому числі при трансплантації нирки

Метою роботи було проаналізувати перший досвід, дати попередню оцінку ефективності та безпечності використання стовбурових клітин пуповинної крові при трансплантації нирки, оцінити клінічний перебіг післятрансплантаційного періоду, особливості динаміки лабораторних показників в післяопераційному періоді у реципієнтів ниркового трансплантата, що отримували стовбурові клітини в якості індукційної імуносупресивної терапії.

**Методи.** До групи дослідження було включено 6 повнолітніх реципієнтів ниркового трансплантата, чоловічої статі, яким у 2020 – 2021 рр. в Національному інституті хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова НАМН України була виконана перша алотрансплантація нирки від живого родинного донора. Основним діагнозом була термінальна ниркова недостатність внаслідок прогресування хронічного гломерулонефриту, пролонгована програмним гемодіалізом. Всі пацієнти перед операцією отримували внутрішньовенне введення фракції ядромісних клітин з пуповинної крові людини в дозі 2-3 x 10<sup>6</sup>/кг маси тіла, разом з стандартною трикомпонентною імуносупресивною терапією.

Дослідження стану імунної системи проводили перед трансплантацією нирки, на перший та третій день, наприкінці першого та другого тижня, через один, три, шість місяців та 1 рік після ТН. Функцію ниркового трансплантата оцінювали за рівнем креатиніну сироватки крові та швидкістю клубочкової фільтрації. Моніторинг клініко-лабораторних показників крові та сечі, концентрації інгібіторів кальциневрину (C<sub>d</sub>) здійснювався на постійній основі тричі на тиждень протягом першого місяця, двічі на місяць протягом 2-3 місяців та 1 раз на місяць до кінця року.

Пункційна біопсія трансплантованої нирки проводилась через три місяці після операції з метою діагностики патології ниркового трансплантата, а саме проявів гострого та хронічного відторгнення, характер та ступінь якого визначали згідно Banff-класифікації.

Стан імунної системи реципієнтів характеризувався рівнями показників клітинного та гуморального імунітету.

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою статистичного пакету StatSoft (2010) STATISTICA 9.1 for Windows StatSoft Inc, Tulsa.

**Результати.** Всі пацієнти перенесли введення стовбурових клітин кордової крові без ускладнень. Діурез на першу добу після операції складав 9415±928, 1мл. Нормалізація показників функції ниркового алотрансплантата відмічалася вже на другу-третю добу (ШКФ більше 90мл/хв/1,73 м<sup>2</sup>). Реакцій відторгнення, розвитку опортуністичних інфекцій у даній категорії пацієнтів у віддаленому періоді в термін спостереження до 1-го року – не спостерігалось. Морфологічні дослідження не виявили ознак суттєвих патологічних змін в трансплантованих нирках у пацієнтів які отримували в якості індукційної терапії стовбурові клітини.

**Висновки.** Введення стовбурових клітин кордової крові реципієнтам перед трансплантацією нирки є безпечним та сприяє швидкому відновленню функції ниркового алотрансплантата. В жодному випадку морфологічне дослідження біоптата нирки не виявило ознак хронічного відторгнення трансплантата, що дозволяє прогнозувати його тривале функціонування в подальшому. Для оцінки реакції імунної системи реципієнтів на введення стовбурових клітин кордової крові потрібне накопичення додаткових даних.

**Ключові слова:** трансплантація нирки, індукційна імуносупресивна терапія, стовбурові клітини пуповинної крові, хронічна ниркова недостатність.

**Олексій Сергійович Вороняк**  
dr.voroniak@gmail.com

**Вступ.** Трансплантація нирки продовжує залишатися найкращим методом лікування термінальної ниркової недостатності. Ще 89 років тому, першу в світі трансплантацію нирки (ТН) людині зробив український хірург Юрій Вороний, проте пересажений орган був відторгнутий. Подальші спроби були дещо кращі, проте пацієнти жили не довго, оскільки в той час не була доступна імуносупресивна терапія.

супресивна терапія (ІСТ) [1]. Тільки після появи перших імуносупресивних препаратів результати ТН покращилися.

Розрізняють імуносупресивну терапію індукційну (ввідну) та підтримуючу. На сьогоднішній день препаратами вибору індукційної терапії (ІТ) при ТН стали антагоніст рецепторів інтерлейкіна-2 (ІЛ-2РА) і антиtimoцитарний глобулін (АТГ) [2].

В проведеному А.С. Webster дослідженні, відносний однорічний ризик гострого відторгнення після індукції із застосуванням ІЛ-2РА в порівнянні з відсутньою ІТ був 0,67 (95%, ДІ: 0,59–0,76) [3].

У пацієнтів зі стандартним імунологічним ризиком показники гострого відторгнення, виживання реципієнтів і ниркових трансплантатів (НТ) приблизно однакові при застосуванні ІЛ-2РА і АТГ, проте менше побічних ефектів відмічалось у групі пацієнтів з ІЛ-2РА. Однак у пацієнтів з високим імунологічним ризиком ІТ з АТГ була більш ефективною в плані попередження гострого відторгнення, проте призводила до більшого числа інфекційних ускладнень в післяопераційному періоді [4].

Крім ІТ існує підтримуюча ІСТ, яка проводиться практично всім реципієнтам ТН, щоб запобігти гострому та хронічному відторгненню НТ. Основними препаратами підтримуючої ІСТ є інгібітори кальциневрину (циклоспорин чи такролімус), мікофенолати (мікофеналату мофетил чи мікофеналат натрію) та глюкокортикостероїди [5]. З розвитком трансплантації відбувається і вдосконалення схем ІСТ, розробка нових імуносупресивних препаратів, які подовжують функціонування пересаженого органу.

На сьогоднішній день однорічне виживання НТ сягає 95-98%, але надалі спостерігається його поступове зниження та протягом 10 років втрачається біля 50% НТ [6], що найчастіше обумовлено розвитком хронічного відторгнення (в 40-80 % випадків за даними різних авторів) [7] та побічними ефектами імуносупресивних препаратів, такими як нефротоксичність, серцево-судинні, ендокринні порушення, онкологічні захворювання та опортуністичні інфекції, що призводять до смерті реципієнта з функціонуючим трансплантатом.

М. Coemans, порівнюючи результати 108787 ТН, виконаних з 1986 по 2015 роки [6] показав, що довгострокові результати таких операцій залишаються практично без покращення за останні 30 років. Це є підставою для пошуку нових методів запобігання розвитку реакції відторгнення НТ, уповільнення прогресування його дисфункції, можливості зменшення доз імуносупресивних препаратів та частоти пов'язаних з ними ускладнень [8]. Існує значна потреба в нових підходах до ІСТ, яка б поєднувала більшу ефективність та меншу кількість побічних ефектів.

В зв'язку з розвитком клітинної терапії та позитивними ефектами від введення стовбурових клі-

тин (СК) при різних захворюваннях, проводилися дослідження з ефективності їх застосування при ТН. Літературний аналіз використання СК на тваринних моделях з нирковою недостатністю, пролонгованою алотрансплантацією нирки (АТН) [9], а згодом і проведені клінічні дослідження показали кращі результати в післяопераційному періоді у цих пацієнтів. Це стало підґрунтям створенню альтернативної індукційної терапії при ТН.

Біологічні ефекти стовбурових клітин (СК), включаючи їх багатолінійну диференціацію, потенціал самонаведення, паракринний ефект та імуносупресивну дію, що призводять до пригнічення проліферації Т-клітин, дозрівання дендритних клітин та індукцію Т-регуляторних клітин відкрили нові горизонти для покращення як ранніх, так і віддалених результатів АТН та дозволяють припустити доцільність їх введення перед операцією в якості індукційної імуносупресії. Випробування такої методики почато у відділенні трансплантації нирки НІХТ ім. О.О. Шалімова в 2020 році.

**Мета роботи:** проаналізувати перший досвід, дати попередню оцінку ефективності та безпечності використання СК при ТН. Для досягнення цієї мети поставлені наступні завдання: оцінити особливості клінічного перебігу післятрансплантаційного періоду, оцінити особливості динаміки лабораторних показників в післяопераційному періоді у реципієнтів НТ, що отримували СК в якості індукційної ІСТ, оцінити вплив СК на показники функції трансплантованої нирки та імунного стану реципієнта.

**Матеріали та методи.** До описового дослідження було включено 6 реципієнтів НАТ, яким у 2020 – 2021 рр. була виконана перша алотрансплантація нирки від живого родинного донора в Національному інституті хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова НАМН України. Показанням до алотрансплантації нирки у всіх реципієнтів була термінальна стадія хронічної ниркової недостатності (ХНН) різного генезу. Всі пацієнти за 3-4 години до операції та після премедикації дексаметазоном в дозі 8мг отримували внутрішньовенне введення фракції ядровмісних клітин з пуповинної крові людини (ФЯКПКЛ) в дозі 2-3 x 10<sup>6</sup>/кг маси тіла, разом з стандартною трикомпонентною ІСТ, що включала інгібітори кальциневрину (СНІ), такі як циклоспорин (CsA) (в дозі 8-10 мг/кг маси тіла для досягнення цільової концентрації 200-250 нг/мл) або такролімус (FK506) (в дозі 0,1-0,2 мг/кг маси тіла для досягнення цільової концентрації 10-12 нг/мл), а також мофетилу мікофенолат в дозі 1000 мг двічі на день чи мікофенолат натрію в дозі 1440 мг/добу. Їх прийом починали за 7 днів до планової операції. А також метилпреднізолон загальною кількістю 1,5 г протягом перших 3-х днів з переходом на пероральний прийом у початковій дозі 64 мг з поступовим зменшенням до підтримуючої дози 4 мг на добу.

В якості індукції імуносупресії 2 пацієнтам перед операцією та на 4-у добу після проводили внутрішньовенну інфузію базиліксимабу (I група), а інші 4 пацієнти отримували антитімоцитарний глобулін (АТГ) в курсовій дозі 3 мг/кг протягом 3 днів (II група) (табл. 1).

Таблиця 1

### Характеристика реципієнтів ниркового трансплантата

Параметри	Реципієнти (n=6)
вік, роки, $M \pm m$	24,67 $\pm$ 1,82
стать: чоловіки, n (%) жінки, n (%)	100 (100%) 0 (0%)
ІМТ (індекс маси тіла)	20,8 $\pm$ 0,44
Індукційна ІСТ: Базиліксимаб (I група) АТГ (II група)	2 (33,33%) 4 (66,66%)
Введення ФЯКПКЛ	6 (100%)
імуносупресія:	
Cyclosporin, n (%)	1 (%)
Tacrolimus, n (%)	5 (%)
Mycophenolate, n (%)	6 (100%)
Methylprednisolone	6 (100%)
Cross-match негативний	6 (100%)
CMV статус реципієнта позитивний негативний	4 (66,66%) 2 (33,33%)

Дослідження стану імунної системи проводили перед трансплантацією нирки, на перший та третій день, наприкінці першого та другого тижня, через один, три, шість місяців та 1 рік після ТН. Функцію ниркового трансплантата оцінювали за рівнем креатиніну сироватки крові та швидкістю клубочкової фільтрації. Моніторинг клініко-лабораторних показників крові та сечі, концентрації інгібіторів кальциневрину ( $C_0$ ) здійснювався на постійній основі тричі на тиждень протягом першого місяця, двічі на місяць протягом 2-3 місяців та 1 раз на місяць до кінця року.

Пункційна біопсія ТН проводилась за протоколом через три місяці після операції з метою діагностики патології НТ, а саме проявів гострого та хронічного відторгнення. Характер та ступінь морфологічних змін визначали згідно Vanff-класифікації [10].

Стан імунної системи реципієнтів характеризувався рівнями показників клітинного та гуморального імунітету. Клітинний імунітет оцінювали за відносним та абсолютним рівнем субпопуляцій лімфоцитів в периферичній крові (ПК), за допомогою моноклональних антитіл мічених FITC, PE, ECD (Beckman Coulter, USA) та PC5 у наступних

комбінаціях із наступними антигенами: CD45-FITC/CD4-PE/CD8-ECD/CD3-PC5 (Т-хелпери, Т-цитотоксичні); CD4-FITC/127-PE/45-ECD/25-PC5 (Т-регуляторні), CD3-FITC/DR-PE/45-ECD (Т-активовані), CD3-FITC/CD16/CD56-PE/45-ECD (Т-NK та NK-лімфоцити), CD38-FITC/CD45-ECD/CD19-PC5 (активовані В-клітини). Гейтування проводилось по CD45<sup>bright</sup> та визначення рівня субпопуляцій здійснювалось за допомогою проточного цитофлуориметра FC-500 Cytomics (Beckman Coulter, USA) з урахуванням розрахункового імунорегуляторного індексу (Ireg) – CD4+/CD8+. Гуморальний імунітет оцінювався за рівнями загальних імуноглобулінів (Ig) класів А, М, G в сироватці крові методом турбідиметрії на апараті HORIBA ABX Pentra 400 (France).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою статистичного пакету StatSoft (2010) STATISTICA 9.1 for Windows StatSoft Inc, Tulsa. Проводився описовий аналіз кожної вибірки з розрахунком середнього значення (M) та стандартного відхилення (SD). Порівняння двох незалежних сукупностей проводилось за непараметричним тестом – U-тест Манна-Уїтні (U-test Mann-Whitney). Розбіжності між сукупностями вважались статистично значимими при значеннях коефіцієнта достовірності  $p < 0,05$ . Характер зв'язку між змінними показниками оцінювався за рівнем коефіцієнта кореляції Pearson (r) при значеннях коефіцієнта достовірності  $p < 0,05$ .

**Опис клітинного препарату.** Пуповинну кров збирали із пупочного канатика новонародженого за стандартною методикою під час пологів на 39 – 41 тижні у 23–36-річних жінок з їх інформованої згоди. Проводили обстеження жінок на наявність поверхневого (HBsAg) та корового (coreHBV) антигенів вірусу гепатиту В, РНК вірусу імунодефіциту людини 1/2 (HIV 1/2), РНК вірусу гепатиту С (HCV), сумарних антитіл проти *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii* та цитомегаловірусу (CMV). Тестували саму пуповинну кров на антигени поверхневого (HBsAg) та ядерного (HBcoreAg) антигену вірусу гепатиту В, РНК вірусу імунодефіциту людини 1/2 (HIV 1/2), ДНК цитомегаловірусу, РНК вірусу гепатиту С (HCV) та антитіла до вірусу імунодефіциту людини (HIV 1/2), вірусу гепатиту С (HCV), *Treponema pallidum*. Проводили аналіз пуповинної крові на наявність аеробних, анаеробних бактерій, а також грибкової інфекції. До пакету, що містив пуповинну кров із цитратним буфером додавали розчин 6 % гідроксиетилкрохмалю та седиментували при кімнатній температурі до чіткого розділення фракції еритроцитів та ядромісних клітин. Проводили фракціонування на екстракторі плазми XP 100 (Jouan, Франція) та центрифугували при 400g протягом 20 хв. Осад клітин ресуспендували в вихідному розчині. До суспензії ядромісних клітин пуповинної крові додавали розчин кріопротектора (10% ДМСО приготований на 10%

декстрані з молекулярною масою 30000 – 40000 Да) у співвідношенні 1:1. Кріоконсервування проводили за допомогою програмного заморозувача ЗП-6.00.00.00. Процес охолодження починали з 20°C зі швидкістю 1°C/хв до температури -3,8°C. При цій температурі зразки витримували протягом 10 хв, після чого здійснювали ініціацію кристалотворення. Після завершення кристалізації кріоконтейнери охолоджували зі швидкістю 0,1°C/ хв до -35°C, потім – 5°C/хв до -50°C та -10°C/ хв до -140°C. За температури -140°C процес охолодження в заморозувачі зупиняли й перенесли матеріал у рідкий азот (-196°C) на довгострокове зберігання. Один зразок в середньому містить близько  $4 \times 10^8$  ядромісних клітин, серед яких близько  $6,4 \times 10^5$  колоніє-утворюючих одиниць. Вміст клітин, що експресують CD34 становить 0,1-1 %.

**Результати.** Нами проведено порівняльний аналіз загального стану пацієнтів, даних інструментального обстеження та лабораторних показників функції НТ, динаміки показників субпуляцій лімфоцитів та імуноглобулінів у двох групах пацієнтів, які отримували СК пуповинної крові перед трансплантацією нирки. Перша група пацієнтів отримувала базиликсимаб, а друга – АТГ в якості індукційної імуносупресії.

Введення ФЯКПКЛ проводили за 3-4 години перед ТН в дозі 2-3 x 10<sup>6</sup>/кг маси тіла реципієнта. Всі пацієнти перенесли введення препарату без побічних ефектів. Загальне самопочуття пацієнтів оцінювалося за 10-ти бальною шкалою на основі суб'єктивних відчуттів (загальна слабкість, задишка), враховували також рівень артеріального тиску, частоту пульсу, температуру тіла, набряки та інші скарги (табл. 2).

Таблиця 2

## Оцінка загального стану пацієнтів

Термін	При поступленні	Після введення СК	1 день	1 тижд	2 тижні	1 міс	3 міс	6 міс	12 міс
Показники									
Загальне самопочуття, бали (за 10 – бальною шкалою)	6,67 ± 0,21	6,67 ± 0,21	6,17±0,17	8,67±0,21	10	10	10	10	10
Діурез, мл	850±373,1	-	9415±928,1	3558±378,1	2833± 102	2441± 121	2322± 69	2376±95	2341± 54
Арт-ний тиск, (% пацієнтів)									
- Менше 90/60	16,67	0	0	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67
- 91/61-129/79	16,67	33,33	33,33	66,67	66,67	66,67	66,67	66,67	66,67
- Більше 130/80	66,67	66,67	66,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67	16,67
Пульс, уд/хв (% пацієнтів)									
- Менше 60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
- 61-90	83,33	66,67	33,33	83,33	100	100	100	100	100
- Більше 91	16,67	33,33	66,67	16,67	0	0	0	0	0
Вага (% пацієнтів)									
Зменшується	0	0	0	100	100	0	0	0	0
Стабільна	100	100	100	0	0	33,33	0	100	100
Підвищується	0	0	0	0	0	66,67	100	0	0
Температура тіла (% пацієнтів)									
- 36,6-36,9	100	100	66,67	66,67	100	100	100	100	100
- 37,0 – 37,9	0	0	33,33	33,33	0	0	0	0	0
- Більше 38	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Набряки на тілі (% пацієнтів)									
- немає	66,67	66,67	66,67	83,33	100	100	100	100	100
- пастозність до рівня гомілок	33,33	33,33	33,33	16,67	0	0	0	0	0
- набряки нижніх кінцівок,	0	0	0	0	0	0	0	0	0
- асцит, гідроторакс	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Динаміка рівнів креатиніну сироватки крові та ШКФ в ранньому післяопераційному періоді свідчила про швидке відновлення функції ниркового трансплантата (вже на другий день після операції

ми спостерігали нормалізацію обох показників). Такими ж ці показники залишались протягом 12 місяців спостереження (рис.1, 2).

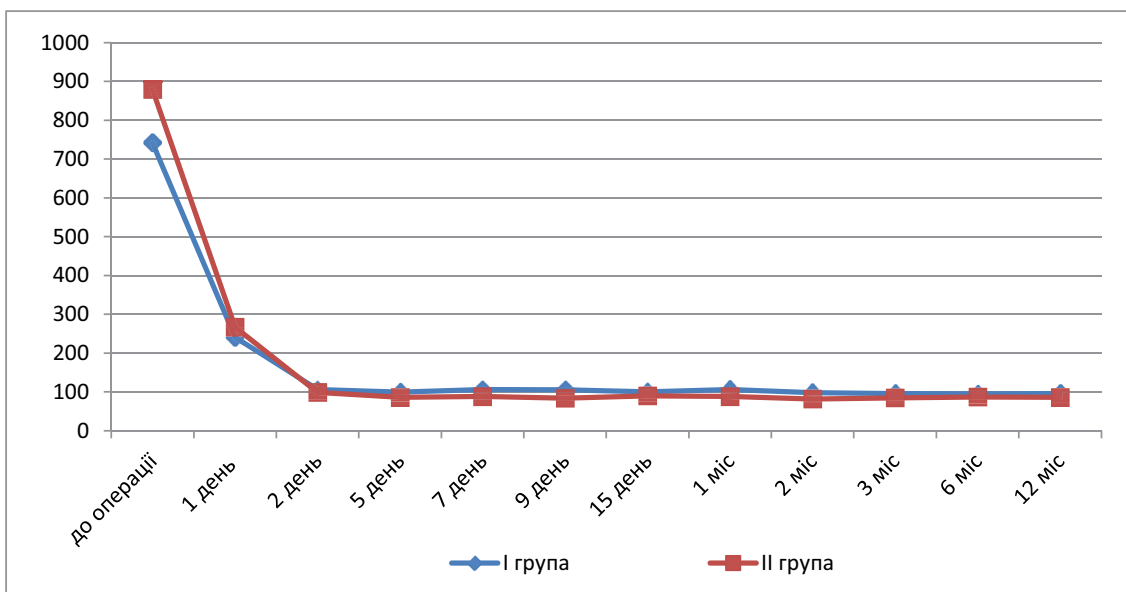


Рис. 1. Динаміка середнього рівня креатиніну (мкмоль/л) у пацієнтів, які отримували СК кордової крові при ТН та бизиліксимаб (I група) або тимоглобулін (II група).

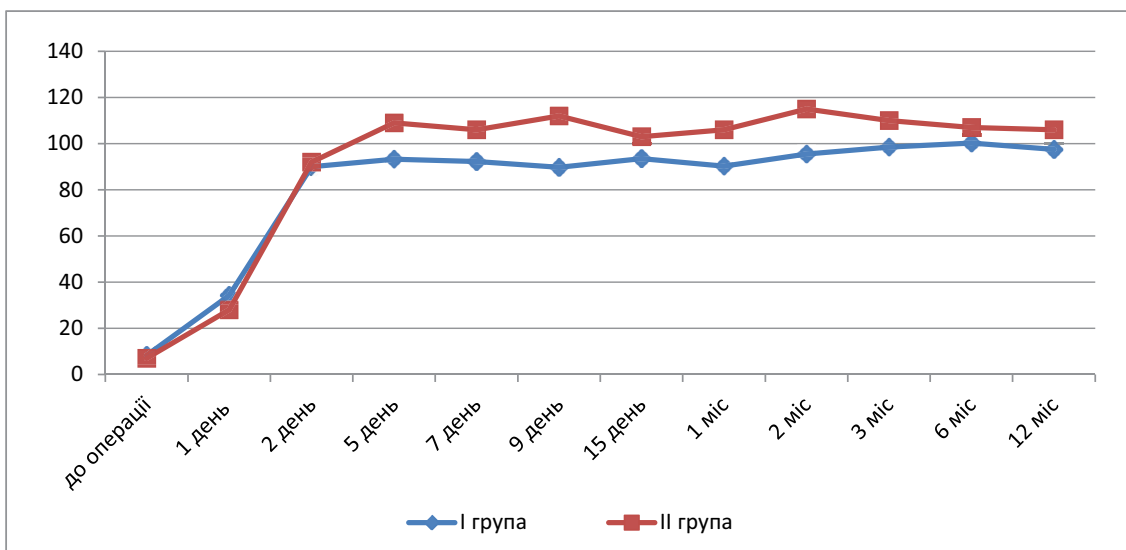


Рис. 2. Динаміка середньої ШКФ (СКД-ЕРІ) у пацієнтів які отримували СК кордової крові та бизиліксимаб (I група) або тимоглобулін (II група).

Всі пацієнти отримували для профілактики розвитку цитомегаловірусної інфекції валганцикловір 450 мг/добу, для профілактики пневмоцистної інфекції ко-тримоксазол 480мг/добу терміном до 5 місяців.

Аналіз динаміки показників імунної системи реципієнтів показав наступне. У реципієнтів I групи абсолютна кількість лімфоцитів зростала протягом перших двох тижнів з  $1,558 \pm 0,123 \times 10^9$ /л до

$2,590 \pm 0,213 \times 10^9$ /л, після чого дещо зменшувалася до  $1,800 \pm 0,143 \times 10^9$ /л. У II групі пацієнтів, на відміну від першої, відмічалось зменшення відносної кількості лімфоцитів периферичної крові (CD45+14-15-) майже на 95% з  $24 \pm 11\%$  до  $0,8 \pm 0,2\%$ , а абсолютної з  $1,575 \pm 0,546 \times 10^9$ /л до  $0,101 \pm 0,032 \times 10^9$ /л на перший день після введення СК і тимоглобуліну, з тенденцією до поступового їх відновлення через 6-12 місяців до  $0,678 \pm 0,293 \times 10^9$ /л.

Гранулоцитарно-лейкоцитарний індекс (g/l ratio) у I групі зменшувався до 7-ї доби на 15% з  $2,4 \pm 0,12$  до  $2,1 \pm 0,1$ , після чого зростав на 50% до  $3,2 \pm 0,1$ , проте вже після двох тижнів повертався до вихідного рівня  $2,2 \pm 0,18$ . Після введення тимоглобуліну (у II групі) g/l ratio збільшувався майже в 40 разів (з  $2,8$  до  $116,12,4 \pm 9,34$ ) у першу добу, з поступовим зменшенням в післяопераційному періоді до  $6,42 \pm 3,5$  через 6 місяців. Таке зростання індексу пов'язане з виснаженням пулу лімфоцитів внаслідок дії тимоглобуліну та відносним зростанням на цьому фоні кількості гранулоцитів.

Особливо цікаво в такій ситуації було б дослідити динаміку основних субпопуляцій лімфоцитів.

T-лімфоцити (CD3+19-) виконують ефекторні функції в реакціях клітинного імунітету і відіграють важливу роль у гуморальних імунних реакціях на тимусзалежні антигени, активуючи B-лімфоцити та стимулюючи їх до синтезу антитіл. У I групі пацієнтів відносна кількість T-лімфоцитів за два тижні зменшилася на 11,5% (з  $85,5 \pm 6,54\%$  до  $75,6 \pm 5,44\%$ ), після чого поверталася до вихідного рівня в кінці першого місяця ( $85,6 \pm 5,34\%$ ). У II групі дослідження відносно число CD3+19- одразу після введення тимоглобуліну зменшувалося майже в 2 рази (з  $74,2 \pm 5,54\%$  до  $41,2 \pm 5,46\%$ ), а абсолютна кількість – в 5 разів ( $0,997 \pm 0,421 \times 10^9/\text{л}$  до  $0,049 \pm 0,021 \times 10^9/\text{л}$ ) з поступовим відновленням вже через два тижні до  $0,999 \pm 0,371 \times 10^9/\text{л}$ .

B-лімфоцити (CD3-19+) проходять розвиток в лімфовузлах та інших периферичних органах лімфоїдної системи. На поверхні ці клітини несуть імуноглобуліни, що функціонують як рецептори до антигенів. У відповідь на взаємодію з антигеном B-лімфоцити відповідають диференціацією в плазматичні клітини, що виробляють антитіла, за допомогою яких забезпечується гуморальний імунітет. У II групі відмічалася зростання відносної кількості основних маркерів B-лімфоцитів на першу добу у 6 разів (з  $7,71 \pm 2,5\%$  до  $46,8 \pm 6,7\%$ ), після чого відмічалася тенденція до зменшення протягом двох тижнів (до  $9,8 \pm 3,7\%$ ). Абсолютна їх кількість навпаки одразу зменшувалася вдвічі ( $0,135 \pm 0,01 \times 10^9/\text{л}$  до  $0,065 \pm 0,015 \times 10^9/\text{л}$ ), з послідуною тенденцією до зростання через 1 місяць до  $0,1 \pm 0,06 \times 10^9/\text{л}$ . У I групі відносна кількість B-лімфоцитів збільшувалася в 2,5 рази за два тижні (з  $7,2 \pm 2,5\%$  до  $18,1 \pm 3,7\%$ ), після чого ще через два тижні зменшувалася майже до вхідного рівня ( $7,3 \pm 1,8\%$ ). Їх абсолютна кількість у I групі зростала у 4 рази за два тижні (з  $0,112 \pm 0,046 \times 10^9/\text{л}$  до  $0,469 \pm 0,065 \times 10^9/\text{л}$ ), після чого зменшувалася майже до вихідного рівня ( $0,142 \pm 0,021 \times 10^9/\text{л}$ ).

T-хелпери (CD4+8-) несуть на своїй поверхні структури, що сприяють розпізнаванню антигенів, які презентуються допоміжними клітинами, беруть участь в індукції та регуляції імунної відповіді, виробляючи різні цитокіни, стимулюють запуск і розвиток імунних реакцій. У II групі на першу добу

після введення АТГ їх відносна кількість зменшувалася у 3,5рази ( $58,5 \pm 12,5\%$  до  $16,5 \pm 5,1\%$ ), з послідуою поступовим зростанням і відновленням до вихідного рівня через 1 місяць (до  $55,1 \pm 5,1\%$ ). У I групі їх абсолютна кількість зростала у 2 рази (з  $0,911 \pm 0,044 \times 10^9/\text{л}$  до  $1,792 \pm 0,114 \times 10^9/\text{л}$ ), а через 1 місяць поверталася до вихідного рівня ( $0,967 \pm 0,054 \times 10^9/\text{л}$ ).

T-цитотоксичні (CD4-8+) розпізнають фрагменти антигену на поверхні клітин-мішеней, орієнтують свої гранули у напрямку до мішені і вивільняють їх вміст в області контакту з нею. При цьому деякі цитокіни є сигналом загибелі (по типу апоптозу) для клітин-мішеней. Їх функція полягає в знищенні власних пошкоджених клітин, заражених вірусами, пухлинних клітин та ін. Вони діють через запуск у таргетній клітині механізмів апоптозу і є головними ефекторними клітинами у механізмах розвитку реакцій відторгнення. Відносна кількість T-цитотоксичних клітин у II групі зменшувалася в чотири рази на першу добу ( $28,5 \pm 2,5\%$  до  $7,4 \pm 3,1\%$ ), після чого відновлювалася до вихідного рівня вже через тиждень (до  $29,5 \pm 3,2\%$ ). Абсолютна їх кількість зменшувалася майже на 97% після першого дня (з  $0,576 \pm 0,041 \times 10^9/\text{л}$  до  $0,005 \pm 0,001 \times 10^9/\text{л}$ ), та поступово зростала до  $0,561 \pm 0,031 \times 10^9/\text{л}$  через 1 місяць спостереження. У I групі відносна кількість T-цитотоксичних клітин на першу добу зменшувалася на 25% ( $27,2 \pm 2,5\%$  до  $20,5 \pm 3,1\%$ ), після чого зростала до 1 місяця після операції до  $26 \pm 2,1\%$ .

Натуральні кілери (NK-клітини CD3-16+56+) – популяція великих гранулярних лімфоцитів, які здатні лізувати клітини-мішені інфіковані вірусами та іншими внутрішньоклітинними антигенами, пухлинні клітини, а також інші клітини алогенного і ксеногенного походження. Вони першими розпізнають донорські HLA. Збільшення кількості NK-клітин може бути пов'язано з активацією трансплантаційного імунітету. Зниження їх кількості спостерігається при вроджених імунодефіцитах, паразитарних інфекціях, аутоімунних захворюваннях, опроміненні, лікуванні цитостатиками і кортикостероїдами. У II групі пацієнтів на першу добу абсолютна їх кількість зменшувалася на більше ніж 90% (з  $0,329 \pm 0,056 \times 10^9/\text{л}$  до  $0,004 \pm 0,001 \times 10^9/\text{л}$ ), та повільно зростала через два тижні до  $0,02 \pm 0,016 \times 10^9/\text{л}$ , та залишалася приблизно такою ж в періоді спостереження до  $0,021 \pm 0,003 \times 10^9/\text{л}$ . Відносна кількість NK-клітин зростала в першу добу у два рази (з  $1,1 \pm 0,1\%$  до  $2,1 \pm 0,2\%$ ), та продовжила зростання через два тижні до  $3,8 \pm 0,85\%$ . У I групі їх абсолютна кількість зростала протягом двох тижнів спостереження з  $0,101 \pm 0,032 \times 10^9/\text{л}$  до  $0,197 \pm 0,054 \times 10^9/\text{л}$ , а відносна кількість з  $6,4 \pm 2,5\%$  до  $7,6 \pm 1,1\%$ , а через 1 місяць абсолютна кількість ставала меншою вихідного рівня ( $0,077 \pm 0,012 \times 10^9/\text{л}$ ), а відносна –  $4,3 \pm 1,5\%$  відповідно.

T-reg (CD4+127-25+45+) регулюють T-клітинний гомеостаз, запобігають аутоімунним захворюванням, алергії, гіперчутливості, реакції трансплантат проти хазяїна, а також забезпечують толерантність після трансплантації. З іншого боку вони знижують протипухлинний та протиінфекційний імунітет. У I групі відносна кількість T-reg мала тенденцію до зменшення з  $5,7 \pm 0,9\%$  до  $3,1 \pm 0,7\%$ , а через 1 місяць після операції зменшувалася ще більше до  $0,1 \pm 0,05\%$ , після чого мала тенденцію до підвищення до  $3,1 \pm 1,3\%$  за період спостереження. У II групі пацієнтів їх відносна кількість спочатку зменшувалася (з  $4,8 \pm 2,5\%$  до  $4,3 \pm 1,2\%$ ), а потім зростала і залишалася підвищеною протягом періоду спостереження (до  $5,5 \pm 1,2\%$ ).

Імунорегуляторний індекс, I-reg (CD4+/8+) є співвідношенням рівнів CD4+ до CD8+T-лімфоцитів. Рівень імунорегуляторного індексу оцінюють у зіставленні з фазою імунної відповіді. У період розпаду і стихання клінічних проявів імунорегуляторний індекс сягає високих значень за рахунок великого відсоткового вмісту T-хелперів (CD4+T-клітин). У період реконвалесценції значення показника зменшується у зв'язку з наростанням рівня CD8+T-клітин (кілерів). Порушення такої закономірності свідчить про неадекватність імунної реакції та про можливість хронізації інфекції через неповну ерадикацію збудника. I-reg у I групі у перший тиждень дещо підвищувався (з  $2,2 \pm 0,2$  до  $3 \pm 0,3$ ), а потім повертався до вихідного рівня ( $2,2 \pm 0,15$ ), а у II групі навпаки, спочатку зменшувався (з  $1,7 \pm 0,2$  до  $0,7 \pm 0,15$ ), після чого мав тенденцію до зростання, проте не доходив до вихідного рівня ( $1,3 \pm 0,2$ ).

Рівень імунoglobulinів – є неспецифічним показником гуморального імунітету. В динаміці у реципієнтів I та II групи достовірної різниці між рівнями IgA, який бере участь у забезпеченні місцевого імунітету, рівнями IgM, який забезпечує первинну імунну відповідь, та рівнями IgG, який забезпечує вторинну імунну відповідь, не відмічали.

Протокольні біопсії виконувалися всім пацієнтам на 3-ій місяць після операції. У дослідженому матеріалі фрагментів тканини нирки в основному клубочки були без ознак склерозування, без сегментоядерних нейтрофілів у просвіті петель, без ознак подвоєння базальної мембрани та розширення мезангіального матриксу (g0, mm0, cg0). Канальці мали збережений епітелій, у 20% пацієнтів були мінімальні ділянки тубулярної атрофії (ct1), інтраепітеліальних лімфоцитів виявлено не було (t0). У просвіті каналців патологічного вмісту виявлено не було, у інтерстиції ознак фіброзу, запальної інфільтрації виявлено не було (ci0, i0, i-IFTA0, у перитубулярних капілярах нейтрофілів виявлено не було (ptc0), стінки артерій без патологічних змін у стінці (v0, cv0, ah0), загальна вираженість запалення була відсутня (ti0).

Імуногістохімічне дослідження показало: CD3 (Polyclonal) – у 20% біоптатів - позитивна реакція в T-лімфоцитах у вигляді одиничних дискретно розташованих клітин у інтерстиції, C4d позитивна реакція спостергалася у 2 із 6 пацієнтів зі ступеню вираженості 5 і 15% в перитубулярних капілярах та капілярах петель частини клубочків.

Загалом морфологічна будова біоптатів була без суттєвих патологічних змін. Banff score: g0, mm0, cg0, ct1, ci0, t0, ptc0, i-IFTA0, i0, ti0, v0, cv0, ah0, c4d2 (5-15% біоптатів).

**Обговорення.** Загалом всі пацієнти перенесли введення СК кордової крові без ускладнень, що показано в таблиці 2. У пацієнтів відмічалася незначне підвищення артеріального тиску, що може бути пов'язано з премедикацією дексаметазоном [11] та хвилюванням пацієнтів ще до введення СК, оскільки спостереження за пацієнтами велося в умовах відділення інтенсивної терапії. Жодних гіпертермічних чи анафілактичних реакцій на введення препарату ФЯКПКЛ не відмічалася. Відстроеної функції НАТ не було. Діурез на першу добу після операції складав  $9415 \pm 928,1$ мл. Відновлення функції НАТ відмічалася вже на другу-третю добу (ШКФ більше  $90$  мл/хв/м<sup>2</sup>). Післяопераційні рани у всіх пацієнтів зажили первинним натягом, ранніх післяопераційних ускладнень, таких як неспроможність неоуретеро-цистоанастомозу, лімфоцеле не було. Пацієнти в задовільному стані на 12-14-у добу були виписані з стаціонару під нагляд трансплантолога поліклініки нашого інституту. Основні скарги пацієнтів включали в основному біль в місці виходу сечового катетера у 50% пацієнтів, який проходив після його видалення, появу акне на шкірних покриттях протягом 3-6 місяців після трансплантації нирки у 33,33% пацієнтів, випадіння волосся відмічалася у одного пацієнта, який приймав такролімус [12].

Реакцій відторгнення у даній категорії пацієнтів у віддаленому періоді в термін спостереження до 1-го року – не спостерігалася. Протокольні виконані біопсії та проведені морфологічні дослідження не виявили ознак суттєвих патологічних змін в трансплантованих нирках у пацієнтів які отримували в індукційній терапії СК. Загалом морфологічна будова біоптатів була без суттєвих патологічних змін, що співпадало з нормальними показниками функції всіх НТ. Слабко виражена експресія c4d у перитубулярних капілярах без морфологічних та клінічних проявів антитілоопосередкованого відторгнення, яку ми спостерігали у 2 з 6 реципієнтів, не має достовірного діагностичного значення [13].

Ми не спостерігали розвитку опортуністичних інфекцій у наших групах пацієнтів. Аналогічні дані наведені Zhao L. et al. [14], які при метаналізі чотирьох досліджень, в яких було порівняно результати лікування 197 реципієнтів НАТ, одна частина з яких отримувала МСК в індукційній терапії, а інша отримувала стандартну ІСТ при ТН. Автори також

відмітили менший рівень інфекційних ускладнень протягом року спостереження (RR = 0,65, 95% ДІ: 0,46–0,9, P = 0,01) порівняно з пацієнтами, які отримували стандартну ІСТ. Автори вважають, що схема з введенням СК може мати переваги та можливі кращі віддалені результати.

Визначення стану імунної системи реципієнтів в динаміці, враховуючи малу кількість пацієнтів потребують подальшого продовження дослідження.

**Висновки.** Введення стовбурових клітин кордової крові реципієнтам перед трансплантацією нирки є безпечним та сприяє швидкому відновленню функції ниркового алотрансплантата. В жодному випадку морфологічне дослідження біоптата нирки не виявило ознак хронічного відторгнення трансплантата, що дозволяє прогнозувати його

тривале функціонування в подальшому. Аналіз динаміки показників імунної системи реципієнтів ниркових трансплантатів поки не виявив достовірних закономірностей, що пов'язано з малою кількістю спостережень та потребує продовження досліджень.

**Джерела фінансування:** Кошти держбюджету для фінансування НДР «Визначити можливість застосування МСК при трансплантації нирки».

**Конфлікт інтересів.** Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

**Внесок кожного автора:**

**Вороняк О.С.:** збір та обробка матеріалів дослідження, аналіз отриманих даних, написання тексту рукопису;

**Зограб'ян Р.О.:** концепція та дизайн дослідження.

### Література (References):

1. *Benjamins S, Moers C, Slart RHJA, Pol RA.* Kidney Transplantation and Diagnostic Imaging: The Early Days and Future Advancements of Transplant Surgery. *Diagnostics (Basel)*. 2020;11(1):47. doi: 10.3390/diagnostics11010047.
2. *Pinchuk A.V.* Induction immunosuppression in kidney transplantation: Thymoglobulin® (a literature review). *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2014;(2):31-43. [In Russian].
3. *Webster AC, Ruster LP, McGee R, Matheson SL, Higgins GY, Willis NS, et al.* Interleukin2 receptor antagonists for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010;2010(1):CD003897. doi: 10.1002/14651858.CD003897.pub3.
4. *Brennan DC, Daller JA, Lake KD, Cibrik D, Del Castillo D;* Thymoglobulin Induction Study Group. Rabbit antithymocyte globulin versus basiliximab in renal transplantation. *N Engl J Med*. 2006;355(19):1967-77. doi: 10.1056/NEJMoa060068.
5. *Jones-Hughes T, Snowsill T, Haasova M, Coelho H, Crathorne L, Cooper C, et al.* Immunosuppressive therapy for kidney transplantation in adults: a systematic review and economic model. *Health Technol Assess*. 2016;20(62):1-594. doi: 10.3310/hta20620.
6. *Coemans M, Süsal C, Döhler B, Anglicheau D, Giral M, Bestard O, et al.* Analyses of the short- and long-term graft survival after kidney transplantation in Europe between 1986 and 2015. *Kidney Int*. 2018;94(5):964-973. doi: 10.1016/j.kint.2018.05.018.
7. *Justiz Vaillant AA, Mohseni M.* Chronic Transplantation Rejection. [Updated 2022 Jul 8]. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535435/>
8. *Foley RN, Chen SC, Solid CA, Gilbertson DT, Collins AJ.* Early mortality in patients starting dialysis appears to go unregistered. *Kidney Int*. 2014;86(2):392-8. doi: 10.1038/ki.2014.15.
9. *Voroniak O, Zograbian R.* The opportunity of stem cells application in kidney transplantation: experimental studies (review). *Počki*. 2020;9(4):240-248. doi: 10.22141/2307-1257.9.4.2020.218239. [In Ukrainian].
10. *Jeong HJ.* Diagnosis of renal transplant rejection: Banff classification and beyond. *Kidney Res Clin Pract*. 2020;39(1):17-31. doi: 10.23876/j.krcp.20.003.
11. *Duchatsch F, Constantino PB, Herrera NA, Fabricio MF, Tardelli LP, Martuscelli et al.* Short-term exposure to dexamethasone promotes autonomic imbalance to the heart before hypertension. *J Am Soc Hypertens*. 2018;12(8):605-613. doi: 10.1016/j.jash.2018.06.004.
12. *Ilyas M, Colegio OR, Kaplan B, Sharma A.* Cutaneous Toxicities From Transplantation-Related Medications. *Am J Transplant*. 2017;17(11):2782-2789. doi: 10.1111/ajt.14337.
13. *Dominy KM, Willicombe M, Al Johani T, Beckwith H, Goodall D, Brookes P, et al.* Molecular Assessment of C4d-Positive Renal Transplant Biopsies Without Evidence of Rejection. *Kidney Int Rep*. 2018;4(1):148-158. doi: 10.1016/j.ekir.2018.09.005.
14. *Zhao L, Hu C, Han F, Chen D, Cheng J, Wu J, et al.* Induction therapy with mesenchymal stromal cells in kidney transplantation: a meta-analysis. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):158. doi: 10.1186/s13287-021-02219-7.