

А.В. НОСИК¹, С.В. КОРОТКОВ^{1,2}, В.В. СМОЛЬНИКОВА²,
В.Ю. ГРИНЕВИЧ², М.В. ДМИТРИЕВА³, А.А. ДОЛГОЛИКОВА²,
И.И. ПИКИРЕНЯ^{1,2}, С.И. КРИВЕНКО², О.В. КАЛАЧИК^{1,2},
А.Е. ЩЕРБА^{1,2}, О.О. РУММО^{1,2}



ЗНАЧЕНИЕ ОЦЕНКИ ЧИСЛЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ДИАГНОСТИКЕ КЛЕТОЧНОГО ОТТОРЖЕНИЯ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ПОЧКИ

Белорусская медицинская академия последипломного образования¹,
Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии²,
Городское клиническое патологоанатомическое бюро³, г. Минск,
Республика Беларусь

Цель. Изучить возможность оценки численности субпопуляций лимфоцитов периферической крови в качестве биомаркеров позднего отторжения трансплантата почки.

Материал и методы. Проведено обсервационное, ретроспективное, аналитическое, сравнительное в 2 группах исследование по типу «случай-контроль» (44 пациента). В первую группу (AR) вошли участники с гистологически-подтвержденным поздним клеточным отторжением трансплантата (22 пациента). Вторую группу (STA) составили реципиенты со стабильной функцией трансплантата (22 пациента). В качестве метода оценки иммунного статуса реципиентов использована проточная цитофлуориметрия.

Результаты. В результате работы в группах исследования выявлены достоверные отличия в абсолютной численности субпопуляций эффекторных CD4⁺ Т-клеток памяти, что составило в группе REJ 0,147 (0,115-0,260)×10⁹ кл/л, а в группе STA – 0,106 (0,067-0,136)×10⁹ кл/л (p=0,0167), в относительной и абсолютной численности миелоидных дендритных клеток, что составило 0,65 (0,36-0,73) vs 1,05 (0,67-1,4)% и 0,039 (0,028-0,056) vs 0,063 (0,049-0,076)×10⁹ кл/л (p=0,0009, p=0,003), а также в относительной и абсолютной численности плазмацитоидных дендритных клеток – 0,055 (0,04-0,085) vs 0,09 (0,05-0,12)% и 0,0038 (0,0021-0,0054) vs 0,005 (0,0035-0,007)×10⁹ кл/л (p=0,0197, p=0,0414).

Оценка диагностических характеристик биомаркеров проводилась с помощью ROC-анализа. Так, площадь под ROC-кривой (AUC) для абсолютной численности эффекторных CD4⁺ Т-клеток памяти составила 0,711 (95%ДИ: 0,55-0,84), p=0,007. AUC для относительной и абсолютной численности миелоидных дендритных клеток составила соответственно 0,784 (95%ДИ: 0,63-0,89) и 0,758 (95%ДИ: 0,6-0,87), p=0,0001 и p=0,0004. Для относительной и абсолютной численности плазмацитоидных дендритных клеток AUC составила соответственно 0,7 (95%ДИ: 0,55-0,83) и 0,68 (0,51-0,8), p=0,01 и p=0,0357.

Заключение. Полученные данные показали, что уровень в крови дендритных клеток и уровень хелперных эффекторных Т-клеток памяти могут обоснованно считаться диагностическими маркерами позднего отторжения трансплантата почки.

Ключевые слова: трансплантация почки, почечный аллографт, иммуномониторинг, биомаркеры, отторжение

Objective. To study the possibility of assessing the number of peripheral blood lymphocyte subpopulations as biomarkers of late kidney transplant rejection.

Methods. This is a report of retrospective single center case-control study involving 44 patients who underwent kidney transplantation. The first group (AR) includes patients with chronic graft dysfunction, caused by biopsy proven late cellular rejection (22 patients). The second group (STA) contains recipients, who haven't any dysfunction in the post-transplant period (22 patients). Flow cytometry of the peripheral blood cells was performed to evaluate the immune status of recipients.

Results. As a result of the research, accurate differences of absolute account of effector memory T cell were determined, which accounted for in REJ group 0.147 (0.115-0.260)×10⁹ cell/l, and in STA group 0.106 (0.067-0.136)×10⁹ cell/l (p=0.0167). Relative and absolute accounts of myeloid dendritic cells were different as well: 0.65 (0.36-0.73) vs 1.05 (0.67-1.4) % and 0.039 (0.028-0.056) vs 0.063 (0.049-0.076)×10⁹ cell/l, respectively (p=0.0009, p=0.003). Number of plasmacytoid dendritic cells was also different between study groups: absolute account 0.0038 (0.0021-0.0054) vs 0.005 (0.0035-0.007)×10⁹ cell/l (p=0.0414), and relative account 0.055 (0.04-0.085) vs 0.09 (0.05-0.12) % (p=0.0197).

The evaluation of diagnostic characteristic of revealed biomarkers was performed by using ROC-analysis. The area under ROC-curve (AUC) for absolute number of effector CD4⁺ memory T cells accounted for 0.711 (95 % CI: 0.55-0.84), p=0.007. AUC for relative and absolute number of myeloid dendritic cells was assessed respectively

as 0.784 (95% CI: 0.63-0.89) and 0.758 (95 % CI: 0.6-0.87), at significance values respectively – $p=0.0001$ and $p=0.0004$. For relative and absolute number of plasmacytoid dendritic cells AUC accounted for respectively to 0.7 (95% CI: 0.55-0.83) and 0.68 (95% CI: 0.51-0.8), at significance values $p=0.01$ and $p=0.0357$.

Conclusions. The received data showed that blood level of dendritic cells and the level of effector helper T memory cells can be reasonably considered as diagnostic markers of kidney transplant cellular rejection in late period after operation.

Keywords: kidney transplantation, kidney allograft, immune monitoring, biomarkers, rejection

Novosti Khirurgii. 2019 Jul-Aug; Vol 27 (4): 409-420

The articles published under CC BY NC-ND license

Value of Assessment of Lymphocytes Subpopulations Numbers in Peripheral Blood for Diagnosis of Cellular Rejection after Kidney Transplantation



A.V. Nosik, S.V. Korotkov, V.V. Smolnikova, V.Yu. Hrynevich, M.V. Dmitrieva, A.A. Dolgikova, I.I. Pikirenia, S.I. Krivenko, O.V. Kalachik, A.E. Shcherba, O.O. Rummo

Научная новизна статьи

Впервые было выявлено повышение относительной численности эффекторных CD4+ Т-лимфоцитов, снижение относительной численности миелоидных и плазматоидных дендритных клеток при развитии клеточного отторжения почечного аллографта в отдаленные сроки после операции.

Впервые была оценена диагностическая значимость изменений численности вышеупомянутых субпопуляций лимфоцитов в качестве биомаркеров позднего клеточного отторжения трансплантата почки и доказана возможность применения данных биомаркеров в диагностике иммунологических осложнений после трансплантации почки.

What this paper adds

For the first time the increase of relative number of effector CD4+ T lymphocytes has been established as well as the decrease of relative number of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in the development of cellular rejection of kidney allograft at late terms of post-transplantation.

For the first time the diagnostic importance of the changes of above-mentioned lymphocyte subpopulations as the biomarkers of late cellular rejection of kidney allograft has been estimated and the possibility to use these biomarkers in the diagnosis of immunologic complications after kidney transplantation has been proven.

Введение

Трансплантация почки – это оптимальный метод заместительной почечной терапии, обеспечивающий лучшую реабилитацию и увеличивающий выживаемость пациентов, страдающих хронической болезнью почек 5 стадии [1].

Наиболее грозным и частым осложнением (до 30% реципиентов) после трансплантации почки является агрессия иммунной системы реципиента к аллоантигенам донора. Развитие данного осложнения в раннем послетрансплантационном периоде снижает пятилетнюю выживаемость трансплантата до 89%, а при развитии отторжения в позднем посттрансплантационном периоде выживаемость графтов снижается до 85% [2]. Отторжение трансплантата почки относится к категории паренхиматозных осложнений, куда также входят инфекционные осложнения, возвратная нефропатия, диабетическая нефропатия, токсичность ингибиторов кальциневрина, ВК-нефропатия и т.д.

К сожалению, на современном этапе развития трансплантации солидных органов не существует лабораторных и инструментальных методов исследования, которые позволяли бы проводить быструю и точную неинвазивную дифференциальную диагностику паренхиматозной причины дисфункции трансплантата почки [3]. В настоящее время «золотым стандартом» дифференциации реакции отторжения

в качестве причины дисфункции почечного трансплантата остается биопсия почечного аллографта с гистологическим исследованием образцов и классификацией изменений в соответствии с руководством Banff. Однако проведение биопсии трансплантата почки в целях диагностики сопряжено с рядом недостатков, главным из которых является инвазивность процедуры. По данным литературы, осложнения после биопсии встречаются с частотой до 12,5% и разделяются на малые и большие. Малые осложнения представляют собой боль в области трансплантата, снижение гемоглобина крови <100 г/л, гематому в области трансплантата, гипотензию, и осложняют от 5,6% до 12,5 % манипуляций. Большие осложнения (необходимость проведения гемотрансфузии, радиологических интервенций, ревизии послеоперационной раны) после биопсии почечного аллографта встречаются с частотой от 0,8% до 2,4% случаев и в 0,25% случаев приводят к необходимости выполнения трансплантатаэктомии [4].

Все вышеперечисленное привело к активному поиску методов, которые позволили бы проводить точную диагностику реакции отторжения почечного аллографта и по возможности были бы неинвазивны. Методы иммуномониторинга наиболее отвечают данным требованиям и являются минимальноинвазивными, экономически выгодными, а результаты

исследования получают в течение короткого периода времени [5].

Проточная цитофлюориметрия (ЦФМ) является производительным методом иммуномониторинга, который позволяет одновременно оценивать количественно практически все субпопуляции лимфоцитов периферической крови. В настоящее время ЦФМ с диагностической целью широко используются в гематологии, онкологии, клинической иммунологии [6]. Однако в литературе отсутствуют данные об иммунофенотипических критериях диагностики реакции отторжения трансплантата почки [7].

Цель. Изучить возможность оценки численности субпопуляций лимфоцитов периферической крови в качестве биомаркеров позднего отторжения трансплантата почки.

Материал и методы

Дизайн исследования

Исходя из цели исследования проведено ретроспективное, одноцентровое, аналитическое исследование по типу «случай-контроль». Группы исследования формировались исходя из характера течения послетрансплантационного периода и результатов гистологического исследования реципиентов почечного аллографта.

Первая группа пациентов (AR) являлась основной и включила реципиентов с формированием хронической трансплантационной дисфункции, вызванной иммунным конфликтом по клеточному фенотипу. Иммунная причина дисфункции трансплантата почки была подтверждена неоднократным гистологическим исследованием. Других причин хронической трансплантационной дисфункции при гистологическом исследовании выявлено не было.

Вторая группа исследования (STA) — контрольная — включила реципиентов, послетрансплантационный период у которых характеризовался отсутствием как острой, так и хронической дисфункции трансплантата почки. Контрольная группа формировалась из той же генеральной совокупности в соотношении 1:1 с основной, участники выбирались методом случайных чисел.

Характеристика пациентов

Проведенное исследование включило 44 реципиента трансплантата почки, диспансерно наблюдающихся в ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии», г. Минск. Реципиентам была выполнена трансплантация почки от донора со смертью мозга в период с 2004 по 2013 год.

Критерии включения пациентов в исследование: реципиенты после трансплантации

только почечного аллографта, трансплантация от донора со смертью мозга, период наблюдения не менее 4 лет, возраст реципиентов от 18 до 70 лет, наличие на момент исследования трансплантата и прием иммуносупрессивной терапии, возможность дать информированное добровольное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения участников: отсутствие полноценной информации о течении послетрансплантационного периода, высокий риск иммунных осложнений на момент трансплантации (отсутствие совпадений по антигенам гистосовместимости в паре донор-реципиент (HLA), панель реактивных антител сыворотки реципиента (PRA) >15%), наличие инфекционных осложнений (Цитомегаловирус, вирус Эпштейн-Барр, Полиомавирус), наличие онкологических осложнений (прежде всего, посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания).

Протокол иммуносупрессивной терапии у всех участников исследования был стандартным.

Биопсии трансплантата почки выполнялись при развитии трансплантационной дисфункции, результаты гистологического исследования оценивались в соответствии с международной стандартизированной классификацией Banff 2015 года пересмотра.

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом. Все пациенты дали добровольное информированное согласие на участие в исследовании и были привлечены в исследование в период с октября 2016 по январь 2017 года.

Цитофлюориметрия

Иммунофенотип клеток периферической крови определяли методом восьмичетной проточной цитофлюориметрии на проточном цитофлюориметре FACSCanto (Becton Dickinson, США), оснащенный лазерами с тремя длинами волн (488 нм, 633 нм, 405 нм). Данные анализировали в программе FACSDiva версии 6.

Для определения численности субпопуляций Т-лимфоцитов и дендритных клеток 100 мкл периферической крови инкубировали с соответствующими моноклональными антителами в объеме согласно прописи фирмы-производителя в течение 15 минут при 4°C. Затем эритроциты лизировали раствором хлорида аммония в течение 10 минут при 4°C. Далее клетки осаждали центрифугированием в течение 5 минут при скорости 1500 об/мин. Супернатант удаляли, клетки суспендировали в 200 мкл фосфатно-буферного раствора. Для дальнейшего анализа клетки загружали в объеме не менее 10000 клеток в регионе Т-лимфоцитов,

и не менее 500 клеток в регионе дендритных клеток и в объеме не менее 3000 клеток в регионе В лимфоцитов

Использовались следующие моноклональные антитела: CD45-PerCP (ExBio, Чехия), CD45RA-FITC (Beckman Coulter, США), CD62L-PE (Beckman Coulter, США), CD127-PC7 (Beckman Coulter, США), CD25-APC (Beckman Coulter, США), CD4-APC-Cy7 (ExBio, Чехия), CD3-Pacific Blue (Beckman Coulter, США), CD8-Krome Orange (Beckman Coulter, США), CD11c-PE (ExBio, Чехия), CD123-PC7 (Beckman Coulter, США), CD56-APC (ExBio, Чехия), CD19-APC-Alexa Fluor 750 (Beckman Coulter, США), HLA-DR-Krome Orange (Beckman Coulter, США), CD38-FITC (Beckman Coulter, США), IgD-PE (Becton Dickinson, США), CD27-PC7 (Beckman Coulter, США), CD5-APC (Beckman Coulter, США), IgM-Pacific Blue (Beckman Coulter, США).

Гейтирование основных субпопуляций иммунокомпетентных клеток проводилось в соответствии с разработанным и стандартизированным протоколом.

Статистика

Результаты анализа количественных данных представлены как медиана (25% квартиль – 75% квартиль). Результаты анализа качественных признаков представлены как Абсолютная частота (процент). Для сравнения количественных данных в группах сравнения использовался критерий Манна-Уитни (U-критерий). Результаты сравнения количественных данных представлены как AR медиана (25% квартиль – 75% квартиль) vs STA (25% квартиль – 75% квартиль), уровень значимости различий. Для сравнения качественных данных в группах исследования использовался критерий χ^2 . Результаты сравнения качественных данных представлены как AR абсолютная частота (процент) vs STA абсолютная частота (процент), уровень значимости различий. Корреляционная связь между количественными типами данных устанавливалась при помощи критерия Спирмена, между качественными – критерия ассоциации и критерия контингенции. Корреляция между качественными и количественными данными оценивалась при помощи рангово-биссерального критерия и критерия Чупрова. Определение диагностической ценности полученных маркеров позднего клеточного отторжения проводилось с использованием ROC-анализа, с построением ROC-кривых. Для каждого из полученных маркеров выявлялись чувствительность и специфичность с определением

площади под кривой (AUC) как меры диагностической значимости. Также для каждого маркера на основании диагностических характеристик (чувствительность, специфичность, предикативные ценности положительного и отрицательного результата теста) определялось оптимальное пороговое значение (cut-off), обладающее наилучшими характеристиками в дискриминации пациентов с развитием позднего клеточного отторжения почечного аллографта. Уровень статистической значимости полученных результатов принят как $p \leq 0,05$.

Результаты

Характеристика реципиентов

Среди участников исследования 21 (47,7%) мужчина, 23 (52,3%) женщины. Медиана возраста участников исследования составила 49 (39,5–55,5) лет. Основной причиной терминальной стадии хронической болезни почек был хронический гломерулонефрит без уточнения морфологического варианта – в 34 случаях (77,3%). Большинство реципиентов в качестве заместительной почечной терапии получали гемодиализ – 38 из 44 (86,4%) пациентов. Длительность нахождения на диализотерапии составила в среднем 71,8 (39–105) месяцев. Всем реципиентам произведена гетеротопическая трансплантация почки от донора со смертью мозга. Время консервации не превышало 24 часа и составило в среднем 8,5 (6,75–10) часов. Пары донор-реципиент чаще всего совпадали по 2 антигенам гистосовместимости I класса (HLA) – у 8 из 44 (18,2%) участников. Уровень предсуществующих антител при подсчете панели реактивных антител (PRA) на момент включения в исследование не превышал 15%. Предсуществующие антитела на момент трансплантации были выявлены у 7 из 44 (15,9%) участников исследования.

Необходимо отметить, что клинико-демографические характеристики, за исключением показателей функции трансплантата почки, не различались в группах исследования (таблица 1).

Острая дисфункция трансплантата в отдаленном периоде развилась у 13 из 22 (59,1%) реципиентов. При этом развитие острого криза отторжения ассоциировано с формированием хронической трансплантационной дисфункции (коэффициент ассоциации – 0,65). При классификации по Vanff установлено, что IA степень встречалась у 13 из 22 (59,1%) реципиентов, IB степень – у 2 из 22 (9%) реципиентов, а 2A степень – у 3 из 22 (13,6%) реципиентов почечного аллографта. Формирование хронических процессов отторжения трансплантата почки

без предшествовавшей острой дисфункции, выявлено у 4 из 22 (18,3%) участников основной группы исследования.

Анализ корреляции клинических факторов с частотой гистологически подтвержденного клеточного отторжения трансплантата почки не выявил статистически значимых связей между параметрами, кроме связи реакции отторжения с ранней дисфункцией аллографта. Не было выявлено ассоциации между степенью гистологически подтвержденного отторжения почечного аллографта и численностью субпопуляций иммунокомпетентных клеток.

Различия численности субпопуляций иммунокомпетентных клеток

Протокол проведенного цитофлюориметрического исследования лимфоцитов периферической крови предполагал оценку абсолютной

и относительной численности субпопуляций основных иммунокомпетентных клеток. Разработанная стратегия гейтирования включала выделение субпопуляций CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, субпопуляций В-лимфоцитов, в том числе и клеток герминативного центра, натуральных киллеров и дендритных клеток (Дк). В анализ также были включены субпопуляции регуляторных клеток, которые, по данным литературы, могут являться движущими силами формирования функциональной толерантности к аллоантигенам.

При анализе данных ЦФМ различия были выявлены в относительной и абсолютной численности субпопуляций Т-клеток памяти и дендритных клеток.

Среди субпопуляций Т-клеток памяти статистически значимые различия были выявлены

Таблица 1

Сравнение демографических и клинических характеристик в группах

Характеристика	AR	STA	Уровень значимости
Пол			
Мужской	12/22 (54,5%)	9/22 (40,9%)	p=0,365
Женский	10/22 (45,5%)	13/22 (59,1%)	
Возраст, лет	47,5 (35-56)	49 (43-55)	p=0,622
Патология			
Хронический гломерулонефрит	18/22 (81,8%)	17/22 (77,3%)	
ВАМП	1/22 (4,55%)	1/22 (4,55%)	
Поликистозная болезнь	1/22 (4,55%)	1/22 (4,55%)	p=0,73
Сахарный диабет	1/22 (4,55%)	3/22 (13,6%)	
Генетическая патология	1/22 (4,55%)	0/22 (0%)	
Совместимость по HLA			
≤ 3 несовпадений	18/22 (81,8%)	19/22 (86,4%)	p=0,68
> 3 несовпадений	4/22 (18,2%)	3/22 (13,6%)	
PRA на момент трансплантации, р	4/22 (18,2%)	3/22 (13,6%)	p=0,679
Время на диализотерапии, месяцы	70 (46-107,5)	60 (17-86)	p=0,336
Время холодовой ишемии, часы	8,75 (7-10)	7,5 (6,5-20)	p=0,411
Индукционная ИТ			
Антитимоцитарный глобулин	9/22 (40,9%)	14/22 (63,6%)	p=0,13
Базиликсимаб	13/22 (59,1%)	8/22 (36,4%)	
Ингибитор кальциневрина			
Циклоспорин А, мг/сут	150 (100-175)	150 (125-150)	p=0,472
Концентрация циклоспорина, нг/мл	76 (63,1-83)	70,1 (63,7-87)	p=0,87
Такролимус, мг/сут	4 (2-5)	3 (2,5-3)	p=0,344
Концентрация такролимуса, нг/мл	5,2 (4,95-5,9)	5,8 (5,18-5,95)	p=0,7
Антиметаболит			
Микофеноловая кислота, мг/сут	1000 (1000-2000)	1000 (1000-1000)	p=0,66
Азатиоприн, мг/сут	100 (75-100)	100 (100-100)	p=0,264
Глюкокортикостероиды			
Метилпреднизолон, мг/сут	4 (2-4)	2 (2-4)	p=0,378
Функция трансплантата			
Ранняя дисфункция графта	12/22 (54,5%)	2/22 (9%)	p=0,0014
Сывороточный креатинин, мкмоль/л	163 (101-218)	76,4 (65-93)	p<0,01
Разовая протеинурия, гр/л	0,315 (0,046-0,789)	0,046 (0-0,186)	p<0,01
Скорость клубочковой фильтрации, мл/мин	46,9 (27-75,4)	82 (70-98)	p<0,01

лишь в абсолютной численности CD4+ эффекторных клеток памяти – 0,147 (0,115-0,260) vs 0,106 (0,067-0,136) × 10⁹ кл/л, p=0,0167. Относительная численность данной субпопуляции имела лишь тенденцию к различию в группах исследования.

Значимые отличия в группах сравнения были получены в численности как миелоидных, так и плазматоидных дендритных клеток (мДк и пДк). Так, относительная численность миелоидных дендритных клеток была меньше в группе с гистологически подтвержденным иммунным конфликтом и составила 0,65 (0,36-0,73) vs 1,05 (0,67-1,4)%, p=0,0009. Соответственно, абсолютное количество мДк периферической крови в группах сравнения – 0,039 (0,028-0,056) vs 0,063 (0,049-0,076) × 10⁹ кл/л, p=0,003.

Снижение численности плазматоидных дендритных клеток также было выявлено в группе реципиентов с осложненным течением послетрансплантационного периода. Процентное количество пДк в группах сравнения составило 0,055 (0,04-0,085) vs 0,09 (0,05-0,12)%, p=0,0197. Абсолютная численность пДк была – 0,0038 (0,0021-0,0054) vs 0,005 (0,0035-0,0068) × 10⁹ кл/л, p=0,0414.

Однако не было выявлено различия в отношении процента содержания плазматоидных дендритных клеток к проценту содержания миелоидных Дк в периферической крови (0,08 (0,06-0,15) vs 0,07 (0,05-0,15), p=0,75).

Проведенный анализ не выявил тенденций различия численности оставшихся субпопуляций иммунокомпетентных клеток.

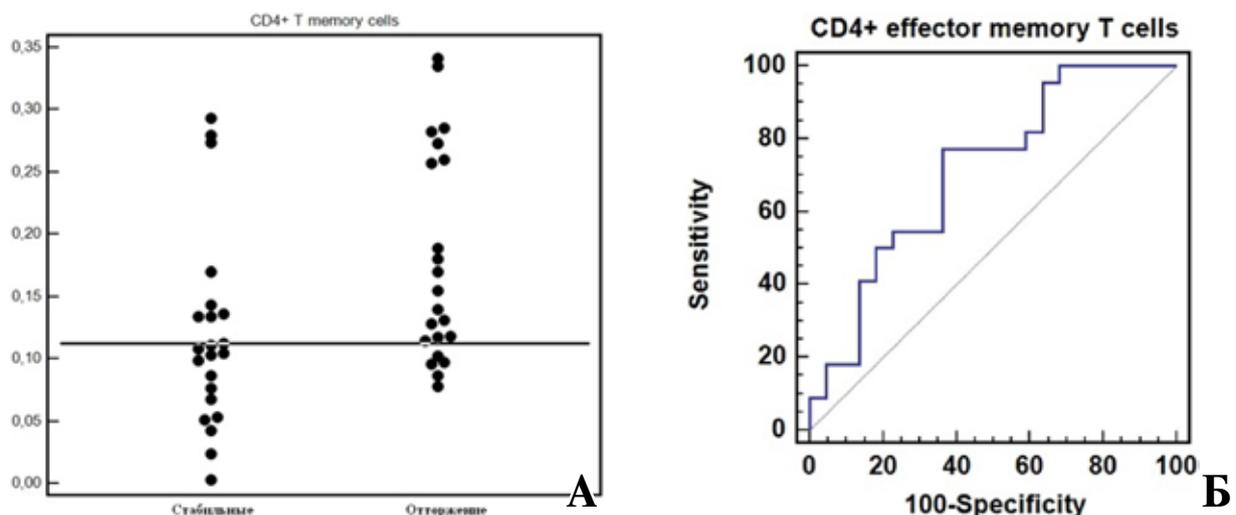
Оценка установленных различий клеточных субпопуляций в качестве маркеров отторжения трансплантата почки

Полученные в ходе сравнительного анализа различия в численности субпопуляций иммунокомпетентных клеток, были протестированы с помощью Receive operative characteristic (ROC) анализа в качестве диагностических маркеров клеточного отторжения почечного аллографта в отдаленном периоде после трансплантации. Для каждого маркера построена ROC-кривая с определением площади под кривой (AUC) и оптимального порога отсека классификации (cut-off).

Так, для абсолютной численности эффекторных CD4+ Т-клеток памяти оптимальным порогом отсека явился уровень 0,1124 × 10⁹ кл/л. Чувствительность и специфичность для данного cut-off составили соответственно 77,3% (54,6%-92,1%) и 63,6% (40,7%-82,8%). Площадь под кривой для маркера в целом равнялась 0,711 (95%ДИ 0,555-0,837), стандартная ошибка оценки 0,078 и уровень статистической значимости p=0,007 (рис. 1). В таблице 2 приведены пять наиболее значимых с точки зрения диагностической ценности порогов отсека для абсолютной численности эффекторных CD4+ Т-клеток памяти. Отношение шансов (ОШ) превышения порогового значения численности маркера при развитии реакции отторжения трансплантата почки – 1,68 (0,0448-0,6307), p=0,0082. Данные результаты говорят о том, что абсолютная численность эффекторных Т-клеток памяти является значимым маркером иммунологических осложнений в отдаленном периоде после трансплантации почки.

Как показали результаты исследования, абсолютная численность миелоидных дендритных клеток периферической крови также может являться биомаркером реакции отторжения трансплантата почки. Оптимальным порогом

Рис. 1. ROC-кривая для абсолютной численности эффекторных CD4+ Т-клеток памяти (А), а также распределение участников групп исследования соответственно оптимальному порогу отсека (Б).



Чувствительность и специфичность для наиболее значимых порогов отсечения абсолютной численности эффекторных CD4+ Т-клеток памяти

Порог отсечения	Чувствительность (ДИ)	Специфичность (ДИ)
>0,099	81,82 (59,7-94,7)	40,91 (20,7-63,6)
>0,1023	77,27 (54,6-92,1)	40,91 (20,7-63,6)
>0,1124	77,27 (54,6-92,1)	63,64 (40,7-82,8)
>0,1307	54,55 (32,2-75,6)	63,64 (40,7-82,8)
>0,1358	54,55 (32,2-75,6)	77,27 (54,6-92,1)

отсечения для абсолютной численности мДк установлено значение $0,0512 \times 10^9$ кл/л. Для данного порога отсечения чувствительность равна 72,73% (49,8%-89,2%), а специфичность – 72,73% (49,8-89,2). Площадь под ROC-кривой 0,758 (95% ДИ: 0,606-0,874) при стандартной ошибке 0,073 и уровне значимости 0,0004 (рис. 2). В таблице 3 приведены наиболее ценные с диагностической точки зрения пороги отсечения данного биомаркера. При развитии реакции отторжения отношение шансов снижения абсолютной численности миелоидных дендритных клеток равное или менее оптимального порога отсечения (ОШ=7,11 (95% ДИ: 1,8865-26,8049)), $p=0,0038$.

Оптимальный порог отсечения относительной численности миелоидных дендритных клеток определен как 0,87% лимфоцитов пе-

риферической крови. Данный cut-off характеризуется удовлетворительными показателями чувствительности и специфичности – 86,36% (65,1-96,9) и 63,64% (40,7-82,8) соответственно. Площадь под ROC-кривой для относительной численности миелоидных дендритных клеток составляет 0,784 (0,634-0,893) при стандартной ошибке 0,07 и уровне значимости 0,0001 (рис. 3). Таблица 4 содержит пять наиболее диагностически ценных порогов отсечения относительной численности мДк. Отношение шансов снижения относительной численности миелоидных дендритных клеток ниже 0,87% равно при развитии клеточного отторжения почечного аллографта 11,08 (2,48-49,46), $p=0,0016$.

Абсолютная численность субпопуляции плазмацитойдных дендритных клеток также значительно различалась в группах исследования.

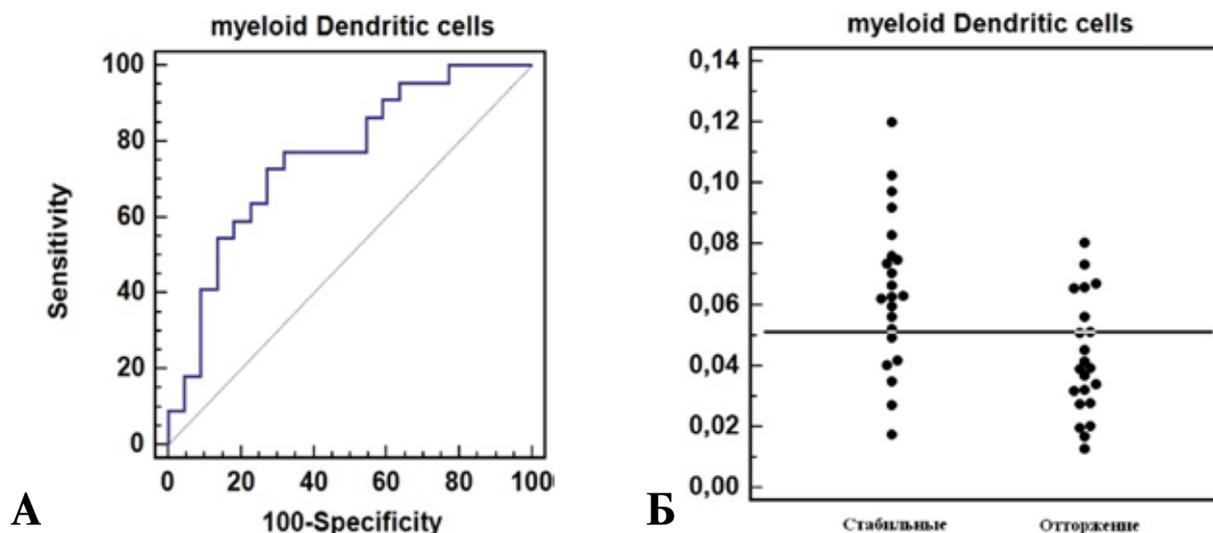


Рис. 2. ROC-кривая для абсолютной численности миелоидных дендритных клеток (А) и распределение участников групп исследования относительно оптимального порога отсечения численности мДк (Б).

Чувствительность и специфичность для наиболее значимых порогов отсечения относительной численности миелоидных дендритных клеток

Порог отсечения	Чувствительность (95% ДИ)	Специфичность (95% ДИ)
$\leq 0,0451$	63,64 (40,7-82,8)	77,27 (54,6-92,1)
$\leq 0,0494$	63,64 (40,7-82,8)	72,73 (49,8-89,2)
$\leq 0,0512$	72,73 (49,8-89,2)	72,73 (49,8-89,2)
$\leq 0,052$	72,73 (49,8-89,2)	68,18 (45,1-86,1)
$\leq 0,0561$	77,27 (54,6-92,1)	68,18 (45,1-86,1)

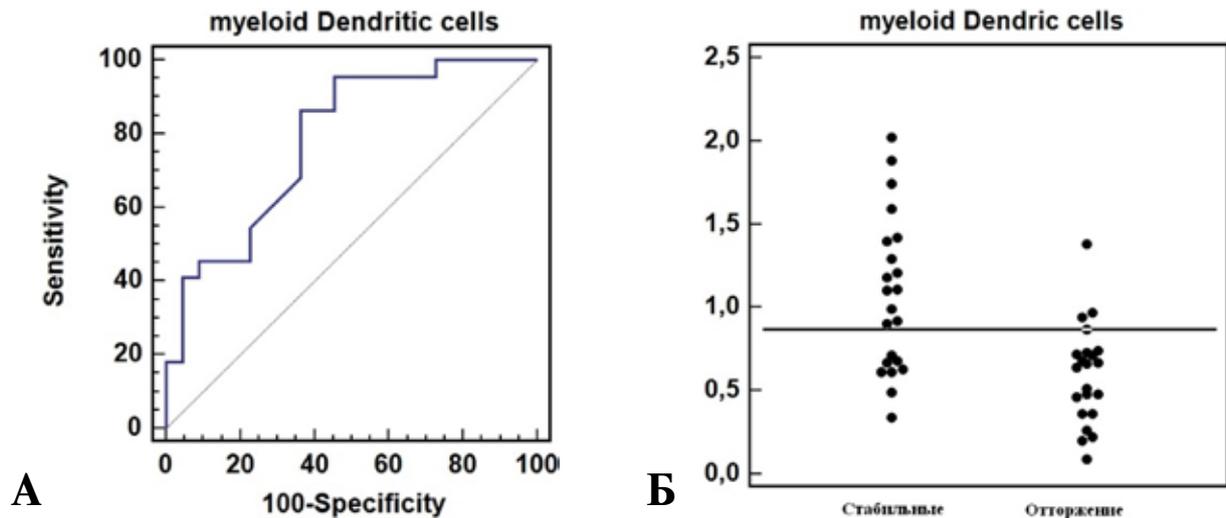


Рис. 3. ROC-кривая для относительной численности миелоидных дендритных клеток (А) и распределение участников групп исследования относительно оптимального порога отсечения мДк (Б).

Таблица 4

Чувствительность и специфичность для наиболее значимых порогов отсечения относительной численности миелоидных дендритных клеток

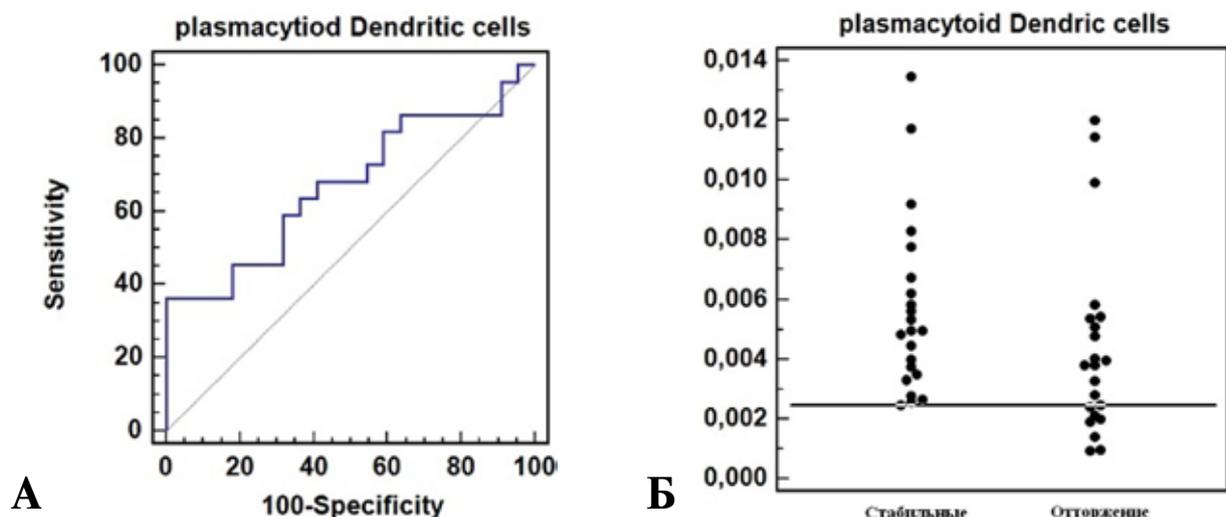
Порог отсечения	Чувствительность (ДИ)	Специфичность (ДИ)
≤0,68	63,64 (40,7-82,8)	68,18 (45,1-86,1)
≤0,71	68,18 (45,1-86,1)	63,64 (40,7-82,8)
≤0,87	86,36 (65,1-96,9)	63,64 (40,7-82,8)
≤0,92	86,36 (65,1-96,9)	54,55 (32,2-75,6)
≤0,97	95,45 (77,1-99,2)	54,55 (32,2-75,6)

Оптимальным порогом отсечения установлено значение $0,0024 \times 10^9$ кл/л, характеризующееся 36,36% (95% ДИ: 17,2-59,3) чувствительностью и 100,00% (95% ДИ: 84,4-100,0) специфичностью. Площадь под рассчитанной ROC-кривой – 0,68 (95% ДИ: 0,514-0,805) при стандартной ошибке оценки 0,082 и уровне значимости $p=0,0357$ (рис. 4). К сожалению, остальные cut-off не обладают удовлетворительными диагности-

ческими характеристиками (данные не представлены). Отношение шансов установления численности пДк ниже $0,0024 \times 10^9$ кл/л при развитии реакции отторжения составляет 21,77 (95% ДИ: 1,16-409,8), $p=0,0397$.

Показатель относительного количества плазмацитоидных дендритных клеток в группах также имел диагностическое значение. Оптимальный порог отсечения для данной

Рис. 4. ROC-кривая для абсолютной численности плазмацитоидных дендритных клеток (А) и распределение участников групп исследования относительно оптимального порога отсечения численности пДк (Б).



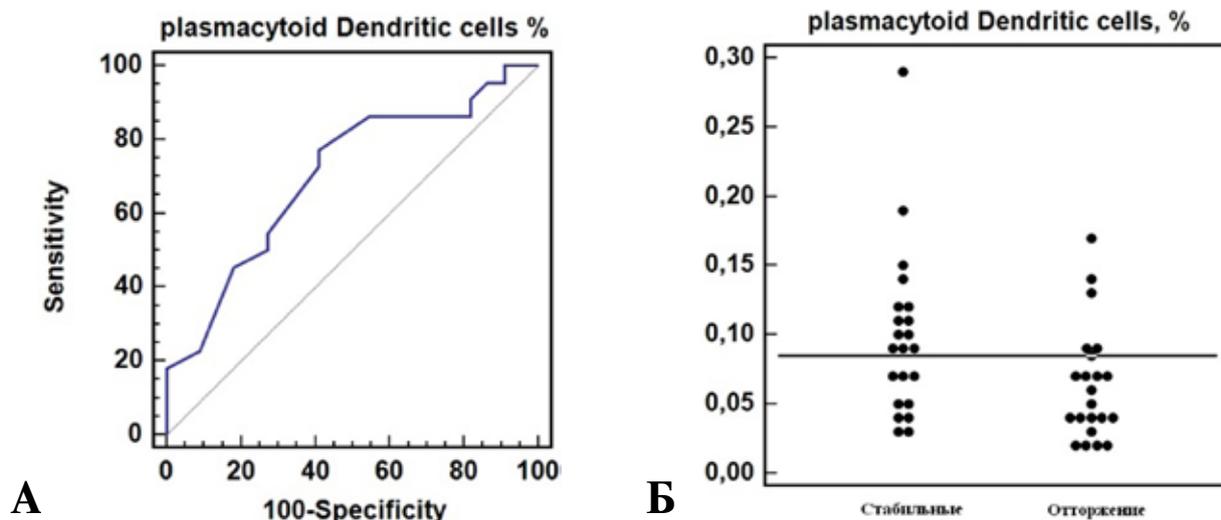


Рис. 5. ROC-кривая для относительной численности плазмацитоидных дендритных клеток (А) и распределение участников групп исследования относительно оптимального порога отсечения численности пДк (Б).

субпопуляции клеток – 0,085% – характеризуется 77,27% (54,6-92,1) чувствительностью и 59,09% (36,4-79,3) специфичностью. Площадь под ROC-кривой составляет 0,7 (95% ДИ: 0,547-0,831), стандартная ошибка оценки 0,079, а уровень значимости – $p=0,01$ (рис. 5). Таблица 5 содержит пять порогов отсечения относительной численности пДк, характеризующихся наибольшей суммой чувствительности и специфичности. Отношение шансов снижения процента пДк ниже порогового значения при развитии реакции отторжения составляет 4,91 (95% ДИ: 1,32-18,2), $p=0,0173$.

Таким образом, результаты исследования продемонстрировали, что развитие позднего клеточного отторжения трансплантата почки сопровождается сдвигами в численности субпопуляций Т-клеток памяти и дендритных клеток периферической крови.

Обсуждение

Проведенный анализ диагностической значимости выявленных различий численности субпопуляций лимфоцитов периферической крови продемонстрировал, что увеличение абсолютной численности эффекторных Т-клеток памяти, снижение относительной и абсолютной

численности как миелоидных, так и плазмацитоидных дендритных клеток являются биомаркерами позднего клеточного отторжения трансплантата почки. Чувствительность биомаркеров варьировала от 36,4% (абсолютная численность плазмацитоидных дендритных клеток) до 86,4% (относительная численность миелоидных дендритных клеток). Специфичность тестируемых биомаркеров также была приемлемой: от 59% (относительная численность плазмацитоидных дендритных клеток) до 100% (абсолютная численность плазмацитоидных дендритных клеток). При этом показатели AUC для каждого биомаркера можно классифицировать как «хорошие»: от 0,68 (абсолютная численность плазмацитоидных дендритных клеток) до 0,78 (относительная численность миелоидных дендритных клеток).

Полученные данные не случайны и объясняются местом эффекторных Т-лимфоцитов и дендритных клеток в иммунном ответе на аллоантигены трансплантированных органов.

Так, эффекторные Т-клетки памяти являются непосредственным деструктивным звеном иммунологической памяти. Данные клетки не требуют ко-стимуляции, обладают низким порогом активации и более выраженными эффекторными способностями. Это приводит к более

Таблица 5

Чувствительность и специфичность для наиболее значимых порогов отсечения относительной численности плазмацитоидных дендритных клеток

Порог отсечения	Чувствительность (95% ДИ)	Специфичность (95% ДИ)
$\leq 0,06$	54,55 (32,2-75,6)	72,73 (49,8-89,2)
$\leq 0,07$	72,73 (49,8-89,2)	59,09 (36,4-79,3)
$\leq 0,085$	77,27 (54,6-92,1)	59,09 (36,4-79,3)
$\leq 0,09$	86,36 (65,1-96,9)	45,45 (24,4-67,8)
$\leq 0,12$	86,36 (65,1-96,9)	18,18 (5,3-40,3)

ранней и более быстрой активации иммунного ответа при повторной экспозиции антигена [8]. В разрезе иммунного ответа к аллоантигенам донора эффекторные Т-клетки памяти связывают с развитием ускоренного острого отторжения почечного аллографта и формированием процессов хронического клеточного отторжения (хронической трансплантационной артериопатии) [9].

Если говорить о другой субпопуляции мононуклеаров периферической крови — дендритных клетках, то достоверное снижение численности данного пула клеток у пациентов с отторжением обусловлено тем, что последние являются «профессиональными» антигенпрезентирующими клетками, основной функцией которых является захват, процессинг и представление антигена на своей мембране в комплексе с молекулами гистосовместимости обоих классов [10]. Этот процесс необходим для распознавания донорского антигена иммунокомпетентными клетками, которые непосредственно отвечают за его элиминацию из организма, прежде всего, Т-лимфоцитами. Однако как захват аллоантигенов, так и их представление требуют миграции дендритных клеток либо в ткани графта, либо во вторичные лимфоидные органы, с чем собственно и может быть связано снижение численности данных клеток в периферической крови [11].

Данные факты позволяют теоретически обосновать корреляцию изменения численности эффекторных Т-клеток памяти и дендритных клеток с развитием и поддержанием клинически значимых деструктивных процессов отторжения трансплантата почки, приводящих к прогрессированию хронической дисфункции аллографта и необходимости возобновления диализотерапии.

Заключение

Результаты исследования продемонстрировали, что численность субпопуляций лимфоцитов периферической крови, а именно эффекторных Т-клеток памяти, миелоидных и плазматоидных дендритных клеток, может являться диагностическим маркером клеточного отторжения трансплантата почки в отдаленный период после операции. Данные биомаркеры характеризуются хорошими показателями чувствительности, специфичности и прогностической ценности теста, что делает их альтернативными средствами ранней, точной, экономически эффективной и, главное, неинвазивной диагностики позднего клеточного отторжения трансплантата почки.

Немаловажной особенностью данных биомаркеров является возможность диагностики субклинической формы отторжения трансплантата почки, что может позволить выявлять иммунологическую дисфункцию на ранних стадиях развития, до повреждения функционального аппарата почечного аллографта.

Финансирование

Работа выполнялась в рамках диссертационного исследования. Финансовой поддержки со стороны компаний-производителей лекарственных препаратов авторы не получали.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

Этические аспекты

Одобрение комитета по этике

Исследование одобрено этическим комитетом Минского научно-практического центра хирургии, трансплантологии и гематологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, Klarenbach S, Gill J. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant.* 2011 Oct;11(10):2093-109. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03686.x
2. Koo EH, Jang HR, Lee JE, Park JB, Kim SJ, Kim DJ, Kim YG, Oh HY, Huh W. The impact of early and late acute rejection on graft survival in renal transplantation. *Kidney Res Clin Pract.* 2015 Sep;34(3):160-64. Published online 2015 Jul 26. doi: 10.1016/j.krcp.2015.06.003
3. Hanssen O, Erpicum P, Lovinfosse P, Meunier P, Weekers L, Tshibanda L, Krzesinski JM, Hustinx R, Jouret F. Non-invasive approaches in the diagnosis of acute rejection in kidney transplant recipients. Part I. In vivo imaging methods. *Clin Kidney J.* 2017 Feb;10(1):97-105. Published online 2016 Jul 28. doi: 10.1093/ckj/sfw062
4. Reschen ME, Mazzella A, Sharples E. A retrospective analysis of the utility and safety of kidney transplant biopsies by nephrology trainees and consultants. *Ann Med Surg (Lond).* 2018 Feb 9;28:6-10. doi: 10.1016/j.amsu.2018.02.001
5. Salvadori M, Tsalouchos A. Biomarkers in renal transplantation: an updated review. *World J Transplant.* 2017 Jun 24;7(3):161-78. doi: 10.5500/wjt.v7.i3.161
6. Woo J, Baumann A, Arguello V. Recent advancements of flow cytometry: new applications in hematology and oncology. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014 Jan;14(1):67-81. doi: 10.1586/14737159.2014.862153
7. Maguire O, Tarjo JD Jr, Shanahan TC, Wallace PK, Minderman H. Flow cytometry and solid organ transplantation: a perfect match. *Immunol Invest.*

2014;43(8):756-74. doi: 10.3109/08820139.2014.910022
8. Borghans J, Ribeiro RM. The maths of memory. *eLife*. 2017;6:e26754. Published online 2017 Apr 28. doi: 10.7554/eLife.26754
9. Benichou G, Gonzalez B, Marino J, Ayasoufi K, Valujskikh A. Role of memory t cells in allograft rejection and tolerance. *Front Immunol*. 2017;8:170. Published online 2017 Feb 28. doi: 10.3389/fimmu.2017.00170
10. Zhou H, Wu L. The development and function of dendritic cell populations and their regulation by miRNAs. *Protein Cell*. 2017 Jul;8(7):501-13. doi: 10.1007/s13238-017-0398-2
11. Zhuang Q, Lakkis FG. Dendritic cells and innate immunity in kidney transplantation. *Kidney Int*. 2015 Apr;87(4):712-18. doi: 10.1038/ki.2014.430

REFERENCES

1. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, Klarenbach S, Gill J. Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant*. 2011 Oct;11(10):2093-109. doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03686.x
2. Koo EH, Jang HR, Lee JE, Park JB, Kim SJ, Kim DJ, Kim YG, Oh HY, Huh W. The impact of early and late acute rejection on graft survival in renal transplantation. *Kidney Res Clin Pract*. 2015 Sep;34(3):160-64. Published online 2015 Jul 26. doi: 10.1016/j.krcp.2015.06.003
3. Hanssen O, Ercicum P, Lovinfosse P, Meunier P, Weekers L, Tshibanda L, Krzesinski JM, Hustinx R, Jouret F. Non-invasive approaches in the diagnosis of acute rejection in kidney transplant recipients.

Адрес для корреспонденции

220013, Республика Беларусь,
г. Минск, ул. П. Бровки, 3, корпус 3,
Белорусская медицинская академия
последипломного образования,
кафедра трансплантологии,
тел.: +375 (33) 312-86-24,
e-mail: doctornosik@gmail.com,
Носик Александр Викторович

Сведения об авторах

Носик Александр Викторович, ассистент кафедры трансплантологии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, врач-хирург отделения трансплантации, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск, Республика Беларусь. <https://orcid.org/0000-0002-3500-0866>
Коротков Сергей Владимирович, к.м.н., доцент, доцент кафедры трансплантологии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, заведующий отделом трансплантологии (трансплантации печени и гепатобилиарной хирургии), Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск, Республика Беларусь. <https://orcid.org/0000-0002-8536-6911>
Смольникова Виктория Владимировна, старший научный сотрудник, научный отдел, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск, Республика Беларусь.

Part I. In vivo imaging methods. *Clin Kidney J*. 2017 Feb;10(1):97-105. Published online 2016 Jul 28. doi: 10.1093/ckj/sfw062
4. Reschen ME, Mazzella A, Sharples E. A retrospective analysis of the utility and safety of kidney transplant biopsies by nephrology trainees and consultants. *Ann Med Surg (Lond)*. 2018 Feb 9;28:6-10. doi: 10.1016/j.amsu.2018.02.001
5. Salvadori M, Tsalouchos A. Biomarkers in renal transplantation: an updated review. *World J Transplant*. 2017 Jun 24;7(3):161-78. doi: 10.5500/wjt.v7.i3.161
6. Woo J, Baumann A, Arguello V. Recent advancements of flow cytometry: new applications in hematology and oncology. *Expert Rev Mol Diagn*. 2014 Jan;14(1):67-81. doi: 10.1586/14737159.2014.862153
7. Maguire O, Tario JD Jr, Shanahan TC, Wallace PK, Minderman H. Flow cytometry and solid organ transplantation: a perfect match. *Immunol Invest*. 2014;43(8):756-74. doi: 10.3109/08820139.2014.910022
8. Borghans J, Ribeiro RM. The maths of memory. *eLife*. 2017;6:e26754. Published online 2017 Apr 28. doi: 10.7554/eLife.26754
9. Benichou G, Gonzalez B, Marino J, Ayasoufi K, Valujskikh A. Role of memory t cells in allograft rejection and tolerance. *Front Immunol*. 2017;8:170. Published online 2017 Feb 28. doi: 10.3389/fimmu.2017.00170
10. Zhou H, Wu L. The development and function of dendritic cell populations and their regulation by miRNAs. *Protein Cell*. 2017 Jul;8(7):501-13. doi: 10.1007/s13238-017-0398-2
11. Zhuang Q, Lakkis FG. Dendritic cells and innate immunity in kidney transplantation. *Kidney Int*. 2015 Apr;87(4):712-18. doi: 10.1038/ki.2014.430

Address for correspondence

220013, The Republic of Belarus,
Minsk, P.Brovko Str., 3, build. 3,
Belarusian Medical Academy of Postgraduate
Education,
Transplantology Department.
Tel. +375 (33) 312-86-24,
e-mail: doctornosik@gmail.com,
Alexander V. Nosik

Information about the authors

Nosik Alexander V., Assistant of the Transplantology Department, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Surgeon of the Transplantation Unit, Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus. <https://orcid.org/0000-0002-3500-0866>
Korotkov Sergey V., PhD, Associate Professor of the Transplantology Department, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Head of the Transplantation Unit (Liver Transplantation and Hepatobiliary Surgery), Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus. <https://orcid.org/0000-0002-8536-6911>
Smolnikova Viktoriya V., Senior Researcher, the Research Department, Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus. <https://orcid.org/0000-0001-5947-8285>

<https://orcid.org/0000-0001-5947-8285>

Гриневич Виктория Юрьевна, врач лабораторной диагностики, клиничко-диагностическая лаборатория СТКМ, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск, Республика Беларусь.

<https://orcid.org/0000-0002-4505-4884>

Кривенко Светлана Ивановна, д.м.н., доцент, заместитель директора по науке, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск, Республика Беларусь.

<https://orcid.org/0000-0002-6813-4465>

Дмитриева Маргарита Владимировна, врач-патологоанатом, Городское клиническое патолого-анатомическое бюро, г. Минск. Республика Беларусь.

<https://orcid.org/0000-0002-2958-9424>

Пикирениа Иван Иванович, к.м.н., доцент, заведующий кафедрой трансплантологии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, врач-хирург хирургического отделения, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск, Республика Беларусь.

<https://orcid.org/0000-0001-8907-4601>

Долголикowa Анна Александровна, к.м.н., врач-нефролог нефрологического отделения, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск, Республика Беларусь.

<https://orcid.org/0000-0003-3576-2235>

Калачик Олег Валентинович, д.м.н., доцент, доцент кафедры трансплантологии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, заместитель директора по медицинской части, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, руководитель республиканского центра нефрологии, почечно-заместительной терапии и трансплантации почки, г. Минск, Республика Беларусь.

<https://orcid.org/0000-0002-8993-0292>

Щерба Алексей Евгеньевич, д.м.н., доцент, доцент кафедры трансплантологии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, заместитель директора по хирургии, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск, Республика Беларусь.

<https://orcid.org/0000-0003-0569-6150>

Руммо Олег Олегович, д.м.н., профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, профессор кафедры трансплантологии, Белорусская медицинская академия последипломного образования, директор, Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии, г. Минск, Республика Беларусь.

<https://orcid.org/0000-0001-7023-4767>

Hrynevich Viktoryia Yu., Physician of Laboratory Diagnostics, Clinical-Diagnostic Laboratory, Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus.

<https://orcid.org/0000-0002-4505-4884>

Krivenko Svetlana I., MD, Associate Professor, Deputy Director for Science, Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus.

<https://orcid.org/0000-0002-6813-4465>

Dmitrieva Margarita V., Pathologist, City Clinical Pathoanatomic Bureau, Minsk, Republic of Belarus.

<https://orcid.org/0000-0002-2958-9424>

Pikirenia Ivan I., PhD, Associate Professor, Head of the Transplantology Department, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Surgeon of the Surgery Unit, Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus.

<https://orcid.org/0000-0001-8907-4601>

Dolgolikova Anna A., PhD, Nephrologist of the Nephrology Unit, Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus.

<https://orcid.org/0000-0003-3576-2235>

Kalachik Oleg V., MD, Associate Professor of the Transplantology Department, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Deputy Director for the Medical Affairs, Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Head of the Republican Center for Nephrology, Renal Replacement Therapy and Kidney Transplantation, Minsk, Republic of Belarus.

<https://orcid.org/0000-0002-8993-0292>

Shcherba Aliaksei E., MD, Associate Professor of the Transplantology Department, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Deputy Director for Surgery, Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus.

<https://orcid.org/0000-0003-0569-6150>

Rummo Oleg O., MD, Professor, Corresponding Member of the National Academy of Sciences of Belarus, Professor of the Transplantology Department, Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Director, Minsk Scientific and Practical Center of Surgery, Transplantology and Hematology, Minsk, Republic of Belarus.

<https://orcid.org/0000-0001-7023-4767>

Информация о статье

Получена 28 января 2019 г.

Принята в печать 1 июля 2019 г.

Доступна на сайте 1 сентября 2019 г.

Article history

Arrived: 28 January 2018

Accepted for publication: 1 July 2019

Available online: 1 September 2019