

## ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 616.61-089.843-078.33

Траилин А. В., Плетень М. В., Никоненко А. С., Ефименко Н. Ф., Остапенко Т. И.

**ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ БЕТА-2-МИКРОГЛОБУЛИНА, ЭНЗИМОВ, ИНТЕРЛЕЙКИНОВ СЫВОРОТКИ И МОЧИ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ДИСФУНКЦИИ ПОЧЕЧНОГО АЛЛОТРАНСПЛАНТАТА**

ГЗ «Запорожская медицинская академия последипломного образования» Министерства здравоохранения Украины», 69096, Украина, г. Запорожье

Цель исследования – дополнительная характеристика хронической дисфункции почечного аллотрансплантата (ПАТ) с помощью биомаркеров сыворотки и мочи: энзимов (аланинаминотрансферазы – АЛТ, аспаратаминотрансферазы – АСТ, гамма-глутамилтрансферазы – ГГТ, щелочной фосфатазы – ЩФ, N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы – НАГ), интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10) и бета-2-микροглобулина (β<sub>2</sub>-МГ). Для хронической дисфункции ПАТ характерно повышение концентрации в сыворотке ИЛ-10 и β<sub>2</sub>-МГ, а в моче – увеличение концентрации β<sub>2</sub>-МГ, ИЛ-2 и ИЛ-8 и повышение активности НАГ, ЩФ, АСТ, ГГТ по сравнению с пациентами с удовлетворительной функцией ПАТ. При мультивариантном логистическом регрессионном анализе только активность НАГ в моче была достоверно независимо связана с хронической дисфункцией ПАТ. Мы полагаем, что увеличение концентрации β<sub>2</sub>-МГ в сыворотке свидетельствует о гломерулярной, а в моче – о тубулярной дисфункции ПАТ. Энзимурия указывает на продолжающееся повреждение эпителия проксимальных канальцев нефрона. При классификации пациентов с удовлетворительной функцией и хронической дисфункцией ПАТ наивысшие показатели площади под ROC-кривыми имели концентрация β<sub>2</sub>-МГ в сыворотке (0,858 ± 0,061) и моче (0,733 ± 0,079) и активность НАГ в моче (0,701 ± 0,061). Для уточнения диагноза хронической дисфункции ПАТ наиболее полезными (отношение правдоподобия положительного результата 10 и 11 соответственно) являются тесты на β<sub>2</sub>-МГ сыворотки (более 8,55 мкг/мл) и НАГ/креатинин мочи (более 34 нмоль/(с·л)/ммоль/л). Наши находки требуют дальнейшей валидации и подтверждения путем морфологического исследования биоптата ПАТ.

Ключевые слова: почечный аллотрансплантат; хроническая дисфункция; биомаркеры сыворотки и мочи; бета-2-микροглобулин; энзимы; интерлейкины.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика: 2015; 60(11): 31–37.

Trailin A.V., Pleten M.V., Nikonenko A.S., Efimenko N.F., Ostapenko T.I.

## THE DIAGNOSTIC VALUE OF BETA-2-MICROGLOBULIN, ENZYMES, INTERLEUKINS OF BLOOD AND URINE UNDER CHRONIC DYSFUNCTION OF RENAL ALLO-TRANSPLANT

The Zaporozhyskaia medical academy of Minzdrav of Ukraine, 69120 Zaporozhye, Ukraine

The study was organized to provide additional characteristic of chronic dysfunction of renal allo-transplant using such biomarkers of serum and urine as enzymes (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyltransferase, alkaline phosphatase, N-acetyl-β-D-glucosaminidase, interleukins (IL-2, IL-8, IL-10), beta-2-microglobulin. The chronic dysfunction of renal allo-transplant is characterized by increasing of concentration of IL-10 and beta-2-microglobulin in serum and increasing of concentration of beta-2-microglobulin, IL-2, IL-8 in urine and increasing of activity of N-acetyl-β-D-glucosaminidase, alkaline phosphatase, aspartate aminotransferase, gamma-glutamyltransferase as compared with patients with satisfactory function of renal allo-transplant. The multivariate logistic regression analysis established that only activity of N-acetyl-β-D-glucosaminidase in urine was reliably independently related to chronic dysfunction of renal allo-transplant. It is assumed that increasing of concentration of beta-2-microglobulin in serum testifies glomerular dysfunction and in urine - tubular dysfunction of renal allo-transplant. The enzymeuria indicates continuing damage of epithelium of proximal tubules of nephron.

The classification of patients with satisfactory function and chronic dysfunction of renal allo-transplant established that the highest indicators of square under ROC-curves had concentration of beta-2-microglobulin in serum (0.858±0.061) and urine (0.733±0.079) and activity of N-acetyl-β-D-glucosaminidase in urine (0.701±0.061). To specify diagnosis of chronic dysfunction of renal allo-transplant the most useful (ratio of likelihood of positive result 10 and 11 correspondingly) are tests of beta-2-microglobulin in serum (more than 8.55 mkg/ml) and N-acetyl-β-D-glucosaminidase/creatinine in urine (more than 34 nmol/(sl)/mmol/l). These discoveries require further validation and confirmation by implementation of morphological analysis of biopstat of renal allo-transplant.

Keywords: renal allo-transplant; chronic dysfunction; biomarker of blood and urine; beta-2-microglobulin; enzymes; interleukins

Citation: Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika. 2015; 60 (11): 31–37. (in Russ.)

Для корреспонденции: Траилин Андрей Вячеславович,  
e-mail: andrei\_trailin@ukr.net

For correspondence: Trailin A.V., e-mail: andrei\_trailin@ukr.net

Введение. Аллотрансплантация почки является наиболее эффективным методом лечения больных в терминальной стадии хронической болезни почек. Серьезной проблемой, определяющей продолжительность и качество жизни па-

циентов, остается хроническая дисфункция почечного аллотрансплантата (ПАТ) [1, 2]. Различают специфические и неспецифические варианты хронической дисфункции ПАТ, которые протекают с преимущественным поражением клубочков или канальцев нефрона [2], требуют специфической терапии и отличаются прогнозом. Помимо дифференциальной диагностики вариантов дисфункции ПАТ, необходимо отличать активную (потенциально курабельную) фазу патологических процессов в ПАТ от неактивной [3].

Диагностика дисфункции ПАТ может быть инвазивной [3] и/или неинвазивной [4, 5], при этом каждый из подходов имеет свои преимущества и недостатки. Общепринятый неинвазивный индикатор функции ПАТ – концентрация креатинина в сыворотке является поздним и относительно малочувствительным маркером дисфункции [5] и не указывает на активность патологического процесса. Неинвазивными биохимическими маркерами повреждения нативных почек и ПАТ могут быть энзимы сыворотки крови и мочи [6, 7], низкомолекулярные протеины [8], цитокины [9, 10], а также специфические продуцируемые в почках молекулы [11, 12].

При патологии ПАТ вследствие патологической клубочковой фильтрации и недостаточной реабсорбции энзимы могут поступать в мочу; также может меняться активность энзимов сыворотки [13]. Остается до конца не выясненным вопрос о том, концентрация каких энзимов в сыворотке или моче может дать точную информацию о наличии патологического процесса в почке, его локализации и степени активности.

Интерлейкины являются важными медиаторами патологических процессов в ПАТ [4, 9, 10, 14]. Было установлено, что концентрации интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10) в сыворотке крови и моче отражают функциональную активность различных типов иммунокомпетентных клеток, тяжесть воспалительного процесса в ПАТ и могут иметь диагностическое значение [4, 12, 14]. Тем не менее на сегодняшний день отсутствует единое мнение относительно того, где лучше определять концентрацию интерлейкинов при дисфункции ПАТ – в периферической крови или моче [14, 15].

Одним из методов лабораторной диагностики почечной функции является определение концентрации в крови и экскреции с мочой низкомолекулярных протеинов, таких как бета-2-микроглобулин ( $\beta_2$ -МГ) [11, 16]. Определение содержания  $\beta_2$ -МГ в сыворотке крови и моче может отражать соответственно степень повреждения базальной мембраны клубочков и эпителия проксимальных канальцев [13]. По некоторым оценкам, измерение концентрации  $\beta_2$ -МГ сыворотки крови более точно, чем скорость клубочковой фильтрации (СКФ) особенно при ее низких значениях, позволяет оценить функцию почек [13, 16].

Однако большинство исследований неинвазивных биомаркеров дисфункции ПАТ были ограничены ранним послеоперационным периодом и сфокусированы на диагностике острого отторжения [6, 10]. Только в единичных публикациях изучалось диагностическое значение изменения активности энзимов [6, 17], концентраций интерлейкинов [4, 9] и  $\beta_2$ -МГ [11, 16] в сыворотке крови и моче у пациентов с хронической дисфункцией ПАТ. Недостаточно изучена диагностическая ценность комбинации различных биохимических показателей для оценки состояния ПАТ [6, 11]. Приведенные в литературе результаты исследований достаточно противоречивы [5, 15], а многие используемые методы (например, молекулярно-генетические) дорогостоящи [10, 18], что затрудняет их рутинное применение.

Целью исследования была дополнительная характеристика хронической дисфункции ПАТ путем использования неинвазивных биомаркеров сыворотки и мочи: энзимов (аланинминотрансферазы (АЛТ), аспаргатаминотрансферазы (АСТ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ), щелочной фосфатазы (ЩФ), N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминидазы (НАГ)), интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10) и  $\beta_2$ -МГ.

*Материалы и методы.* В данное ретроспективное исследование включены 79 пациентов в возрасте от 16 до 59 лет (47 мужчин и 32 женщины), которым в период с 1997 по 2011 г. выполнена трансплантация почки в Запорожском межрегиональном центре трансплантации. Все реципиенты ПАТ, включенные в исследование, получали трехкомпонентную иммуносупрессивную терапию (ингибиторы кальциневрина – такролимус или циклоспорин, микофенолата мофетил, глюкокортикоиды).

Материалом для исследования послужили сыворотка крови, моча, истории болезни и амбулаторные карты пациентов.

Пациенты были разделены на 2 группы: 1-ю, включающую пациентов со стабильно удовлетворительной функцией ПАТ, и 2-ю, состоящую из пациентов с его хронической дисфункцией. Хроническая дисфункция ПАТ [1] клинически характеризовалась прогрессирующим ухудшением функции трансплантата, что в большинстве случаев ассоциировалось с протеинурией и артериальной гипертензией (табл. 1). Лабораторным критерием принадлежности пациентов к 1-й или 2-й группе был выбран медианный уровень креатинина в сыворотке крови 150 мкмоль/л. В 1-ю группу вошли 40 пациентов с уровнем креатинина 150 мкмоль/л и менее, во 2-ю – 39 пациентов с уровнем креатинина 150 мкмоль/л и более (см. табл. 1). Уровень креатинина крови отлично коррелировал ( $R = -0,85$ ;  $p < 0,05$ ) с СКФ, рассчитанной по формуле Кокрофта–Голта. Концентрацию креатинина и мочевины в крови, протеинурию и плотность мочи определяли в лаборатории Запорожской областной клинической больницы в рамках стандартного протокола обследования пациентов.

Образцы сыворотки для определения концентрации интерлейкинов,  $\beta_2$ -МГ и активности энзимов получали после центрифугирования крови, взятой утром натощак. Сыворотку для определения концентрации интерлейкинов и  $\beta_2$ -МГ хранили при  $-20^\circ\text{C}$ , а активность энзимов определяли в день забора биоматериала.

Мочу для исследования собирали в утренние часы (с 7 до 9), центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. Образцы мочи для определения концентрации интерлейкинов и  $\beta_2$ -МГ хранили при  $-20^\circ\text{C}$ , а активность энзимов в моче определяли в день сбора [13, 19].

Количественное определение ИЛ-2, ИЛ-8, ИЛ-10 и  $\beta_2$ -МГ в пробах сыворотки и мочи проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа. Для определения цитокинов использовали наборы реагентов производства ЗАО Вектор-Бест (Россия), а  $\beta_2$ -МГ – наборы реагентов фирмы Orgentec GmbH (Германия).

Активность АЛТ, АСТ, ГГТ и ЩФ в пробах сыворотки и мочи пациентов оценивали биохимическим методом с использованием стандартных наборов реактивов фирмы Филисит-Диагностика, абсорбцию измеряли на спектрофотометре фирмы APEL (Япония).

Уровни НАГ в сыворотке крови не определяли, так как, по имеющимся данным литературы, НАГ быстро подвергается разрушению и ее активность в крови очень низкая [7, 19]. Активность НАГ в образцах мочи определяли колориметрическим методом А. А. Покровского и соавт. (1971), адаптированным Л. Я. Мигаль и соавт. [19], по количеству образовавшегося в ходе реакции p-нитрофенола из раствора субстрата 4-нитрофенил-N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозаминида производства Sigma-Aldrich (Германия).

Определенные концентрации интерлейкинов,  $\beta_2$ -МГ и активность энзимов в моче пересчитывали на уровень креатинина в той же порции мочи [6, 10, 17]. Концентрацию креатинина в моче определяли методом Яффе–Поппера с пикриновой кислотой с использованием стандартного набора реактивов фирмы Филисит-Диагностика, абсорбцию измеряли на спектрофотометре фирмы APEL (Япония).

Нормально распределенные данные выражали средним значением ( $M$ ) и стандартным отклонением ( $SD$ ); для сравнения результатов использовали  $t$ -тест Стьюдента, а для изучения взаимосвязи между ними – коэффициент корреляции

Таблица 1

Клинические данные пациентов ( $M \pm SD$ )

Параметр	Удовлетворительная функция ПАТ	Хроническая дисфункция ПАТ	<i>p</i>
Возраст (лет)	37 ± 12	40 ± 11	0,370
Срок после трансплантации (месяцев)	69,1 ± 43,3	102,5 ± 58,7	0,062
Пол:			
мужчины	21 (52,5%)	26 (66,6%)	0,190
женщины	19 (47,5%)	13 (33,3%)	0,190
Ингибитор кальциневрина:			
циклоспорин А	34 (85%)	29 (74,4%)	0,230
такролимус	6 (15%)	10 (25,6%)	0,230
Креатинин крови, мкмоль/л	110,5 (97,5–130,5)*	195 (174–234)	0,001
Мочевина крови, ммоль/л	6,8 (5,8–8,1)	11,5 (10,1–14)	0,001
СКФ, мл/мин	65,7 ± 16,7	35,5 ± 10,7	0,007
Протеинурия/Кр, г/л/ммоль/л	0,002 (0,000–0,006)	0,011 (0,005–0,022)	0,001
Плотность мочи	1012 (1009–1015)	1005 (1003–1010)	0,001
Артериальное давление:			
систолическое, мм. рт. ст.	130 (120–140)	150 (140–160)	0,001
диастолическое, в мм. рт. ст.	90 (80–95)	100 (90–100)	0,001

Примечание.\* – медиана (межквартильный размах) здесь и в табл. 2.

Пирсона (*r*). Данные, распределение которых отличалось от нормального, выражали в виде медианы и межквартильного размаха; для оценки достоверности различий между группами использовали *U*-тест Манна–Уитни, а для изучения взаимосвязи между ними рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена (*R*).

Для расчета пороговых уровней активности энзимов, концентрации интерлейкинов,  $\beta_2$ -МГ, их диагностической чувствительности и специфичности применяли анализ кривых операционных характеристик (ROC-анализ). Вычисляли площадь под кривой, ее стандартную ошибку и 95% доверительный интервал. Величину показателя, при котором максимальное количество пациентов было правильно классифицировано, использовали как пороговый уровень для позитивного и негативного результата теста. Концентрацию биомаркеров, служащую пороговым уровнем для принятия решения, использовали для расчета показателей диагностической точности теста [20].

Для предсказания вероятности наличия у пациента хронической дисфункции ПАТ на основании концентрации биомаркеров применяли метод моновариантной и мультивариантной логистической регрессии. Статистическую обработку результатов выполняли с помощью программ Statistica 7.0 (StatSoft Inc., США) и SPSS 15.0 (IBM, США). Границей статистической значимости считали  $p < 0,05$ .

Все исследования выполнены с соблюдением положений Конвенции Совета Европы о правах человека и биомедицине.

**Результаты и обсуждение.** Группы реципиентов статистически достоверно не различались по полу, возрасту, сроку

после трансплантации, типу иммуносупрессии (см. табл. 1). В то же время различия между основными лабораторными показателями функции ПАТ были высокодостоверными (см. табл. 1), что подтверждает правильность разделения пациентов на группы.

Более того, креатинин крови несколько лучше, чем СКФ, коррелировал с другими показателями функции ПАТ: кон-

Таблица 2

Активность энзимов, концентрации интерлейкинов и  $\beta_2$ -МГ в сыворотке крови и моче реципиентов ПАТ

Биомаркер	Удовлетворительная функция ПАТ	Хроническая дисфункция ПАТ	<i>p</i>
АСТ, мкмоль/(ч·мл)	0,40 (0,20–0,40)	0,30 (0,20–0,50)	0,930
АСТ/Кр, мкмоль/(ч·мл)/ммоль/л**	0,015 ± 0,022*	0,030 ± 0,030	0,042
АЛТ, мкмоль/(ч·мл)	0,40 (0,30–0,50)	0,40 (0,30–0,50)	0,941
АЛТ/Кр, мкмоль/(ч·мл)/ммоль/л	0,02 (0,01–0,03)	0,01 (0,00–0,020)	0,684
ГГТ, ммоль/(ч·л)	0,90 (0,70–1,40)	1,20 (0,90–1,50)	0,375
ГГТ/Кр, ммоль/(ч·л)/ммоль/л	0,06 ± 0,04	0,11 ± 0,09	0,028
ЩФ, нмоль/(с·л)	1743 (1328–2656)	2241 (954–3569)	0,964
ЩФ/Кр, нмоль/(с·л)/ммоль/л	91,6 (51,5–158,2)	127,9 (72,0–250,1)	0,043
НАГ/Кр, нмоль/(с·л)/ммоль/л	16,57 ± 13,17	29,75 ± 25,00	0,014
ИЛ-2, пг/мл	0,20 (0,17–1,28)	0,21 (0,18–2,13)	0,102
ИЛ-2/Кр, пг/мл/ммоль/л	0,18 (0,13–0,21)	0,36 (0,13–1,16)	0,042
ИЛ-8, пг/мл	2,47 (1,67–4,39)	2,57 (2,10–4,95)	0,701
ИЛ-8/Кр, пг/мл/ммоль/л	0,33 (0,10–0,60)	0,76 (0,34–3,31)	0,024
ИЛ-10, пг/мл	2,85 (1,90–3,67)	3,73 (2,58–4,62)	0,013
ИЛ-10/Кр, пг/мл/ммоль/л	0,07 (0,07–0,10)	0,09 (0,07–0,22)	0,291
$\beta_2$ -МГ, мкг/мл	6,48 (5,36–7,76)	8,68 (7,89–11,73)	0,013
$\beta_2$ -МГ/Кр, мкг/мл/ммоль/л	0,025 (0,006–0,120)	0,120 (0,043–0,194)	0,012

Примечание. \* –  $M \pm SD$ ; \*\* – активность энзимов в моче, нормализованная на уровень креатинина.

центрацией мочевины:  $R = 0,84$  против  $R = -0,77$  и протеинурией:  $R = 0,62$  против  $R = -0,55$  (во всех случаях  $p < 0,05$ ).

Активность энзимов в сыворотке крови пациентов не различалась в группах сравнения (табл. 2) и не коррелировала с показателями функции ПАТ (данные не приведены), однако активность ГГТ, ЩФ, НАГ и АСТ в моче была достоверно выше у пациентов с хронической дисфункцией ПАТ. Не выявлено взаимосвязи между активностью всех энзимов в сыворотке крови и моче ( $p > 0,05$ ). Это подтверждают данные литературы о почечном происхождении изоформ исследуемых энзимов в моче [7, 17, 19] и свидетельствует о нецелесообразности исследования энзимов в сыворотке при мониторинге пациентов с хронической дисфункцией ПАТ.

Достоверное повышение экскреции с мочой таких энзимов, как ГГТ и ЩФ, по-видимому, связано с повреждением щеточной каемки эпителия проксимальных канальцев почки [7, 13]. Увеличение активности в моче таких внутриклеточных энзимов, как НАГ и АСТ, может указывать на более глубокое повреждение внутриклеточных мембран эпителиоцитов [7, 17, 19] и выход в мочу содержимого митохондрий и лизосом.

Отмечена взаимная корреляция активности большинства энзимов в моче. Обращало на себя внимание, что активность НАГ коррелировала со всем спектром исследуемых ферментов в моче: слабо с АСТ ( $R = 0,47; p < 0,05$ ), АЛТ ( $R = 0,56; p < 0,05$ ) и ГГТ ( $R = 0,56; p < 0,05$ ) и умеренно с ЩФ ( $R = 0,67; p < 0,05$ ), что свидетельствует об активной стадии процессов повреждения ПАТ, а именно о глубоком повреждении эпителия проксимальных канальцев почки вплоть до острого канальцевого некроза [17].

Как следует из табл. 2, сывороточная концентрация ИЛ-2 достоверно не различалась в группах сравнения. Однако было обнаружено повышение концентрации ИЛ-2 в моче в группе пациентов с дисфункцией ПАТ, что может свидетельствовать о ее иммунологических причинах у отдельных пациентов, в частности о позднем остром Т-клеточно-опосредованном тубулоинтерстициальном отторжении [4, 10]. При этом типе отторжения сенсibilизированные Т-хелперы 1-го типа активируются при встрече с аллоантигенами донорской почки, инфильтрируют канальцы и/или клубочки и секретируют ИЛ-2 в мочу на всем протяжении нефрона [14].

Концентрация ИЛ-10 в сыворотке крови у пациентов с хронической дисфункцией ПАТ была достоверно выше, чем в группе сравнения, тогда как его концентрации в моче статистически достоверно не различались. Известно, что секреция ИЛ-10 осуществляется Т-хелперами 2-го типа преимущественно в лимфоидной ткани. Повышение секреции ИЛ-10 приводит к усилению пролиферации В-лимфоцитов и способствует антителообразованию [4, 9, 14]. Поэтому по-

вышение сывороточной концентрации ИЛ-10 может свидетельствовать об антителоопосредованном отторжении ПАТ – острым либо хроническим.

Концентрации ИЛ-8 в сыворотке крови не различались между группами обследованных нами пациентов, тогда как экскреция ИЛ-8 с мочой была достоверно выше в группе пациентов с признаками дисфункции ПАТ. ИЛ-8 синтезируется моноцитами/макрофагами, лимфоцитами, фибробластами, эпителиальными и эндотелиальными клетками под воздействием бактериальных эндотоксинов и других цитокинов [21]. Поэтому повышение концентрации ИЛ-8 в моче реципиентов может свидетельствовать о локальной продукции этого цитокина в почках при воспалительных процессах бактериальной или вирусной этиологии.

Отмечено отсутствие связи между концентрациями цитокинов в сыворотке крови пациентов ( $p > 0,05$ ). Наблюдалась слабая корреляция между концентрациями ИЛ-2 и ИЛ-8 в моче пациентов ( $R = 0,49; p < 0,05$ ), что может свидетельствовать о сочетании у одного пациента острого Т-клеточно-опосредованного отторжения и пиелонефрита, взаимоподдерживающих друг друга. Обращал на себя внимание тот факт, что концентрация каждого из интерлейкинов в моче не зависела от его концентрации в крови ( $p > 0,05$ ). Это подтверждает нашу гипотезу о локальной почечной продукции ИЛ-2 и ИЛ-8 и внепочечном источнике ИЛ-10 в сыворотке крови, что согласуется с результатами работ других исследовательских групп [4, 9].

В группе пациентов с хронической дисфункцией ПАТ концентрация  $\beta_2$ -МГ была достоверно выше как в сыворотке крови, так и в моче. Концентрация  $\beta_2$ -МГ в сыворотке слабо, но достоверно коррелировала с концентрацией креатинина ( $R = 0,51; p < 0,05$ ) и мочевины ( $R = 0,53; p < 0,05$ ), с СКФ ( $R = -0,44; p < 0,05$ ), протеинурией ( $R = 0,50; p < 0,05$ ) и плотностью мочи ( $R = -0,41; p < 0,05$ ), что позволяет связать ее увеличение с гломерулярной патологией ПАТ [8], при которой в первую очередь страдает процесс фильтрации. Вместе с тем очень слабая корреляция между  $\beta_2$ -МГ и креатинином (хотя их коэффициенты фильтрации близки к 1) дает основание считать, что еще одной причиной увеличения концентрации  $\beta_2$ -МГ в крови пациентов с хронической дисфункцией ПАТ стало усиление его внепочечного синтеза, ранее обнаруженное другими авторами [13, 16]. После трансплантации почки подъем сывороточной концентрации  $\beta_2$ -МГ может служить маркером острого отторжения, ишемического повреждения ПАТ, цитомегаловирусной инфекции, лимфопролиферативного заболевания [16]. Корреляционный анализ показал наличие зависимости средней силы между концентрациями  $\beta_2$ -МГ и ИЛ-10 в сыворотке крови ( $R = 0,56; p < 0,05$ ). Учитывая данные литературы о секреции  $\beta_2$ -МГ и ИЛ-10 лимфоцитами

Таблица 3

**Предсказание вероятности хронической дисфункции ПАТ на основании концентрации биомаркеров с помощью логистической регрессии**

Биомаркер	Моновариантный анализ			Мультивариантный анализ		
	ОШ	95% доверительный интервал	<i>p</i>	ОШ	95% доверительный интервал	<i>p</i>
НАГ/Кр, нмоль/(с·л)/ммоль/л	1,26	1,07–1,49	0,006	4,13	1,21–14,09	0,023
ЩФ/Кр, нмоль/(с·л)/ммоль/л	1,13	1,01–1,26	0,040	0,83	0,53–1,29	0,399
АСТ/Кр, мкмоль/(ч·мл)/ммоль/л	1,53	0,50–4,71	0,460	-	-	-
ГГТ/Кр, ммоль/(ч·л)/ммоль/л	1,11	0,76–1,61	0,580	-	-	-
ИЛ-8/Кр, пг/мл/ммоль/л	1,13	0,89–1,44	0,290	-	-	-
ИЛ-10, пг/мл	1,63	1,01–2,26	0,040	7,68	0,49–19,67	0,146
ИЛ-2/Кр, пг/мл/ммоль/л	0,63	0,22–1,83	0,052	-	-	-
$\beta_2$ -МГ, мкг/мл	1,99	1,20–3,31	0,006	1,38	0,68–2,79	0,373
$\beta_2$ -МГ/Кр, мкг/мл/ммоль/л	1,10	1,01–1,19	0,026	1,00	0,74–1,36	1,000

Примечание. ОШ – отношение шансов.

Таблица 4

## Результаты ROC-анализа

Биомаркер	Площадь под кривой	95% доверительный интервал
ГГТ/Кр, ммоль/(ч·л)/ммоль/л	0,546 ± 0,079*	0,392–0,701
АСТ/Кр, мкмоль/(ч·мл) / ммоль/л	0,636 ± 0,075	0,490–0,783
ЩФ/Кр, нмоль/(с·л)/ммоль/л	0,654 ± 0,069**	0,519–0,789
НАГ/Кр, нмоль/(с·л)/ммоль/л	0,701 ± 0,061**	0,581–0,821
ИЛ-2/Кр, пг/мл/ммоль/л	0,643 ± 0,104	0,438–0,848
ИЛ-8/Кр, пг/мл/ммоль/л	0,627 ± 0,103	0,425–0,830
ИЛ-10, пг/мл	0,684 ± 0,073**	0,573–0,823
$\beta_2$ -МГ, мкг/мл	0,858 ± 0,061**	0,738–0,977
$\beta_2$ -МГ/Кр, мкг/мл/ммоль/л	0,733 ± 0,079**	0,577–0,888

Примечание. \* – площадь под кривой ± стандартная ошибка; \*\* – площадь под кривой достоверно больше 0,5.

в периферической крови, можно предположить, что причиной дисфункции ПАТ в данном случае является хроническое антилеопосредованное отторжение.

Причиной увеличения содержания  $\beta_2$ -МГ в моче может быть как гломерулярная патология, так и повреждение почечных канальцев при остром Т-клеточно-опосредованном отторжении [22], остром бактериальном [23] или токсическом нефрите [16], хронической трансплантационной нефропатии [8]. Концентрация  $\beta_2$ -МГ в моче слабо коррелировала с его концентрацией в сыворотке крови ( $R = 0,37$ ;  $p < 0,05$ ). В то же время в моче концентрация  $\beta_2$ -МГ коррелировала с концентрациями ИЛ-8 ( $R = 0,45$ ;  $p < 0,05$ ), ИЛ-2 ( $R = 0,72$ ;  $p < 0,05$ ), НАГ ( $R = 0,62$ ;  $p < 0,05$ ), АСТ ( $R = 0,44$ ;  $p < 0,05$ ) и ЩФ ( $R = 0,49$ ;  $p < 0,05$ ), что характерно для повреждения проксимальных канальцев аллотрансплантата, при котором в мочу поступают внутриклеточные энзимы и локально продуцируемые интерлейкины и одновременно страдает реабсорбция. Эти наблюдения свидетельствуют о том, что причиной увеличения концентрации  $\beta_2$ -МГ в моче прежде всего является почечная тубулоинтерстициальная патология.

Таким образом, концентрации ИЛ-2, ИЛ-8,  $\beta_2$ -МГ, активность НАГ, ЩФ, ГГТ, АСТ в моче, концентрации  $\beta_2$ -МГ и ИЛ-10 в сыворотке крови позволяют дифференцировать пациентов с хронической дисфункцией и удовлетворительной функцией ПАТ. Для проверки предположения, что уровни биомаркеров линейно связаны с шансом попадания пациента в группу хронической дисфункции, мы использовали модель бинарной логистической регрессии. Как коварианты использовались только те биомаркеры, концентрации/активности которых достоверно различались между группами (табл. 3). Моновариантный анализ позволил установить, что с риском развития хронической дисфункции ПАТ достоверно связаны активность НАГ и ЩФ в моче, концентрация ИЛ-10 в сыворотке крови и концентрация  $\beta_2$ -МГ в сыворотке крови и моче. Эти биомаркеры были включены в мультивариантную модель. При прямой пошаговой регрессии только активность НАГ в моче продемонстрировала достоверную независимую связь с хронической дисфункцией ПАТ.

Полученные результаты подтверждают данные литературы о НАГ как о чувствитель-

ном маркере канальцевых дисфункций [6, 7, 17, 23]. Их анализ свидетельствует, что только глубокие необратимые изменения эпителиоцитов почечных канальцев, вызванные повреждением лизосом, проявляются повышением уровня креатинина сыворотки, тогда как повреждения других клеточных структур обратимы либо могут быть скомпенсированы. Кроме того, высокая активность НАГ в моче указывает на продолжающееся острое повреждение канальцевого эпителия и относительную сохранность паренхимы ПАТ, поскольку атрофия канальцев ассоциируется с гипоферментурией [17].

Предикторная точность модели на индивидуальном уровне была оценена с помощью ROC-анализа (табл. 4), при этом оценивалось значение только тех биомаркеров, концентрации которых достоверно различались между группами. Величины площади под ROC-кривыми (см. табл. 4) свидетельствовали, что отличную (более 0,8) и хорошую (более 0,7) дискриминирующую мощность проявляет концентрация  $\beta_2$ -МГ в сыворотке и моче и активность НАГ в моче. Таким образом, эти биомаркеры позволяют верно классифицировать пациентов с удовлетворительной функцией и хронической дисфункцией ПАТ. Активность ЩФ в моче и концентрация ИЛ-10 в сыворотке крови имеют среднюю, но достоверную ( $p < 0,05$ ) дискриминирующую мощность (см. табл. 4).

С целью оценки возможности использования данных тестов для получения дополнительных характеристик хронической дисфункции ПАТ для каждого показателя мы выбрали тот пороговый уровень, при котором тест будет иметь максимальную специфичность в плане выявления пациентов с хронической дисфункцией ПАТ (табл. 5). С использованием выбранных пороговых уровней для принятия решения были рассчитаны показатели диагностической точности биомаркеров.

Показатели предсказательной ценности положительных результатов (ПЦПР) (см. табл. 5) свидетельствуют, что положительные результаты тестов на  $\beta_2$ -МГ и ИЛ-10 сыворотки, НАГ и ИЛ-8 мочи позволяют с достаточно высокой вероятностью (более 80%) подтвердить наличие хронической дисфункции ПАТ.

Показатели отношения правдоподобия (ОП) указывают на то, что при выбранных пороговых уровнях наиболее полезными являются положительные результаты (ОППР  $\geq 10$ ) для  $\beta_2$ -МГ сыворотки и НАГ мочи, полезным ( $5 < \text{ОППР} < 10$ ) является ИЛ-8 мочи, потенциально клинически полезными ( $2 < \text{ОППР} \leq 5$ ) – ИЛ-10 в сыворотке и ИЛ-2,  $\beta_2$ -МГ, ЩФ, АСТ, ГГТ в моче. Отрицательный результат (ОП) только одного теста –  $\beta_2$ -МГ сыворотки может рассматриваться как полезный ( $0,2 < \text{ОПОР} \leq 0,5$ ) для исключения хронической дисфункции ПАТ.

Полученные результаты свидетельствуют, что определение в моче пациентов с хронической дисфункцией ПАТ ак-

Таблица 5

## Показатели диагностической точности биомаркеров

Биомаркер, пороговый уровень	ДЧ, %	ДС, %	ПЦПР, %	ПЦОР, %	ОППР	ОПОР
ГГТ/Кр > 0,195 ммоль/(ч·л) / ммоль/л	15	92	67	53	2,11	0,92
АСТ/Кр > 0,044 мкмоль/(ч·мл) / ммоль/л	18	92	71	53	2,54	0,88
ЩФ/Кр > 234,6 нмоль/(с·л) / ммоль/л	26	91	73	58	3,02	0,81
НАГ/Кр > 34 нмоль/(с·л) / ммоль/л	30	97	92	58	10,00	0,71
ИЛ-2/Кр > 0,89 пг/мл/ммоль/л	25	93	80	54	3,73	0,75
ИЛ-8/Кр > 1,51 пг/мл/ммоль/л	42	92	85	61	5,92	0,62
ИЛ-10 > 4,45 пг/мл	31	91	82	52	3,73	0,75
$\beta_2$ -МГ > 8,55 мкг/мл	55	95	92	68	11,00	0,47
$\beta_2$ -МГ/Кр > 0,18 мкг/мл / ммоль/л	30	90	75	56	3,00	0,78

Примечание. ДЧ – диагностическая чувствительность; ДС – диагностическая специфичность; ПЦПР – предсказательная ценность отрицательного результата.

тивности энзимов, концентраций интерлейкинов и  $\beta_2$ -МГ, а в сыворотке крови – концентраций интерлейкинов и  $\beta_2$ -МГ дает дополнительную информацию об этиологии, локализации и активности патологического процесса.

Мы осознаем предварительный характер наших выводов, поскольку полученные результаты нуждаются в валидации на тестовой выборке пациентов, а предположения относительно этиологии дисфункции ПАТ требуют подтверждения путем морфологического исследования биоптата ПАТ.

**Выводы.** 1. Маркерами хронической дисфункции ПАТ являются повышение концентрации в сыворотке ИЛ-10 и  $\beta_2$ -МГ, а в моче – концентрации  $\beta_2$ -МГ, ИЛ-2 и ИЛ-8 и повышенные активности НАГ, ЩФ, АСТ, ГГТ.

2. Повышение активности НАГ, ГГТ, ЩФ, и АСТ (из которых наиболее информативен НАГ) в моче у пациентов с хронической дисфункцией ПАТ свидетельствует о продолжающемся повреждении эпителия проксимальных канальцев нефрона.

3. Повышение концентрации  $\beta_2$ -МГ сыворотки указывает на гломерулярную дисфункцию, а в моче – на тубулярную дисфункцию ПАТ.

4. Данные о концентрации ИЛ-10 в сыворотке крови, концентрации ИЛ-2 и ИЛ-8 в моче могут быть использованы для дифференциальной диагностики причины хронической дисфункции ПАТ.

5. Для определения особенностей течения хронической дисфункции ПАТ наиболее полезными являются положительные результаты определения  $\beta_2$ -МГ сыворотки и НАГ мочи, полезными – положительный результат теста на ИЛ-8 мочи и отрицательный результат теста на  $\beta_2$ -МГ сыворотки.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Pascual J., Pérez-Sáez M.J., Mir M., Crespo M. Chronic renal allograft injury: early detection, accurate diagnosis and management. *Transplant. Rev. (Orlando)*. 2012; 26 (4): 280–90.
- Sellarés J., de Freitas D.G., Mengel M., Einecke G., Sis B., Hidalgo L.G. et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am. J. Transplant.* 2012; 12 (2): 388–99.
- Mengel M., Gwinner W., Schwarz A., Bajeski R., Franz I., Brocker V. et al. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am. J. Transplant.* 2007; 7: 356–65.
- Зобраб'ян Р.О., Дрянська В.С., Драннік Г.М., Порошина Т.В. Про- $(\gamma$ -IF) та протизапальні (IL-10, TGF- $\beta$ ) цитокіни та їх співвідношення як додаткові ознаки для диференційної діагностики стану ниркового алотрансплантату у віддаленому післяопераційному періоді. *Український журнал нефрології та діалізу*. 2007; 4 (16): 62–6.
- Wu I., Parikh C.R. Screening for kidney diseases: Older measures versus novel biomarkers. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 3: 1895–901.
- Lisowska-Myjak B. Serum and Urinary Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Blood Purif.* 2010; 29: 357–65.
- Skálová S. The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta Medica*. 2005; 48: 75–80.
- Пилотович В.С., Сердюченко Н.С., Аринчин В.Н., Перепеча Е.А. Бета-2-микроглобулин и его роль в диагностике нефрологических заболеваний. *Медицинский журнал*. 2011; 1: 80–3.
- Omrani M.D., Mokhtari M.R., Bagheri M., Ahmadpoor P. Association of interleukin-10, interferon-gamma, transforming growth factor-beta, and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with long-term kidney allograft survival. *Iran. J. Kidney Dis.* 2010; 4 (2): 141–6.
- Gupta R.K., Jain M., Sharma R.K. Serum & urinary IL-2 levels as predictors in acute renal allograft rejection. *Indian J. Med. Res.* 2004; 119 (1): 24–7.
- Dieterle F., Perentes E., Cordier A., Roth D.R., Verdes P., Grenet O. et al. Urinary clusterin, cystatin C, beta2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (5): 463–9.
- Pereira A.B., Teixeira A.L., Rezende N.A., Pereira R.M., Miranda

- D.M., Oliveira E.A. et al. Urinary chemokines and anti-inflammatory molecules in renal transplanted patients as potential biomarkers of graft function: a prospective study. *Int. Urol. Nephrol.* 2012; 44 (5): 1539–48.
- Эмануэль В.Л. *Лабораторная диагностика заболеваний почек*. Изд. 2-е, испр. и доп. СПб. – Тверь: ООО «Издательство «Трида»», 2006.
- Westhuyzen J., Endre Z.H., Reece G., Reith D.M., Saltissi D., Morgan T.J. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18: 543–51.
- Amirzargar A., Lessan-Pezeshki M., Fathi A., Amirzargar M., Khosravi F., Nikbin B. TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 2005; 37 (7): 2985–7.
- Ozer J.S., Dieterle F., Troth S., Perentes E., Cordier A., Verdes P. et al. A panel of urinary biomarkers to monitor reversibility of renal injury and a serum marker with improved potential to assess renal function. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28: 486–94.
- Keown P. A. Predicting long-term outcome in renal transplantation. *Kidney International*. 2013; 84: 650–2.
- McDaniel D.O., Rigney D.A., McDaniel K.Y., Windham W.J., Redmond P., Williams B. et al. Early expression profile of inflammatory markers and kidney allograft status. *Transplant. Proc.* 2013; 45(4): 1520–3.
- Мигаль Л. Я., Багдасарова І. В., Дашенко О. О., Король Л. В., Лавренчук О. В., Фомина С. П. *Способ диагностики ступеня активності пієлонефритичного процесу у дітей, хворих на пієлонефрит. Патент на винахід UA N 82170*, опубл. 11.03.2008. Бюл. N 5.
- Schoenbach V.J. *Understanding the Fundamentals of Epidemiology: an Evolving Text*. Chapel Hill; 2001: 59–81.
- Sheu J.N., Chen S.M., Meng M.H. The role of serum and urine interleukin-8 on acute pyelonephritis and subsequent renal scarring in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2009; 28 (10): 885–90.
- Sekine H., Kawasaki Y., Ohara S., Suyama K., Hosoya M. Focal bacterial nephritis without pyuria in a boy presenting with high urinary  $\beta_2$ -MG and NAG levels. *Yokohama J. Med. Sci.* 2014; 60(1): 91–4.
- Schaub S., Mayr M., Hönger G., Bestland J., Steiger J., Regeniter A. et al. Detection of subclinical tubular injury after renal transplantation: comparison of urine protein analysis with allograft histopathology. *Transplantation*. 2007; 84(1): 104–12.

Поступила 27.05.15

#### REFERENCES

- Pascual J., Pérez-Sáez M.J., Mir M., Crespo M. Chronic renal allograft injury: early detection, accurate diagnosis and management. *Transplant. Rev. (Orlando)*. 2012; 26 (4): 280–90.
- Sellarés J., de Freitas D.G., Mengel M., Einecke G., Sis B., Hidalgo L.G. et al. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am. J. Transplant.* 2012; 12 (2): 388–99.
- Mengel M., Gwinner W., Schwarz A., Bajeski R., Franz I., Brocker V. et al. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts. *Am. J. Transplant.* 2007; 7: 356–65.
- Zograб'yan R.O., Driyans'ka V.C., Drannik G.M., Poroshina T.V. Pro- $(\gamma$ -IF) and anti-inflammatory (IL-10, TGF- $\beta$ ) cytokines and their value as additional features for differential diagnosis of renal allograft status in the remote postoperative period. *Ukrains'kiy zhurnal nefrologії ta dializu*. 2007; 4 (16): 62–6.
- Wu I., Parikh C.R. Screening for kidney diseases: Older measures versus novel biomarkers. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2008; 3: 1895–901.
- Lisowska-Myjak B. Serum and Urinary Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Blood Purif.* 2010; 29: 357–65.
- Skálová S. The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. *Acta Medica*. 2005; 48: 75–80.
- Pilotovich V.S., Serdyuchenko N.S., Arinchin V.N., Perepecha E.A. Beta-2-microglobulin and its role in the diagnosis of diseases nephrology. *Meditsinskiy zhurnal*. 2011; 1: 80–3. (in Russian)
- Omrani M.D., Mokhtari M.R., Bagheri M., Ahmadpoor P. Association of interleukin-10, interferon-gamma, transforming growth fac-

- tor-beta, and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with long-term kidney allograft survival. *Iran. J. Kidney Dis.* 2010; 4 (2): 141–6.
10. Gupta R.K., Jain M., Sharma R.K. Serum & urinary IL-2 levels as predictors in acute renal allograft rejection. *Indian J. Med. Res.* 2004; 119 (1): 24–7.
  11. Dieterle F., Perentes E., Cordier A., Roth D.R., Verdes P., Grenet O. et al. Urinary clusterin, cystatin C, beta2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28 (5): 463–9.
  12. Pereira A.B., Teixeira A.L., Rezende N.A., Pereira R.M., Miranda D.M., Oliveira E.A. et al. Urinary chemokines and anti-inflammatory molecules in renal transplanted patients as potential biomarkers of graft function: a prospective study. *Int. Urol. Nephrol.* 2012; 44 (5): 1539–48.
  13. Emanuel' V.L. *Laboratory diagnosis of kidney disease [Laboratornaya diagnostika zabolevaniy pochek]* Ed. 2nd, rev. and ext. SPb. Tver': OOO «Izdatel'stvo "Triada"». 2006. (in Russian)
  14. Westhuyzen J., Endre Z.H., Reece G., Reith D.M., Saltissi D., Morgan T.J. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2003; 18: 543–51.
  15. Amirzargar A., Lessan-Pezeshki M., Fathi A., Amirzargar M., Khosravi F., Nikbin B. TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients. *Transplant. Proc.* 2005; 37 (7): 2985–7.
  16. Ozer J.S., Dieterle F., Troth S., Perentes E., Cordier A., Verdes P. et al. A panel of urinary biomarkers to monitor reversibility of renal injury and a serum marker with improved potential to assess renal function. *Nat. Biotechnol.* 2010; 28: 486–94.
  17. Keown P. A. Predicting long-term outcome in renal transplantation. *Kidney International.* 2013; 84: 650–2.
  18. McDaniel D.O., Rigney D.A., McDaniel K.Y., Windham W.J., Redmond P., Williams B. et al. Early expression profile of inflammatory markers and kidney allograft status. *Transplant. Proc.* 2013; 45(4): 1520–3.
  19. Migal' L. Ya., Bagdasarova I. V., Dashchenko O. O., Korol' L. V., Lavrenchuk O. V., Fomina S. P. *The method of diagnostics of the degree of pyelonephritic process activity in children with pyelonephritis published. Patent UA N 82170, 2008.* (in Ukrainian)
  20. Schoenbach V.J. *Understanding the Fundamentals of Epidemiology: an Evolving Text.* Chapel Hill; 2001: 59–81.
  21. Sheu J.N., Chen S.M., Meng M.H. The role of serum and urine interleukin-8 on acute pyelonephritis and subsequent renal scarring in children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2009; 28 (10): 885–90.
  22. Sekine H., Kawasaki Y., Ohara S., Suyama K., Hosoya M. Focal bacterial nephritis without pyuria in a boy presenting with high urinary  $\beta$ 2-MG and NAG levels. *Fukushima J. Med. Sci.* 2014; 60(1): 91–4.
  23. Schaub S., Mayr M., Hönger G., Bestland J., Steiger J., Regeniter A. et al. Detection of subclinical tubular injury after renal transplantation: comparison of urine protein analysis with allograft histopathology. *Transplantation.* 2007; 84(1): 104–12.

Received 27.05.15

© АБАКУШИНА Е.В., 2015

УДК 616-018.1-076.5

Абакушина Е.В.

## МЕТОД ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ НК-КЛЕТОК И ИХ АКТИВНОСТИ

МРНЦ им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Минздрава России, 249036, г. Обнинск, Калужская область

В обзоре описаны основные характеристики клеток естественных киллеров (НК-клетки) человека, их фенотип и методы определения функциональной активности с помощью проточной цитометрии. НК-клетки играют важную роль во врожденном и адаптивном иммунитете против инфекций и опухолей, и первоначально были охарактеризованы на основе способности лизировать злокачественные и инфицированные клетки без предварительной сенсибилизации или иммунизации. НК-клетки человека имеют фенотип  $CD3^+CD56^+CD16^+$  и могут быть разделены на две субпопуляции в зависимости от уровня экспрессии  $CD56$ .  $CD56^{bright}$  НК-клетки преимущественно участвуют в иммунорегуляции, продуцируя цитокины.  $CD56^{dim}$  НК-клетки в основном обладают цитолитической активностью. НК-клетки опосредуют уничтожение инфицированных и опухолевых клеток через несколько эффекторных механизмов: по средству перфорин/гранзимсодержащих гранул, рецепторов апоптоза и антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности. Цитотоксичность НК-клеток и продукция цитокинов обеспечивают регуляторную роль НК-клеток, как важных участников адаптивной иммунной системы. НК-клетки снабжены различными рецепторами, которые стимулируют или ингибируют их активность. Активация НК-клеток зависит от баланса между ингибирующими и активирующими рецепторами. «Золотым стандартом» определения функциональной активности НК-клеток человека является тест по высвобождению радиоактивного хрома из клеток-мишеней. Этот метод нелегко выполнить в клинической практике из-за трудностей в утилизации радиоактивных отходов, короткого времени полураспада изотопов, дороговизне и сложности в стандартизации. В статье описываются цитофлуориметрические методы для клинического определения активности НК-клеток. Эти методы позволяют избежать ряда проблем, связанных с использованием радиоактивности, а также они быстрые и подлежат стандартизации.

Ключевые слова: клетки естественные киллеры (НК-клетки); фенотип; функция; цитотоксичность; проточный цитометр; цитофлуориметрические методы.

Для цитирования: Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(11): 37–44.

Abakushina E.V.

THE TECHNIQUE OF FLOW CYTOMETRY IN EVALUATION OF NK-CELLS AND THEIR ACTIVITY

The A.F. Tsiba medical radiological research center - branch of the P.A. Herten Federal medical research center of Minzdrav of Russia, 249036 Obninsk, Russia

Для корреспонденции: Абакушина Елена Вячеславовна, abakushina@mail.ru

For correspondence: Abakushina E.V., abakushina@mail.ru