

УДК: 616.61-089.843-008-036.12-076.5-074



Траїлін А. В., Плетень М. В., Никоненко О. С., Остапенко Т. І., Єфіменко Н. Ф.

Державний заклад «Запорізька медична академія післядипломної освіти МОЗ України», Запоріжжя, Україна

e-mail: andrei\_trailin@ukr.net

# КЛІНІЧНЕ ЗНАЧЕННЯ БЕТА 2-МІКРОГЛОБУЛІНУ, ЕНЗИМІВ, ЦИТОКІНІВ ПРИ ХРОНІЧНІЙ ДИСФУНКЦІЇ РЕНАЛЬНОГО АЛОТРАНСПЛАНТАТА

## РЕЗЮМЕ

Більшість досліджень біомаркерів дисфункції ренального алотрансплантату (РАТ) обмежені раннім післяопераційним періодом і спрямовані на діагностику гострого відторгнення.

Метою дослідження було встановлення додаткових характеристик хронічної дисфункції РАТ шляхом використання неінвазивних біомаркерів сироватки і сечі.

**МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ.** У 79 пацієнтів з трансплантацією нирки віком від 16 до 59 років визначали активність бета-2-мікроглобуліну ( $\beta$ 2-МГ), аланінамінотрансферази (АлАТ), аспаратамінотрансферази (АсАТ), гамма-глутамілтрансферази (ГГТ), лужної фосфатази (ЛФ), N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази (НАГ) та концентрації інтерлейкінів (ІЛ-2, ІЛ-8, ІЛ-10).

**РЕЗУЛЬТАТИ.** Хронічна дисфункція РАТ характеризувалась підвищенням концентрації в сироватці ІЛ-10 і  $\beta$ 2-МГ, а в сечі – збільшенням концентрації  $\beta$ 2-МГ, ІЛ-2 та ІЛ-8 і підвищенням активності НАГ, ЛФ, АсАТ, ГГТ. При мультиваріантному регресійному аналізі тільки НАГ показав достовірний незалежний зв'язок з хронічною дисфункцією РАТ. Площі під ROC-кривими свідчили, що відмінну і хорошу дискримінуючу здатність при класифікації пацієнтів із задовільною функцією і хронічною дисфункцією РАТ мають концентрації  $\beta$ 2-МГ в сироватці і в сечі, а також активність НАГ у сечі.

**ВИСНОВКИ.** Збільшення концентрації  $\beta$ 2-МГ в сироватці свідчить про гломерулярну, а в сечі – про тубулярну дисфункцію РАТ. Збільшення активності НАГ у сечі свідчить про тривале пошкодження канальцевого епітелію. Підвищення концентрації ІЛ-2 та ІЛ-8 в сечі, і ІЛ-10 в сироватці може вказувати на етіологію хронічної дисфункції РАТ.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** трансплантація нирки; хронічна дисфункція ренального алотрансплантата; бета-2-мікроглобулін; аспаратамінотрансфераза; гамма-глутамілтрансфераза; лужна фосфатаза

Найбільш ефективним методом лікування хворих у термінальній стадії хронічної хвороби нирок є алотрансплантація донорської нирки. Головною проблемою, що визначає тривалість і якість життя пацієнтів, залишається хронічна дисфункція ренального алотрансплантату (РАТ) [22, 24]. Розрізняють специфічні (імунні) і неспецифічні (неімунні) варіанти хронічної дисфункції РАТ, що відбуваються з переважним пошкодженням клубочків або канальців нефрону [24]. Головні з них: антитіло-опосередковане відторгнення, рецидивуючі і *de novo* гломерулонефрити, нефротоксичність імуносупресантів [22, 24], які вимагають специфічної терапії і відрізняються прогнозом. З клінічної точки

зору, крім диференційної діагностики варіантів дисфункції РАТ необхідно відрізнити активну (потенційно курабельну) фазу патологічних процесів в РАТ від неактивної [18].

Для діагностики дисфункції РАТ використовують інвазивний [18] і/або неінвазивний [1, 32] підходи, при цьому кожен з них має свої переваги і недоліки. Загальноприйнятий неінвазивний індикатор функції РАТ – концентрація креатиніну у сироватці – є пізнім і відносно малочутливим маркером дисфункції [32] та не вказує на активність патологічного процесу. Неінвазивними біохімічними маркерами ушкодження як нативних нирок, так і РАТ можуть бути ензими сироватки крові

і сечі [16, 29], низькомолекулярні протеїни [5], цитокіни [14, 20], а також специфічні молекули, що продукуються саме в нирках [12, 23].

Захворювання нирок проявляються зміною активності ензимів сироватки [15]. При патології РАТ внаслідок патологічної клубочкової фільтрації і недостатньої реабсорбції ензими можуть надходити в сечу [16, 29]. Однак залишається до кінця не з'ясованим питання про те, концентрація яких саме ензимів у сироватці або в сечі пацієнтів може дати точну інформацію про наявність патологічного процесу в нирці, його локалізацію і ступінь активності. Крім того, при дисфункції РАТ частіше вивчалися лізосомні ензими або їх ізоформи [29-30].

Цитокіни є важливими медіаторами патологічних процесів у РАТ [1, 9, 14, 20]. Було встановлено, що концентрації інтерлейкінів (ІЛ-2, ІЛ-8, ІЛ-10) у сироватці крові і у сечі відбивають функціональну активність різних типів імункомпетентних клітин, тяжкість запального процесу в РАТ, і можуть мати діагностичне і прогностичне значення [1, 9, 23]. Проте на сьогоднішній день відсутня єдина думка щодо того, де краще визначати концентрацію інтерлейкінів при дисфункції РАТ – у периферичній крові чи в сечі пацієнтів [9, 21].

Одним з методів лабораторної діагностики ниркової функції є визначення концентрації в крові і екскреції із сечею низькомолекулярних протеїнів, таких як  $\beta$ 2-МГ [12, 31]. Визначення вмісту бета-2-МГ у сироватці крові і в сечі може відбивати, відповідно, ступінь ушкодження базальної мембрани клубочків і епітелію проксимальних канальців [7, 10, 31]. За деякими оцінками, вимір концентрації  $\beta$ 2-МГ сироватки крові більш точно, ніж швидкість клубочкової фільтрації (ШКФ), особливо при її низьких значеннях, дозволяє оцінити функцію нирок [7, 15] і, крім того, несе додаткову інформацію.

Однак більшість досліджень неінвазивних біомаркерів дисфункції РАТ обмежені раннім післяопераційним періодом і спрямовані на діагностику гострого відторгнення [14, 16]. Тільки в поодиноких публікаціях вивчалось діагностичне значення змін активності ензимів [16, 30], концентрацій інтерлейкінів [1, 20] і  $\beta$ 2-МГ [12, 15] у сироватці крові і сечі пацієнтів із хронічною дисфункцією РАТ. Недостатньо вивчена діагностична цінність комбінації різних біохімічних показників [12, 16]. Наведені в літературі результати досліджень досить суперечливі [21, 32]. Багато використаних методів (наприклад, молекулярно-генетичні) дорого коштують [14, 17], що утруднює їх рутинне застосування.

Метою дослідження було встановлення додаткових характеристик хронічної дисфункції РАТ шляхом використання неінвазивних біо-

маркерів сироватки і сечі: ензимів аланінамінотрансферази (АлАТ), аспартатамінотрансферази (АсАТ), гама-глутамілтрансферази (ГГТ), лужної фосфатази (ЛФ), N-ацетил- $\beta$ -D-глюкозамінідази (НАГ); інтерлейкінів (ІЛ-2, ІЛ-8, ІЛ-10) та  $\beta$ 2-МГ.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В ретроспективне дослідження включені 79 пацієнтів віком від 16 до 59 років (47 чоловіків і 32 жінки), яким у період з 1997 по 2011 рік виконана трансплантація нирки в Запорізькому міжрегіональному центрі трансплантації. Середній вік реципієнтів склав  $38 \pm 11$  років. Всі реципієнти РАТ, включені в дослідження, отримували трикомпонентну імуносупресивну терапію (інгібітори кальциневрину – такролімус або циклоспорин, мікофенолата мофетил, глюкокортикоїди). Матеріалом для дослідження були сироватка крові, сеча, історія хвороби і амбулаторні карти пацієнтів. Пацієнти були розділені на дві групи: зі стабільною задовільною функцією РАТ і з його хронічною дисфункцією. Хронічна дисфункція РАТ клінічно характеризувалась прогресуючим погіршенням функції трансплантата, що в більшості випадків асоціювалося із протеїнурією і артеріальною гіпертензією [22]. Функцію РАТ оцінювали за рівнем креатиніну крові (табл. 1) і ШКФ, які відмінно корелювали між собою ( $r = -0,85$ ,  $p < 0,05$ ). Для розрахунку ШКФ використовували формулу Кокрофта-Гольта (Cockcroft D. W. 1976).

Критерієм належності пацієнтів до першої або другої групи був обраний медіанний рівень креатиніну в сироватці крові (табл. 1). У першу групу увійшли 40 пацієнтів з рівнем креатиніну  $\leq 150$  мкмоль/л, у другу групу – 39 пацієнтів з рівнем креатиніну  $\geq 150$  мкмоль/л.

Зразки сироватки для дослідження концентрацій біомаркерів одержували після центрифугування крові, взятої ранком натще. Зразки сироватки для визначення активності ензимів досліджували в той же день, а сироватку для визначення концентрації інтерлейкінів і  $\beta$ 2-МГ зберігали в морозильній камері при температурі мінус 20 °С, але не більше 3 місяців. Зразки сечі для дослідження збирали в ранкові години (з 7 до 9), відстоювали при температурі +4 °С протягом 3 годин і центрифугували 15 хвилин при 3000 об./хв. Підготовану сечу досліджували в той же день (ензими) або зберігали в морозильній камері при температурі мінус 20 °С, але не більше 3 місяців (інтерлейкіни та  $\beta$ 2-МГ) [2, 7].

Таблиця 1. Клінічні дані пацієнтів.

ПАРАМЕТР (ОДИНИЦЯ ВИМІРЮВАННЯ)	ЗАДОВІЛЬНА ФУНКЦІЯ РАТ	ХРОНІЧНА ДИСФУНКЦІЯ РАТ	P	
Вік (років) <sup>1</sup>	37±12	40±11	0,370	
Строк після трансплантації (міс.) <sup>1</sup>	69,1±43,3	102,5±58,7	0,062	
Стать	чоловіки <sup>2</sup>	21 (52,5%)	26 (66,6%)	0,190
	жінки <sup>2</sup>	19 (47,5%)	13 (33,3%)	0,190
Інгібітор кальциневрину	циклоспорин А <sup>2</sup>	34 (85%)	29 (74,4%)	0,230
	такролімус <sup>2</sup>	6 (15%)	10 (25,6%)	0,230
Креатинін крові (мкмоль/л) <sup>3</sup>	110,5 (97,5-130,5)	195 (174-234)	0,001	
Сечовина крові (ммоль/л) <sup>3</sup>	6,8 (5,8-8,1)	11,5 (10,1-14,0)	0,001	
ШКФ (мл/хв) <sup>1</sup>	65,7±16,7	35,5±10,7	0,007	
Протеїнурія/Кр (г/л/ммоль/л) <sup>3</sup>	0,002 (0-0,006)	0,011 (0,005-0,022)	0,001	
Питома щільність сечі <sup>3</sup>	1012 (1009-1015)	1005 (1003-1010)	0,001	
Артеріальний тиск	систолічний (мм. рт. ст.) <sup>3</sup>	130 (120-140)	150 (140-160)	0,001
	діастолічний (мм. рт. ст.) <sup>3</sup>	90 (80-95)	100 (90-100)	0,001

Примітки:

<sup>1</sup> –  $M \pm SD$ ;

<sup>2</sup> – кількість пацієнтів;

<sup>3</sup> – медіана

(міжквартильний розмах).

Активність ензимів аланінамінотрансферази (АлАТ, ЕС 2.6.1.2), аспартатамінотрансферази (АсАТ, ЕС 2.6.1.1), гама-глутаміл-трансферази (ГГТ, ЕС 2.3.2.2) і лужної фосфатази (ЛФ, ЕС 3.1.3.1) у пробах сироватки і сечі пацієнтів проводили біохімічним методом з використанням стандартних наборів реактивів фірми «Філісіт-Діагностика», оптичну густину вимірювали на спектрофотометрі «APEL» (Японія). Активність ензиму N-ацетил-β-D-глюкозамінідази (НАГ, ЕС 3.2.1.30) у сироватці крові не визначали, тому що по наявним літературним даним НАГ швидко піддається руйнуванню і його активність в крові дуже низька [2, 29]. У порціях сечі активність НАГ визначали колориметричним методом Покровського А. А. з співавт. (1971 р.), адаптованого Мігаль Л. Я. з співавт. [2] за кількістю p-нітрофенолу, що утворився в ході реакції з субстрату 4-нітрофеніл-N-ацетил-β-D-глюкозамініду фірми SIGMA-ALDRICH (Німеччина) [2].

Концентрації ІЛ-2, ІЛ-8, ІЛ-10 та β2-МГ в пробах сироватки і сечі визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу. Для визначення інтерлейкінів використовували стандартні набори реагентів (Вектор-Бест, Росія), а концентрацію β2-МГ визначали наборами реагентів Orgentec Gmb (Німеччина).

Отримані результати активності ензимів, концентрацій інтерлейкінів та β2-МГ у сечі перераховували на рівень креатиніну (Кр), визначений у тій же порції сечі [14, 16, 30] за методом Яффе-Поппера з пікриновою кислотою.

Нормально розподілені дані виражали середнім значенням (M) і стандартним відхиленням (SD); для порівняння результатів використовували T-тест Ст'юдента, а для вивчення взаємозв'язку між ними – коефіцієнт кореляції Пірсона (r). Дані, розподіл яких відрізнявся від нормального, виражали в вигляді медіани і міжквартильного розмаху; для оцінки достовірності відмінностей між групами використовувався Mann-Whitney U-тест, а для вивчення взаємозв'язку між ними розраховували коефіцієнт кореляції Спірмена (r). Для передбачення ймовірності наявності у пацієнта хронічної дисфункції ПАТ на підставі концентрації біомаркерів використовувався метод уніваріантної і мультиваріантної логістичної регресії. Для розрахунку граничних рівнів активності ензимів, концентрацій інтерлейкінів, β2-МГ, їх діагностичної чутливості та специфічності застосовували аналіз кривих операційних характеристик (ROC-аналіз). Обчислювали площу під кривою, її стандартну помилку і 95-відсотковий довірчий інтервал. Величина показника, при якому максимальна кількість пацієнтів була правильно класифікована, використана як граничний рівень для позитивного і негативного результату тесту. Концентрація біомаркерів, що є граничним рівнем для прийняття рішення, була використана для розрахунку показників діагностичної інформативності точності тесту [8, 26].

Статистична обробка результатів виконувалася за допомогою програми Statistica 7.0 (StatSoft Inc., USA); для побудови ROC-кривої

і розрахунку її параметрів застосовували програму SPSS 15.0 (IBM, USA). Межею статистичної значущості вважали рівень  $p < 0,05$ .

Всі дослідження виконані з дотриманням положень Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Групи обстежених нами пацієнтів статистично вірогідно не розрізнялися за статтю, віком, строком після трансплантації, типом імуносупресивної терапії (табл. 1).

У той же час розходження між основними лабораторними показниками функції ПАТ у цих групах були високодостовірними (табл. 1), що підтверджує правильність поділу пацієнтів на групи. Більше того, креатинін крові трохи краще, ніж ШКФ, корелював з іншими показниками функції ПАТ: концентрацією сечовини:  $r = 0,84$  проти  $r = -0,77$ , і протеїнурією:  $r = 0,62$  проти  $r = -0,55$  (у всіх випадках  $p < 0,05$ ).

Між двома групами пацієнтів не було виявлено вірогідної різниці у активності жодного з ензимів сироватки крові (табл. 2). Також була відсутня кореляція активності ензимів у сироватці крові з показниками функції ПАТ.

В групі пацієнтів з хронічною дисфункцією ПАТ активності таких ензимів як ЛФ, ГГТ, АсАТ і НАГ у сечі вірогідно перевищували показники ензимурії в пацієнтів із задовільною функцією ПАТ (табл. 2). При цьому кореляція між активністю кожного окремого ензиму у сироватці та у сечі була відсутня. Оскільки, згідно з даними літератури [21], основним джерелом зазначених ензимів у сечі є епітелій проксимальних канальців нефрону, ми вважаємо, що аналіз ензимурії може надати інформацію про глибину його пошкодження. Підвищення активності ЛФ і ГГТ в сечі може свідчити про пошкодження щіткової облямівки епітелію [7, 29], де ці ензими переважно локалізовані і тому супроводжує усі ступені пошкодження епітеліальних клітин. На відміну від ЛФ та ГГТ, інші два ензими – НАГ та АсАТ – локалізуються внутрішньоклітинно, у лізосомах та мітохондріях, відповідно [2, 21, 29, 30]. Тому збільшення активності саме цих ензимів у сечі є ознакою глибокого пошкодження епітеліальних клітин проксимальних канальців нефрону.

Показники активності більшості ензимів у сечі корелювали між собою. Оскільки різниця в активності НАГ між групами порівняння була найбільш достовірною (табл. 2), ми звернули увагу саме на цей ензим. Кореляційний аналіз дозволив встановити, що активність НАГ була пов'язана з активністю всіх інших ензимів у сечі: АсАТ ( $r = 0,47$ ,  $p < 0,05$ ), АлАТ ( $R = 0,56$ ,  $p < 0,05$ ), ГГТ ( $R = 0,56$ ,  $p < 0,05$ ), і ЛФ ( $R = 0,67$ ,  $p < 0,05$ ). Ці знахідки, на нашу думку, свідчать про глибоке ушкодження епітелію проксимальних канальців нирки – дистрофію, некробіоз і аж до канальцевого некрозу [30].

МАРКЕР, ОДИНИЦЯ ВИМІРЮВАННЯ	ЗАДОВІЛЬНА ФУНКЦІЯ ПАТ	ХРОНІЧНА ДИСФУНКЦІЯ ПАТ	P
АсАТ, мкмоль/(год×мл) <sup>1</sup>	0,40 (0,20-0,40)	0,30 (0,20-0,50)	0,90
АсАТ / Кр, мкмоль/(год×мл) / ммоль/л <sup>2</sup>	0,009 (0,004-0,019)	0,021 (0,011-0,033)	0,01
АлАТ, мкмоль/(год×мл) <sup>1</sup>	0,40 (0,30-0,50)	0,40 (0,30-0,50)	0,94
АлАТ / Кр, мкмоль/(год×мл) / ммоль/л <sup>1</sup>	0,02 (0,01-0,03)	0,01 (0,00-0,02)	0,68
ГГТ, ммоль/(год×л) <sup>1</sup>	0,9 (0,7-1,4)	1,2 (0,9-1,5)	0,37
ГГТ / Кр, ммоль/(год×л) / ммоль/л <sup>2</sup>	0,05 (0,04-0,09)	0,08 (0,05-0,14)	0,04
ЛФ, нмоль/(с×л) <sup>1</sup>	1743 (1328-2656)	2241 (954-3569)	0,96
ЛФ / Кр, нмоль/(с×л) / ммоль/л <sup>1</sup>	91,6 (51,5-158,2)	127,9 (72,0-250,1)	0,04
НАГ / Кр, нмоль/(с×л) / ммоль/л <sup>2</sup>	14,3 (6,3-24,0)	21,7 (12,8-39,8)	0,01
β2-МГ, мкг/мл <sup>1</sup>	6,48 (5,36-7,76)	8,68 (7,89-11,73)	0,01
β2-МГ / Кр, мкг/мл / ммоль/л <sup>1</sup>	0,025 (0,006-0,120)	0,120 (0,043-0,194)	0,01

Таблиця 2.  
Активність ензимів і концентрація β2-МГ в сироватці крові реципієнтів ПАТ та відношення цих показників до креатиніну в сечі.

Примітки:

<sup>1</sup> Медіана

(міжквартильний розмах);

<sup>2</sup>  $M \pm SD$ .

МАРКЕР, ОДИНИЦЯ ВИМІРЮВАННЯ	ЗАДОВІЛЬНА ФУНКЦІЯ РАТ	ХРОНІЧНА ДИСФУНКЦІЯ РАТ	P
ІЛ-2, пг/мл	0,20 (0,17-1,28)	0,21 (0,18-2,13)	0,10
ІЛ-2 / Кр, пг/мл / ммоль/л <sup>1</sup>	0,18 (0,13-0,21)	0,36 (0,13-1,16)	0,04
ІЛ-8, пг/мл	2,47 (1,67-4,39)	2,57 (2,10-4,95)	0,70
ІЛ-8 / Кр, пг/мл / ммоль/л <sup>1</sup>	0,33 (0,10-0,60)	0,76 (0,34-3,31)	0,02
ІЛ-10, пг/мл	2,85 (1,90-3,67)	3,73 (2,58-4,62)	0,01
ІЛ-10 / Кр, пг/мл / ммоль/л <sup>1</sup>	0,07 (0,07-0,10)	0,09 (0,07-0,22)	0,29

Примітки: <sup>1</sup> – Дані наведені в перерахунку на концентрацію креатиніну у тій же порції сечі.

МАРКЕР, ОДИНИЦЯ ВИМІРЮВАННЯ	МОНОВАРІАНТНИЙ АНАЛІЗ			МУЛЬТИВАРІАНТНИЙ АНАЛІЗ		
	ВШ	95% ДОВІРЧИЙ ІНТЕРВАЛ	P	ВШ	95% ДОВІРЧИЙ ІНТЕРВАЛ	P
НАГ / Кр, нмоль/(схл) / ммоль/л	1,26	1,07-1,49	0,006	4,13	1,21-14,09	0,023
ЛФ / Кр, нмоль/(схл) / ммоль/л	1,13	1,01-1,26	0,040	0,83	0,53-1,29	0,399
АсАТ / Кр, мкмоль / (годхмл) / ммоль/л	1,53	0,50-4,71	0,460	-	-	-
ГГТ / Кр, ммоль / (годхл) / ммоль/л	1,11	0,76-1,61	0,580	-	-	-
ІЛ-8 / Кр, пг/мл / ммоль/л	1,13	0,89-1,44	0,290	-	-	-
ІЛ-10, пг/мл	1,63	1,01-2,26	0,040	7,68	0,49-19,67	0,146
ІЛ-2 / Кр, пг/мл / ммоль/л	0,63	0,22-1,83	0,052	-	-	-
β2-МГ, мкг/мл	1,99	1,20-3,31	0,006	1,38	0,68-2,79	0,373
β2-МГ / Кр, мкг/мл / ммоль/л	1,10	1,01-1,19	0,026	1,00	0,74-1,36	1,000

Примітки: НАГ – N-ацетил-β-D-глюкозамінідаза, ГГТ – гама-глутамілтрансфераза, ЛФ – лужна фосфатаза, АсАТ – аспартатамінотрансфераза, β2-МГ – β2-мікроглобулін, ІЛ – інтерлейкіни, Кр – креатинін, ВШ – відношення шансів.

У сечі пацієнтів з дисфункцією РАТ концентрація ІЛ-2 була вірогідно вищою, ніж в групі порівняння. Беручи до уваги відомі функції ІЛ-2 як медіатора активації Т-лімфоцитів [11, 14, 19], ми припускаємо, що в окремих пацієнтів причиною погіршення функції РАТ було Т-клітинно-опосередковане відторгнення [1, ]. Згідно з існуючими уявленнями про патогенез 1-го типу Т-клітинно-опосередкованого відторгнення [11], Т-лімфоцити реципієнта здатні проникати у канальці, розпізнавати HLA-антигени донора на епітеліальних клітинах, активуватися та вивільняти ІЛ-2 [9]. У підтримку цієї гіпотези також свідчить відсутність змін концентрації ІЛ-2 у сироватці крові (табл. 3).

У сироватці крові пацієнтів з дисфункцією РАТ спостерігалася достовірно більш висока концентрація ІЛ-10, ніж при задовільній функції РАТ (табл. 3), тоді як в сечі цей показник вірогідно не розрізнявся (табл. 3). ІЛ-10 є цитокіном Т-лімфоцитів-хелперів 2-го типу, а його ефекти сприяють клональній експансії В-лімфоцитів в лімфоїдній тканині та синтезу ними імуноглобулінів [11, 19, 22, 24]. Відомо, що у сучасну еру трансплантації нирки хронічне антитіло-опосередковане відторгнення є провідною причиною хронічної дисфункції РАТ [13], і ймовірно, що саме про цей варіант дисфункції свідчить зростання сироваткової концентрації ІЛ-10.

Концентрація ІЛ-8 у сечі була достовірно вищою в групі пацієнтів з хронічною дисфункцією РАТ (табл. 3), при тому що у сироватці вона не розрізнялася. Джерелом ІЛ-8 у сечі можуть бути як «місцеві» клітинні елементи – ендотелій судин, епітеліальні клітини, фібробласти, так і гемопоетичні клітини – моноцити та лімфоцити [23]. Дані літератури свідчать, що найбільш ймовірною причиною підвищення концентрації ІЛ-8 у сечі є запальні процеси в нирці бактеріальної або вірусної етіології [27].

Концентрації ІЛ-2 і ІЛ-8 в сечі були пов'язані між собою ( $r = 0,49$ ,  $p < 0,05$ ). Ця знахідка може бути ознакою співіснування декількох ме-

ханізмів пошкодження РАТ в одного реципієнта. Швидше за все, причиною хронічної дисфункції РАТ у цьому випадку є поєднання пієлонефриту та гострого Т-клітинно-опосередкованого відторгнення, що описано в літературі [11, 13], та було показано в наших попередніх дослідженнях [3]. При цьому первинним є пієлонефрит, внаслідок якого збільшується антигенність алографту, що і провокує розвиток відторгнення.

Концентрація β2-МГ в групі пацієнтів з хронічною дисфункцією РАТ була вірогідно вищою як у сироватці крові, так і в сечі (табл. 2). Концентрація β2-МГ у сироватці слабка, але вірогідно корелювала з концентраціями креатиніну ( $r = 0,51$ ,  $p < 0,05$ ) і сечовини ( $r = 0,53$ ,  $p < 0,05$ ), зі ШКФ ( $r = -0,44$ ,  $p < 0,05$ ), протеїнурією ( $r = 0,50$ ,  $p < 0,05$ ) і щільністю сечі ( $r = -0,41$ ,  $p < 0,05$ ), що дозволяє пояснити її збільшення гломерулярною патологією РАТ [5], при якій, у першу чергу, порушується процес фільтрації. Разом з тим дуже слабка кореляція між β2-МГ і креатиніном дозволяє припустити, що ще однією причиною збільшення концентрації β2-МГ у крові пацієнтів із хронічною дисфункцією РАТ стало посилення його позаниркового синтезу, раніше виявлене іншими авторами [31]. Після трансплантації нирки підвищення сироваткової концентрації β2-МГ може слугувати маркером гострого відторгнення, ішемічного ушкодження РАТ, цитомегаловірусної інфекції, лімфопроліферативного захворювання [15]. Кореляційний аналіз показав наявність залежності середньої сили між концентраціями β2-МГ і ІЛ-10 сироватці крові ( $r = 0,56$ ,  $p < 0,05$ ). З огляду на літературні дані, що β2-МГ і ІЛ-10 секретуються лімфоцитами в периферичній крові [1, 5, 11, 19, 31], можна припустити, що причиною хронічної дисфункції РАТ у цьому випадку є антитіло-опосередковане відторгнення.

Причиною збільшення вмісту β2-МГ у сечі може бути як гломерулярна патологія, так і ушкодження ниркових канальців при гострому

Таблиця 3. Концентрації інтерлейкінів у сироватці крові та відношення інтерлейкінів до креатиніну в сечі реципієнтів РАТ, медіана (міжквартильний розмах).

Таблиця 4. Прогнозування ймовірності хронічної дисфункції РАТ на підставі концентрації біомаркерів за допомогою логістичної регресії.

T-клітинно-опосередкованому відторгненні [25], гострому бактеріальному [28] або токсичному нефриті [15], хронічній трансплантатній нефропатії [5]. Концентрація  $\beta 2$ -МГ у сечі слабо корелювала з його концентрацією в сироватці крові ( $r = 0,37$ ,  $p < 0,05$ ). У той же час концентрація  $\beta 2$ -МГ у сечі корелювала з концентрацією в сечі ІЛ-8 ( $r = 0,45$ ,  $p < 0,05$ ), ІЛ-2 ( $r = 0,72$ ,  $p < 0,05$ ), НАГ ( $r = 0,62$ ,  $p < 0,05$ ), АсАТ ( $r = 0,44$ ,  $p < 0,05$ ) і ЛФ ( $r = 0,49$ ,  $p < 0,05$ ), що свідчить про ушкодження проксимальних каналців алотрансплантату, при якому в сечу надходять внутрішньоклітинні ензими і локально синтезовані цитокіни і одночасно страждає реабсорбція. Ці спостереження свідчать, що причиною збільшення концентрації  $\beta 2$ -МГ у сечі, насамперед, є ниркова тубуло-інтерстиціальна патологія.

Таким чином, концентрації ІЛ-2, ІЛ-8,  $\beta 2$ -МГ, НАГ, АсАТ у сечі,  $\beta 2$ -МГ і ІЛ-10 у сироватці крові дозволяють диференціювати пацієнтів із хронічною дисфункцією і задовільною функцією ПАТ.

Для визначення предикторів хронічної дисфункції на наступному етапі дослідження було застосовано логістичний регресійний аналіз (табл. 4).

В моноваріантній моделі було встановлено, що з ризиком розвитку хронічної дисфункції ПАТ вірогідно були пов'язані активності ЛФ та НАГ у сечі, концентрація ІЛ-10 у сироватці крові і концентрація  $\beta 2$ -МГ у сироватці крові і у сечі. До мультиваріантної моделі були включені тільки ті біомаркери, які продемонстрували достовірний вплив в уніваріантній моделі, проте виявилось, що тільки НАГ має достовірний незалежний вплив на ймовірність розвитку хронічної дисфункції ПАТ. Відомо, що епітелій ниркових каналців пошкоджується при усіх формах патології ПАТ: або первинно, наприклад, при нефротоксичності лікарських препаратів, або вторинно, наприклад, при гломерулярній, або судинній патології [7, 13, 22, 24]. Тому цілком закономірно, що активність НАГ в сечі найбільшою мірою відбиває страждання ПАТ, оскільки вона є результируючою усіх активних процесів пошкодження трансплантату.

Предикторна точність моделі на індивідуальному рівні була оцінена за допомогою ROC-аналізу (рис. 1, 2, 3, табл. 5), при цьому оцінювалося значення тільки тих біомаркерів, концентрації яких вірогідно відрізнялися між групами.

Показники площі під ROC-кривими свідчили про відмінну ( $>0,8$ ) і гарну ( $>0,7$ ) дискримінативну потужність, концентрації  $\beta 2$ -МГ у сироватці і сечі (рис. 1, 2) і активності НАГ у сечі (рис. 3).

Таким чином, ці біомаркери дозволяють правильно класифікувати пацієнтів із задовільною функцією і хронічною дисфункцією ПАТ. Активність ЛФ у сечі і концентрація ІЛ-10 у сироватці крові мають середню, але достовірну ( $p < 0,05$ ) дискримінативну потужність. (табл. 5).

З метою оцінки можливості використання даних тестів для одержання додаткових характеристик хронічної дисфункції ПАТ для кожного показника ми вибрали той граничний рівень, при якому тест буде мати максимальну специфічність у плані виявлення пацієнтів із хронічною дисфункцією ПАТ. Використовуючи обрані граничні рівні для ухвалення рішення, були розраховані показники діагностичної інформативності біомаркерів (табл. 6).

Передбачувана цінність позитивного результату (ПЦПР) (табл. 6) свідчить, що позитивні результати тестів на  $\beta 2$ -МГ і ІЛ-10 сироватки, НАГ і ІЛ-8 сечі дозволяють із досить високою ймовірністю ( $> 80\%$ ) підтвердити наявність хронічної дисфункції ПАТ.

Показники відношення правдоподібності свідчать, що при обраних граничних рівнях найбільш корисними (ВППР  $\geq 10$ ) є позитивні результати  $\beta 2$ -МГ сироватки і НАГ сечі, корисним ( $5 < \text{ВППР} < 10$ ) є ІЛ-8 сечі; потенційно клінічно корисними ( $2 < \text{ВППР} \leq 5$ ) – ІЛ-10 у сироватці і ІЛ-2,  $\beta 2$ -МГ, ЛФ, АсАТ,  $\beta$ -ГГТ у сечі. Негативний результат тільки одного тесту –  $\beta 2$ -МГ сироватки може розглядатися як корисний ( $0,2 < \text{ВППР} \leq 0,5$ ) для виключення хронічної дисфункції ПАТ [8].

Отримані результати свідчать, що шляхом визначення в сечі пацієнтів із хронічною дисфункцією ПАТ активності ензимів, концентрацій інтерлейкінів і  $\beta 2$ -МГ, а в сироватці крові – концентрацій

Рисунок 1. Крива операційних характеристик для концентрації  $\beta 2$ -МГ в сироватці крові.

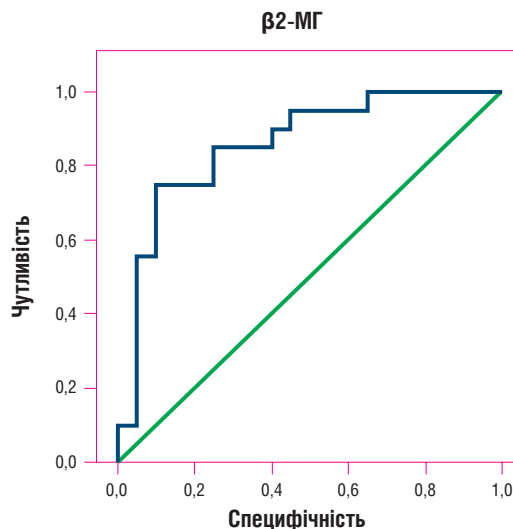


Рисунок 2. Крива операційних характеристик для концентрації  $\beta 2$ -МГ у сечі.

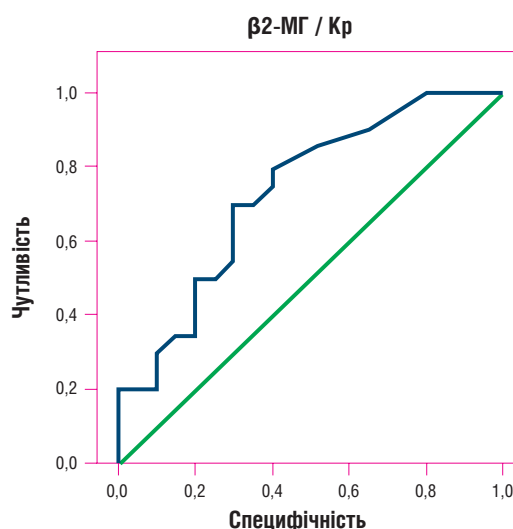
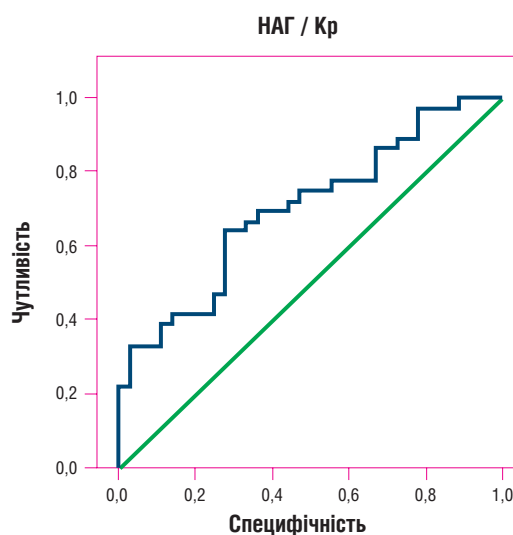


Рисунок 3. Крива операційних характеристик для активності НАГ у сечі.



Таблиця 5.  
Результати  
ROC-аналізу.

МАРКЕР, ОДИНИЦЯ ВИМІРЮВАННЯ	ПЛОЩА ПІД КРИВОЮ, ± СТАНДАРТНА ПОХИБКА	95%-ДОВІРЧИЙ ІНТЕРВАЛ
ГГТ / Кр, ммоль/(год×л) / ммоль/л	0,546±0,079	0,392-0,701
АсАТ / Кр, мкмоль/(год×мл) / ммоль/л	0,636±0,075	0,490-0,783
ЛФ / 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
ІЛ-2 / Кр, пг/мл / ммоль/л	0,643±0,104	0,438-0,848
ІЛ-8 / Кр, пг/мл / ммоль/л	0,627±0,103	0,425-0,830
ІЛ-10, пг/мл	0,684±0,073*	0,573-0,823
β2-МГ, мкг/мл	0,858±0,061*	0,738-0,977
β2-МГ / Кр, мкг/мл / ммоль/л	0,733±0,079*	0,577-0,888

Примітки:  
\* Площа під кривою,  
вірогідно більше 0,5.

Таблиця 6. Показники діагностичної точності біомаркерів.

МАРКЕР, ГРАНИЧНИЙ РІВЕНЬ, ОДИНИЦЯ ВИМІРЮВАННЯ	ДЧ	ДС	ПЦПР	ПЦНР	ДЕ	ВППР	ВПНР
ГГТ / Кр > 0,195 ммоль/(год×л) / ммоль/л	15%	92%	67%	53%	55%	2,11	0,92
АсАТ / Кр > 0,044 мкмоль/(год×мл) / ммоль/л	18%	92%	71%	53%	55%	2,54	0,88
ЛФ / Кр > 234,6 нмоль/(с×л) / ммоль/л	26%	91%	73%	58%	60%	3,02	0,81
НАГ / Кр > 34 нмоль/(с×л) / ммоль/л	30%	97%	92%	58%	64%	10,00	0,71
ІЛ-2 / Кр > 0,89 пг/мл / ммоль/л	25%	93%	80%	54%	58%	3,73	0,75
ІЛ-8 / Кр > 1,51 пг/мл / ммоль/л	42%	92%	85%	61%	68%	5,92	0,62
ІЛ-10 > 4,45 пг/мл	31%	91%	82%	52%	58%	3,73	0,75
β2-МГ > 8,55 мкг/мл	55%	95%	92%	68%	75%	11,00	0,47
β2-МГ > 8,55 мкг/мл	30%	90%	75%	56%	60%	3,00	0,78

Примітки: ДЧ – діагностична чутливість; ДС – діагностична специфічність; ПЦПР – передбачувана цінність позитивного результату; ПЦНР – передбачувана цінність негативного результату; ДЕ – діагностична ефективність; ВППР – відношення правдоподібності позитивного результату; ВПНР – відношення правдоподібності негативного результату.

інтерлейкінів і β2-МГ можна одержати додаткову інформацію про природу, локалізацію і активність патологічного процесу.

Так, збільшення концентрації β2-МГ у крові і сечі хоча і не вказує на активність патологічного процесу, але, на відміну від креатиніну крові, може свідчити про переважне ушкодження клубочків (підвищується β2-МГ крові) або канальців нефрону (підвищується β2-МГ сечі).

Ензимурія і, у першу чергу, збільшення активності НАГ у сечі свідчить, по-перше, про ушкодження канальцевого апарату нефрону, по-друге, про активну фазу процесу ушкодження і, по-третє, про

домінування ушкодження над процесами атрофії [6]. Ймовірно, що, крім того, активність НАГ у сечі є інтегральною мірою пошкодження РАТ під дією чинників різного генезу та механізмів дії.

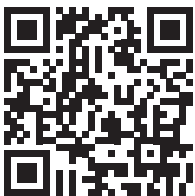
Підвищення концентрації інтерлейкінів у сечі і сироватці крові може вказувати на етіологію патологічного процесу. Зокрема, підвищення концентрації ІЛ-2 у сечі може свідчити про гостре Т-клітинно-опосередковане відторгнення. Висока концентрація ІЛ-8 у сечі може вказувати на нефрит бактеріальної або вірусної етіології. Підвищення концентрації ІЛ-10 у сироватці, на нашу думку, можливо при хронічному активному антитіло-опосередкованому відторгненні [4].

## ВИСНОВКИ

1. Маркерами хронічної дисфункції РАТ є підвищення концентрації в сироватці ІЛ-10 і β2-МГ, а в сечі – збільшення концентрації β2-МГ і ІЛ-8, і підвищення активності НАГ, ЛФ, АсАТ, ГГТ.
2. Ензимурія є маркером активної фази процесу пошкодження епітелію проксимального відділу нефрону.
3. Підвищення концентрації β2-МГ в сироватці крові може служити маркером гломерулярної дисфункції, а в сечі – тубулярної.
4. Концентрація ІЛ-2 і ІЛ-8 у сечі, а ІЛ-10 у сироватці пацієнтів з хронічною дисфункцією РАТ може вказувати на її етіологію.
5. Для визначення особливостей перебігу хронічної дисфункції РАТ найбільш корисними є позитивні результати β2-МГ сироватки і НАГ сечі, корисним є позитивний результат тесту на ІЛ-8 сечі і негативний результат тесту на β2-МГ сироватки.
6. Використання біомаркерів у комбінації здатне підвищити діагностичну цінність кожного з них окремо.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Про-( $\gamma$ -ІФ) та протизапальні (ІЛ-10, ТФР- $\beta$ ) цитокини та їх співвідношення як додаткові ознаки для диференційної діагностики стану ниркового алотрансплантату у віддаленому післяопераційному періоді [Текст] / *Р. О. Зограб'ян, В. Є. Дряньська, Г. М. Драннік, та ін.* // Український журнал нефрології та діалізу. – 2007. – **Вип. № 4, №16.** – С. 62-66.
2. Спосіб діагностики ступеня активності піелонефритичного процесу у дітей, хворих на піелонефрит. [Текст] / *Л. Я. Мигаль І. В. Багдасарова, О. О. Дащенко, та ін.* // Пат. на винахід N 82170 UA, МПК (2006), G 01 N33/48. N а 2007 03509, опубл. 11.03.2008. Бюл. N 5.
3. *Никоненко А. С.* Морфологический анализ причин поздней дисфункции почечного трансплантата [Текст] / *А. С. Никоненко* // Трансплантология. – 2007. – **Том 9, №1.** – С. 185-187.
4. Цитокины сыворотки крови и мочи как маркеры хронической дисфункции почечного аллотрансплантата. [Текст] / *А. С.Никоненко, А. В. Трайлин, М. В. Плетень, и др.* // Сучасні медичні технології – 2013. – **Вип. 4, №20.** – С. 69-73
5. Бета-2-микроглобулин и его роль в диагностике нефрологических заболеваний [Текст] / *В. С. Пилонович, Н. С. Сердюченко, В. Н. Аринчин, и др.* // Медицинский журнал. – 2011. – **Вип. 1.** – С. 80-83.
6. Диагностическое значение ферментемии и ферментурии у реципиентов с хронической дисфункцией почечного аллотрансплантата [Текст] / *М. В. Плетень, А. В. Трайлин, Н. Ф. Ефименко, и др.* // Экспериментальна та клінічна фізіологія і біохімія – 2013. – **Вип. 2.** – С. 90-96.
7. *Эмануэль В. Л.* Лабораторная диагностика заболеваний почек [Текст] / *В. Л. Эмануэль* // Изд. 2-е, испр. и доп. – СПб. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006. – 248 с.
8. Guidelines for Immunologic Laboratory Testing in the Rheumatic Diseases: An Introduction Arthritis & Rheumatism (Arthritis Care & Research) [Text] / American college of rheumatology ad hoc committee on immunologic testing guidelines. – 2002. – **Vol. 47, №4.** – P. 429-433.
9. TH1/TH2 cytokine analysis in Iranian renal transplant recipients [Text] / *A. Amirzargar, M. Lessan-Pezeshki, A Fathi, et al.* // Transplant. Proc. – 2005. – **Vol. 37, № 7.** – P. 2985-2987.
10. Tubular and glomerular proteinuria in diagnosing chronic allograft nephropathy with relevance to the degree of urinary albumin excretion [Text] / *T. Cieciura., A. Urbanowicz., A. Perkowska-Ptasinska, et al.* // Transplant Proc. – 2005. – **Vol. 37, №2.** – P. 987-990.
11. *Cornell L. R.* Kidney Transplantation: Mechanisms of Rejection [Text] / *L. R. Cornell, N. Smith, R. B. Colvin* // Acceptance Annual Review of Pathology. – 2008. – **Vol. 3.** – P. – 189-220.
12. Urinary clusterin, cystatin C, beta2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury [Text] / *F. Dieterle., E. Perentes, A. Cordier, et al.* // Nat. Biotechnol. – 2010. – **Vol. 28, № 5.** – P. 463-469.
13. Identifying specific causes of kidney allograft loss [Text] / *Z. M. El-Zoghby, M. D. Stegall, D. J. Lager, et al.* // Am. J. Transplant. – 2009. – **Vol. 9, № 3.** – P. 527-535.
14. *Gupta R. K.* Serum & urinary IL-2 levels as predictors in acute renal allograft rejection [Text] / *R. K. Gupta, M. Jain, R. K. Sharma* // Indian J. Med. Res. – 2004. – **Vol. 119, № 1.** – P. 24-27.
15. *Keown P. A.* Predicting long-term outcome in renal transplantation [Text] / *P. A. Keown* // Kidney International. – 2013. – **Vol. 84.** – P. 650-652.
16. *Lisowska-Myjak B.* Serum and Urinary Biomarkers of Acute Kidney Injury [Text] / *B. Lisowska-Myjak* // Blood Purif. – 2010. – **Vol. 29.** – P. 357-365.
17. Early expression profile of inflammatory markers and kidney allograft status [Text] / *D. O. McDaniel, D. A. Rigney, K. Y. McDaniel, et al.* // Transplant. Proc. – 2013. – **Vol. 45, № 4.** – P. 1520-1523.
18. Infiltrates in protocol biopsies from renal allografts [Text] / *M. Mengel, W. Gwinner, A. Schwarz, et al.* // Am. J. Transplant. – 2007. – **Vol. 7.** – P. 356-365.
19. *Nankivell B. J.* Rejection of the Kidney Allograft [Text] / *B. J. Nankivell* // N. Engl. J. Med. – 2010. – **Vol. 363.** – P.1451-1462.
20. Association of interleukin-10, interferon-gamma, transforming growth factor-beta, and tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms with long-term kidney allograft survival [Text] / *M. D. Omrani, M. R. Mokhtari, M. Bagheri, et al.* // Iran. J. Kidney Dis. – 2010. – **Vol. 4, № 2.** – P. 141-146.
21. A panel of urinary biomarkers to monitor reversibility of renal injury and a serum marker with improved potential to assess renal function [Text] / *J. S. Ozer., F. Dieterle, S. Troth, et al.* // Nat. Biotechnol. – 2010. – **Vol. 28.** – P. 486-494.
22. Chronic renal allograft injury: early detection, accurate diagnosis and management [Text] / *J. Pascual, M. J. Pérez-Sáez, M. Mir, et al.* // Transplant Rev (Orlando). – 2012. – **Vol. 26, № 4.** – P. 280-290.
23. Urinary chemokines and anti-inflammatory molecules in renal transplanted patients as potential biomarkers of graft function: a prospective study [Text] / *A. B. Pereira, A. L. Teixeira, N. A. Rezende, et al.* // Int. Urol. Nephrol. – 2012. – **Vol. 44, № 5.** – P. 1539-1548.
24. Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence [Text] / *J. Sellarés., D.G. de Freitas, M. Mengel, et al.* // Am. J. Transplant. – 2012. – **Vol. 12, № 2.** – P. 388-399.
25. Detection of subclinical tubular injury after renal transplantation: comparison of urine protein analysis with allograft histopathology [Text] / *S. Schaub, M. Mayr, G. Hönger, et al.* // Transplantation. – 2007. – **Vol. 84, № 1.** – P. 104-112.
26. *Schoenbach V. J.* Understanding the Fundamentals of Epidemiology: an Evolving Text. The phenomenon of disease [Text] / *V. J. Schoenbach, W. D. Rosamond* // Chapel Hill. – 2001. – Chapter 4. – P. 59-81.
27. *Sheu J. N.* The role of serum and urine interleukin-8 on acute pyelonephritis and subsequent renal scarring in children [Text] / *J. N. Sheu., S.M. Chen, M. H. Meng* // Pediatr. Infect. Dis. J. – 2009. – **Vol. 28, №10.** – P. 885-890.
28. Focal bacterial nephritis without pyuria in a boy presenting with high urinary  $\beta$ 2-MG and NAG levels [Text] / *H. Sekine, Y. Kawasaki, S. Ohara, et al.* // Fukushima J. Med. Sci. – 2014. – **Vol. 60, № 1.** – P. 91-94.
29. *Skálová S.* The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment [Text] / *S. Skálová* // Acta Medica. – 2005. – **Vol. 48.** – P. 75-80.
30. Measurement of tubular enzymuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit [Text] / *J. Westhuyzen, Z. H. Endre, G. Reece, et al.* // Nephrol. Dial. Transplant. – 2003. – **Vol. 18.** – P. 543-551.
31. *Woo J.* Albumin and beta2-Microglobulin Radioimmunoassays Applied to Monitoring of Renal-Allograft Function and in Differentiating Glomerular and Tubular Diseases [Text] / *J. Woo, M. Floyd, D. C. Cannon* // Lin. Chem. – 1981. – **Vol. 27, № 5.** – P. 709-713.
32. *Wu I.* Screening for kidney diseases: Older measures versus novel biomarkers [Text] / *I. Wu, C.R. Parikh* // Clin. J. Am. Soc. Nephrol. – 2008. – **Vol. 3.** – P. 1895-1901.



СТАТТЯ НА САЙТІ  
TRANSPLANTOLOGY.ORG

Автори підтверджують відсутність можливих конфліктів інтересів.

Надійшла до редакції 02.03.2015 р.

Прийнята до друку 29.04.2015 р.