УДК 616.61-002-036.66:616.5-002.525.2

Определение иммунологически активных молекул в моче для прогнозирования течения волчаночного нефрита

Чиж К. А., Рябцева Т. В.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Статья посвящена поиску биологических маркеров для ранней диагностики и прогнозирования течения волчаночного нефрита у пациентов с системной красной волчанкой. С помощью современных методов молекулярной иммунологии и статистического анализа авторы статьи исследовали информативность определения в моче пациентов ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-2, TGFβ, C4, C3, C1q. По результатам выполненной работы установлено, что молекулы C4, C1q, ИЛ-13 и ИЛ-6 могут быть рекомендованы для определения в моче пациентов с системной красной волчанкой в качестве биомаркеров для прогнозирования развития и течения волчаночного нефрита.

Ключевые слова: системная красная волчанка, волчаночный нефрит, биомаркеры, компоненты системы комплемента, интерлейкины.

Введение. Системная красная волчанка (СКВ) относится к группе системных заболеваний соединительной ткани со сложным патогенезом с гиперпродукцией органонеспецифических аутоантител и поражением многих органов и систем организма. В патогенезе заболевания принимают участие разнообразные механизмы, в частности отсутствие способности к удалению апоптозных телец, гиперактивность аутореактивных В- и Т-лимфоцитов, аномальное воздействие аутоантигенов и повышенные уровни цитокинов, стимулирующих В-лимфоциты. Поражение почек в виде вторичного гломерулонефрита, известного под названием «волчаночный нефрит» (ВН), встречается у 30–60 % взрослых пациентов и почти у 70 % детей с СКВ. Следовательно, почки представляют собой один из основных органов-мишеней при волчанке, поражение которых приводит к более тяжелому течению заболевания и увеличению летальности у этих пациентов [1].

Несмотря на имеющиеся руководства по лечению ВН и разработанные терапевтические схемы с применением иммуносупрессивных лекарственных средств, у 10–20 % пациентов с СКВ в течение 5 лет после установления диагноза развивается терминальная стадия хронической почечной недостаточности, а при наличии ВН III–V морфологических типов у 40 % пациентов отмечается прогрессирование хронической болезни почек (ХБП).

На сегодняшний день золотым стандартом диагностики ВН, его классификации и определения степени активности и/или хронизации считается проведение прижизненной пункционной биопсии почек. Результатами, полученными при проведении нефробиопсии, часто руководствуются при выборе определенных терапевтических схем с использованием иммуносупрессивных лекарственных средств. Однако существующая морфологическая классификация ВН является трудно воспроизводимой, что вызывает сомнения относительно ее повседневного клинического применения [2]. По-

мимо этого, текущая классификация не учитывает ряд важных гистологических параметров: наличие тромботической микроангиопатии, сосудистые поражения, волчаночную васкулопатию, подоцитопатию, некоторые признаки повреждения тубулоинтерстициального компонента, оказывающих существенное влияние на принятие решения об использовании различных терапевтических подходов и связанных с худшим прогнозом ВН. Более того, результаты нефробиопсии не позволяют предсказать ответ того или иного пациента на проводимую иммуносупрессивную терапию, а сама процедура является достаточно дорогостоящей и рискованной, имеющей сложности при длительном мониторинге за течением ВН, поскольку требует ее повторных проведений в динамике.

С учетом изложенных проблем в последние десятилетия проводится постоянный поиск так называемых биологических маркеров, изучаемых в сыворотке крови и моче пациентов с ВН, с целью уточнения характера течения патологических процессов в почечной ткани, выбора адекватного лечения и оценки его эффективности, а также возможного предсказания осложнений и исходов. При ВН детально исследованы традиционные маркеры активности заболевания (как со стороны почек, так и в целом СКВ). Эти параметры хорошо известны: протеинурия, соотношение белок/креатинин в разовой порции мочи, суточная протеинурия, клиренс креатинина, уровни антител к двухцепочечной ДНК и компоненты комплемента в сыворотке крови. Однако эти биомаркеры оказались недостаточно точными для прогнозирования рецидива, точного мониторинга ответа на проводимое лечение или определения степени активности заболевания и хронического повреждения. Вместе с тем исследованные в последние годы некоторые «нетрадиционные» биомаркеры показали корреляционную связь с имеющимися гистологическими изменениями при различных классах ВН. В этой связи продолжаются исследования новых потенциальных биомаркеров.

Биомаркер является биологическим, генетическим или химическим показателем, поддающимся объективному измерению и оценке в качестве индикатора нормальных биологических процессов, патологических процессов или фармакологических реакций на терапевтическое вмешательство. Идеальный биомаркерВН должен обладать следующими свойствами: 1) быть специфичным для поражения почек; 2) иметь хорошую корреляцию с активностью или повреждением почек; 3) быть полезным для серийного мониторинга; 4) превосходить стандартные клинические или лабораторные параметры; 5) обладать способностью оценивать тяжесть поражения почек; 6) быть экономичным; 7) простым и доступным при использовании в большинстве клинических лабораторий [3].

В отличие от других источников проб (сыворотка или ткань), получение мочи не является инвазивной процедурой, и ее можно легко собрать, что позволяет проводить последовательный отбор проб. В случае ВН моча физически находится близко к месту патологического очага, являясь подходящим образцом для исследования. У пациентов с СКВ изучались концентрации в моче ряда цитокинов, участвующих в адаптивных и врожденных иммунных ответах и потенциально играющих роль в патофизиологии ВН. В литературе описаны исследования по ФНО-подобному слабому индуктору апоптоза (TWEAK), интерлейкинам-6, -8, -17 (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-17), хемоаттрактантному белку-1 моноцитов (MCP-1), регулятору активации, экспрессии и секреции нормальных Т-клеток (RANTES), липокалину, ассоциированному с желатиназой нейтрофилов (NGAL), молекуле адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM), молекуле межклеточной адгезии-1 (ICAM), молекуле-1 повреждения почки (КИМ-1), фактору роста эндотелия сосудов (VEGF), трансформирующему фактору роста-бета (TGF-β) и многим другим [4].

Волчаночный нефрит является одним из наиболее тяжелых осложнений системной красной волчанки — аутоиммунного ревматического заболевания, в основе патогенеза которого лежат дефекты иммунорегуляции, приводящие к неконтролируемой гиперпродукции аутоантител к компонентам собственных тканей и развитию хронического воспаления. Установлено, что формирование циркулирующих иммунных комплексов, которые откладываются на базальных мембранах почек, вызывают их повреждение и воспаление, что приводит к продукции ими медиаторов воспаления, обеспечивающих миграцию лейкоцитов и моноцитов в область повреждения и формированию воспалительного инфильтрата.

Для ранней диагностики развития аутоиммунного процесса в почках и возможности предсказания развития обострения необходимо исследовать информативность определения различных иммунологических показателей в моче пациентов с СКВ.

Цель работы — исследование целесообразности и информативности определения иммунологических маркеров (ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-13, ИЛ-2, TGFβ, C4, C3, C1q) методом иммуноферментного анализа в моче пациентов с СКВ для прогнозирования развития и клинического течения ВН.

Материалы и методы. В исследование включено 22 пациента с системной красной волчанкой с морфологически верифицированным волчаночным нефритом. Из них 3 мужчин и 19 женщин, средний возраст 31,7 года. В зависимости от результатов клинических, лабораторных и морфологических данных пациенты разделены на две группы, по 11 человек каждая, в зависимости от наличия или отсутствия обострения нефрита.

Обострение ВН диагностировали при условии:

- увеличения степени протеинурии свыше 0,5 г/сут при ее отсутствии в предыдущих анализах мочи и более 1,0 г/сут при исходном уровне протеинурии менее 0,5 г/сут, а также удвоения степени протеинурии при исходном уровне более 0,5 г/сут;
- появления изменений в мочевом осадке (эритроцитурия свыше 3 в поле зрения, лейкоцитурия свыше 5 в поле зрения, наличие цилиндрурии) или его существенном ухудшении (большое количество форменных элементов крови, появление цилиндрурии при ее отсутствии ранее); при этом исключаются другие причины изменений в анализах мочи (урологические заболевания, гинекологическая патология, лекарственная терапия, физиологические особенности и т. д.);
- нарушения (ухудшения) функционального состояния почек (повышение уровней сывороточного креатинина выше нормальных значений, снижение показателя скорости клубочковой фильтрации (СКФ) ниже 60 мл/мин/1,73 м^2 либо повышение уровней креатинина сыворотки и снижения показателя СКФ на 30 % от исходного уровня).

Полная клиническая ремиссия ВН достигалась:

- при протеинурии менее 0,5 г/сут;
- стабильном или снизившимся до нормальных (или до исходных) значений уровене креатинина крови;
- отсутствии активного мочевого осадка.

К частичной ремиссии ВН относили случаи, сопровождающиеся:

- снижением исходной протеинурии более, чем на 50 %, но меньше 1,5 г/сут;
- стабильный или снизившийся уровень креатинина крови.

Расчетная СКФ определялась с помощью формулы CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration Formula, 2009, 2012). В случае снижения СКФ ниже 30 мл/мин/1,73 м^2 использовали расчет клиренса креатинина по суточной моче (формула Реберга – Тареева).

Группы контроля и исследования не отличались по полу, возрасту и длительности заболевания. Длительность ВН в группе пациентов с ремиссией оказалась выше в 2,5 раза. У этих же пациентов почти в половине случаев фигурировал диагноз антифосфолипидного синдрома (АФС), который не отмечен ни у одного пациента с обострением ВН. В два раза чаще при ремиссии ВН отмечается синдром артериальной гипертензии. Не отмечено существенной разницы между группами в отношении морфологических классов ВН и гистологического индекса хронизации, стадий ХБП, показателя СКФ, биохимических параметров крови и клеточного состава в общем анализе крови, а также уровнях иммуноглобулинов. Подробная клинико-лабораторная характеристика групп пациентов с ВН приведена в таблице 1.

Таблица 1 — Клинико-лабораторная характеристика течения ВН у пациентов с СКВ

Признак		Группа «Обострение» *n* = 11 (100 %) Me (25–75 процентилей)	Группа «Ремиссия» *n* = 11 (100 %) Me (25–75 процентилей)
Пол	М	2 (18,2 %)	1 (9,1 %)
	Ж	9 (81,8 %)	10 (90,9 %)
Возраст (лет)		27,0 (25,5–35,5)	30,5 (28,3–36,8)
Длительность СКВ, годы		2,0 (0,3–7,0)	2,0 (0,1–6,5)
Длительность ВН, годы		2,0 (0,1–6,5)	5,0 (3,5–7,3)*
АФС, %		0	5 (45,4 %)*
Артериальная гипертензия, %		2 (18,2 %)	4 (36,4 %)*
Нефротический синдром, %		6 (54,6 %)	0*
Изолированный мочевой синдром, %		5 (45,4 %)	11 (100 %)*
Индекс Selena-SLEDAI		12,5 (10,0–13,5)	3,6 (2,0–4,25)*

Окончание табл. 1

Признак	Группа «Обострение» n = 11 (100 %) Me (25–75 процентилей)	Группа «Ремиссия» n = 11 (100 %) Me (25–75 процентилей)
Морфологический класс 3	6 (54,5 %)	6 (54,5 %)
Морфологический класс 4	5 (45,5 %)	4 (36,4 %)
Морфологический класс 5	0	1 (9,1 %)
ХБП, стадия 1, %	8 (72,7 %)	6 (54,5 %)
ХБП, стадия 2, %	2 (18,2 %)	3 (27,3 %)
ХБП, стадия 3, %	1 (9,1 %)	2 (18,2 %)
ИА, баллы	8,0 (6,0–10,0)	3,0 (2,3–3,0)*
ИХ, баллы	3,0 (1,0–5,0)	3,5 (1,25–5,0)
СКФ, мл/мин	109 (86–121)	100 (81–117)
Суточная протеинурия, г/сут	2,33 (0,72–2,54)	0,13 (0,04–0,30)*
Протеинурия, г/л	2,07 (1,08–2,65)	0,31 (0,00–0,48)*
Наличие гематурии, %	9 (81,8 %)	2 (18,2 %)*
Наличие лейкоцитурии, %	1 (9,1 %)	1 (9,1 %)
Наличие цилиндрурии, %	6 (54,5 %)	0*
Лейкоциты крови, х 10^9	6,18 (4,10–10,35)	6,77 (6,22–8,12)
Лимфоциты крови, %	24,0 (23,5–27,5)	21,0 (19,0–29,2)
Тромбоциты, х 10^6	318,7 (205,3–329,0)	203,7 (144,5–287,3)
СОЭ, мм/час	19 (12–38)	4 (4–13)*
Гемоглобин, г/л	118,8 (110,7–128,1)	127,2 (120,9–136,7)
Креатинин крови, мкмоль/л	63,1 (60,4–81,25)	73,2 (54,6–94,5)
Мочевина крови, ммоль/л	4,9 (4,3–7,8)	5,7 (4,8–8,3)
Общий белок крови, г/л	61,3 (56,3–66,5)	63,0 (60,6–68,3)
Глюкоза крови, ммоль/л	4,8 (4,5–5,1)	4,5 (4,4–4,6)
Холестерин крови, ммоль/л	5,3 (4,8–6,8)	4,9 (4,6–6,1)
IgG, г/л	8,3 (5,8–11,9)	8,8 (7,9–10,7)
IgA, г/л	2,9 (2,2–3,2)	1,6 (1,5–2,0)
IgM, г/л	0,7 (0,7–0,9)	0,7 (0,5–0,8)
C3, мг/дл	61,0 (50,0–76,0)	94,5 (81,0–99,0)*
C4, мг/дл	11,3 (6,7–15,9)	21,1 (17,0–22,7)*
ANA, % положительных результатов	4 (36,4 %)	2 (18,2 %)*
Anti-dsDNA, % положительных результатов	5 (45,4 %)	4 (36,4 %)
Антитела к фосфолипидам, % положительных результатов	5 (45,4 %)	4 (36,4 %)

Примечание. АФС — антифосфолипидный синдром; ИА — индекс активности; ИХ — индекс хронизации; СОЭ — скорость оседания эритроцитов; IgA — иммуноглобулин A; IgG — иммуноглобулин G; IgM — иммуноглобулин M; C3 и C4 — компоненты системы комплемента; ANA — антинуклеарные антитела; Anti-dsDNA — антитела к двухцепочечной ДНК.

* Статистически значимая разница между выборками с $p < 0,05$.

Вместе с тем в группе обострения ВН ожидаемо чаще отмечался нефротический синдром и остронефритический синдром, проявления гематурии и цилиндрурии, наблюдался более высокий уровень протеинурии, СОЭ, морфологического индекса активности, титров АНА и антител к двухцепочечной ДНК, а также более низкие концентрации C3 и C4 компонентов комплемента. Соответственно, в группе обострения отмечалась более высокая активность СКВ, что подтверждается более чем трехкратным превышением индекса Selena-SLEDAI.

Результаты и их обсуждение. Результаты исследований показали, что у пациентов с СКВ и признаками ВН (СКВ+ВН) во время обострений нефрита в моче обнаруживается статистически достоверное увеличение концентрации компонентов системы комплемента, концентрация С4 увеличивается в 1,3 раза, С1q — в 3,6 раза. Статистически значимых изменений в концентрации в моче С3 компонента комплемента обнаружено не было (таблица 2).

Таблица 2 — Концентрация компонентов системы комплемента в моче пациентов с СКВ с ВН

Компоненты системы комплемента	СКВ+ВН (обострение)	СКВ+ВН (ремиссия)
С4, мкг/мл	61,0 (50,9–63,6)*	48,3 (43,2–50,9)
С3, нг/мл	75,35 (61,40–120,01)	72,56 (23,12–162,68)
С1q, нг/мл	0,4575 (0,2070–0,6160)*	0,1260 (0,0900–0,1570)

* Статистически значимая разница между выборками с $p < 0,05$ (тест Манна – Уитни).

Классический путь комплемента активируют комплексы антиген-антитело (иммунные комплексы). Первым этапом является взаимодействие белка С1q с одним из доменов IgG или IgM. Далее происходит присоединение и активация С4 компонента, затем С2. Комплекс С4b2a связывает и расщеплет С3. Комплекс С4b2a3b связывает и расщепляет С5. Затем активируется процесс образования мембраноатакующего комплекса, что и приводит к разрушению клеток, на мембране которых запускается каскад системы комплемента.

Повышение концентрации компонентов комплемента классического пути активации в моче пациентов с ВН при обострении может свидетельствовать об участии системы комплемента в развитии ВН и являться маркером развития обострений и течения ВН. Данный факт подтверждает обнаруженная нами прямая корреляция ($r = 0,79$; $p < 0,05$) между концентрацией С4 в моче пациентов с ВН и коэффициентом Selena-SLEDAI (рисунок 1).

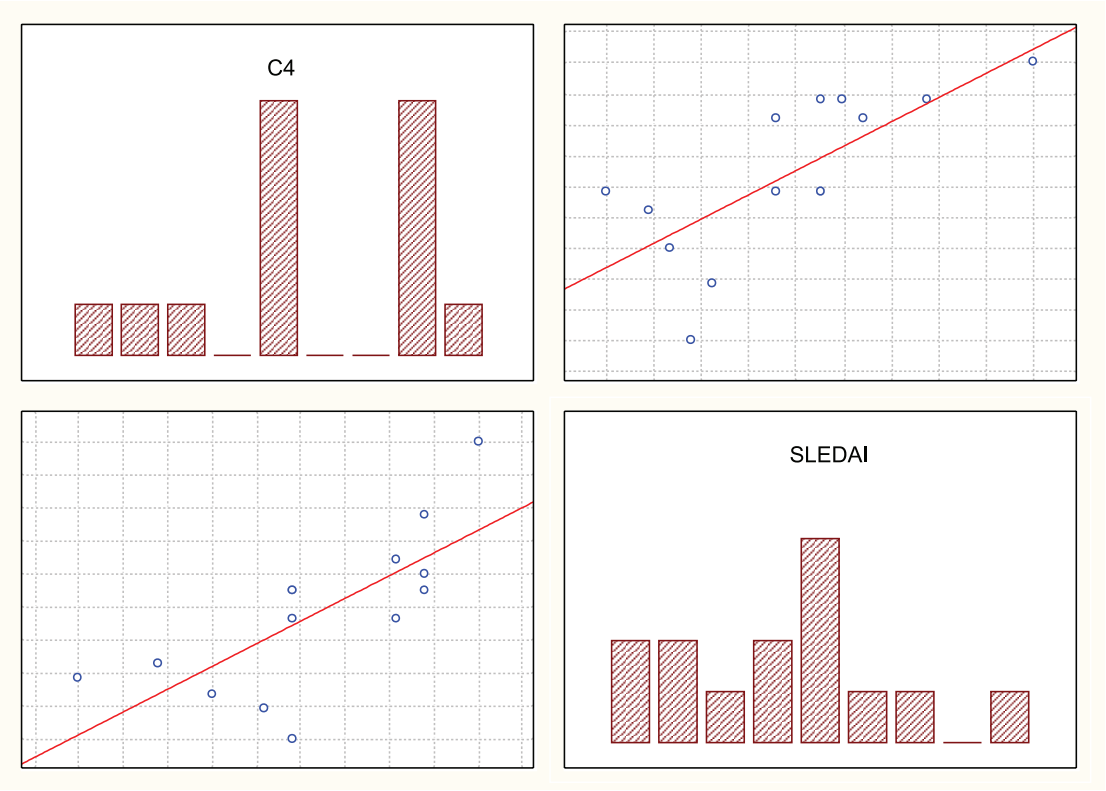

Рисунок 1 — Корреляционный анализ показателя Selena-SLEDAI с концентрацией компонента комплемента С4 в моче пациентов с ВН

Об участии белков системы комплемента в локальном аутоиммунном воспалении в почках при развитии ВН у пациентов с СКВ свидетельствует и тот факт, что концентрация к C1q в моче пациентов с СКВ с клиническими признаками ВН в 2,3 раза превышает концентрацию данной молекулы в моче пациентов без ВН (рисунок 2).

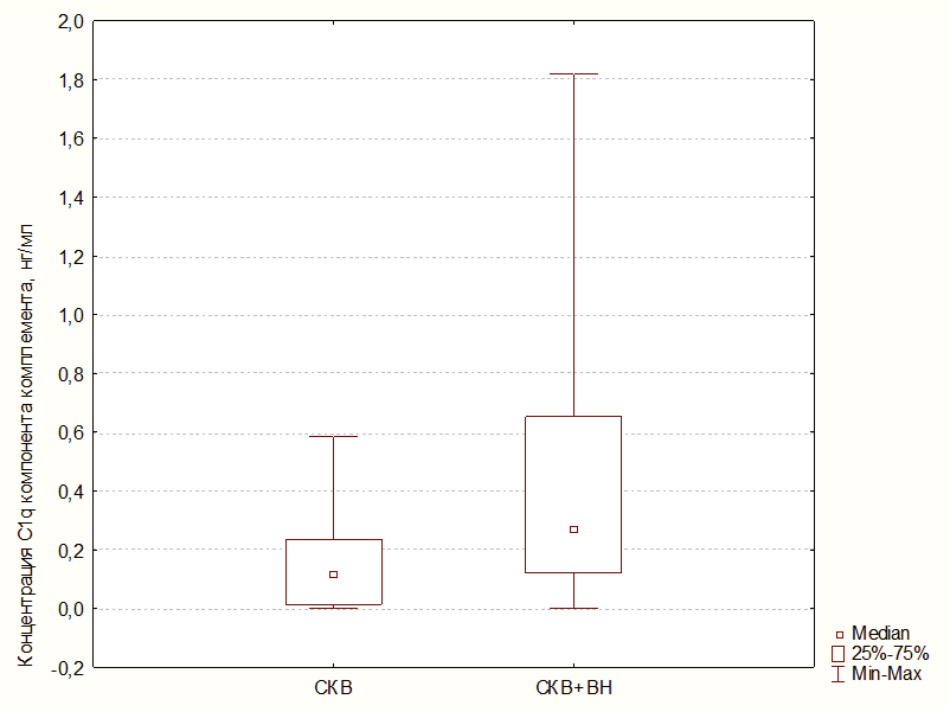

Рисунок 2 — Концентрация C1q в моче пациентов с СКВ

Определение концентрации цитокинов в моче показало статистически значимые разнонаправленные изменения в концентрации ИЛ-13 и ИЛ-6. При обострении у пациентов с СКВ+ВН концентрация ИЛ-13 снижалась в 2,5 раза, а концентрация ИЛ-6 увеличивалась в 4 раза. Статистически значимой разницы в концентрации других исследуемых цитокинов не выявлено (таблица 3).

Таблица 3 — Концентрация цитокинов в моче пациентов с СКВ + ВН, нг/мл

Цитокины	СКВ + ВН	
	Обострение	Ремиссия
ИЛ-6	41,13 (25,75–72,24)*	2,05 (0,00–10,20)
ИЛ-8	24,09 (15,96–42,13)	9,37 (7,85–124,37)
ИЛ-4	12,28 (3,00–18,97)	13,56 (12,12–21,21)
ИЛ-13	64,15 (54,20–98,45)*	161,50 (115,04–232,30)
ИЛ-2	10,76 (6,52–14,61)	9,26 (5,48–10,83)
TGF-β	14,60 (13,80–15,20)	15,20 (14,90–15,40)

* Статистически значимая разница между выборками с $p < 0,05$ (тест Манна – Уитни).

Таким образом, ИЛ-6 является одним из системных эндогенных цитокинов с широким набором как клеток-продуцентов, так и клеток-мишеней. Активированные моноциты, а также мезангиальные клетки и эпителиоциты почечных канальцев продуцируют ИЛ-6 и альфа-фактор некроза опухоли (ФНО-α). Эти цитокины могут увеличивать клеточную экспрессию молекул адгезии в эндотелиальных клетках клубочков. ИЛ-6 в исследованиях называют маркером развития патологии почек при СКВ. По данным научной литературы, у пациентов с люпус-нефритом отмечается повышение концентрации ИЛ-6 и рецептора к ИЛ-6 в плазме [5, 6]. В нашем исследовании была обнаружена прямая

($r = 0,56$), статистически значимая ($p < 0,05$) корреляция концентрации ИЛ-6 в моче пациентов с показателем Selena-SLEDAI.

Интерлейкин-13 оказывает действие на иммунные клетки, подобное действию близкородственного цитокина ИЛ-4. Предполагается, что ИЛ-13 является центральным медиатором физиологических изменений, вызванных аллергическим воспалением во многих тканях. В исследованиях *in vitro* показано, что ИЛ-13 индуцирует альтернативно активированные макрофаги М2, которые характеризуются экспрессией противовоспалительного цитокина ИЛ-10 [7]. Участие ИЛ-13 в угнетении аутоиммунного воспаления в почках у пациентов с ВН подтверждается наличием обратной корреляции концентрации ИЛ-13 в моче ($r = -0,71$; $p < 0,05$) с показателем Selena-SLEDAI.

Заключение. Таким образом, иммунологически активные молекулы С4, С1q, ИЛ-13 и ИЛ-6 можно рекомендовать для определения в моче пациентов с СКВ+ВН в качестве биомаркеровдля прогнозирования развития и течения волчаночного нефрита. Поскольку данные показатели коррелируют с активностью системной красной волчанки и признаками обострения волчаночного нефрита, их можно использовать в ранней диагностике почечных обострений, что в свою очередь позволит выбрать адекватные терапевтические схемы.

Литература

1. Davidson, A. What is damaging the kidney in lupus nephritis? / A. Davidson // Nat. Rev. Rheumatol. — 2016. –№ 12. — P. 143–153.

2. Restrepo-Escobar, M. Systematic review of the literature on reproducibility of the interpretation of renal biopsy in lupus nephritis / M. Restrepo-Escobar, P. A. Granda-Carvajal, F. Jaimes // Lupus. — 2017. — Vol. 26. — P. 1502–1512.

3. Birmingham, D. J. Biomarkers of lupus nephritis histology and flare: deciphering the relevant amidst the noise / D. J. Birmingham, M. Merchant, S. S. Waikar // Nephrol. Dial. Transplant. — 2017. — Vol. 32. — P. i71–i79.

4. Urinary biomarkers in lupus nephritis / C. C. Aragon [et al.] // J. of Translational Autoimmunity. — 2020. — № 3. –P. 1–13.

5. The Role of Cytokine in the Lupus Nephritis / Y. Iwata [et al.] // J. of Biomedicine and Biotechnology. — 2011. DOI: 10.1155/2011/594809.

6. Jacob, N. Cytokine disturbances in systemic lupus erythematosus / N. Jacob, W. Stohl, N. Stohl // Arthritis Research & Therapy. — 2011. — Vol. 13. — P. 228–238. DOI://arthritis–research.com/content/13/4/228.

7. Gordon, F. Immunity Review Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions / S. Gordon, F. O. Martinez, W. Dunn // Immunity. — 2010. — Vol. 32. — P. 523–604. DOI 10.1016/j.immuni.2010.05.007.

Immunologically active molecules in the urine for the predictionof lupus nephritis course

Chyzh K. A., Ryabtseva T. V.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

The article is devoted to the early diagnosis and prediction of the lupus nephritis course in patients with systemic lupus erythematosus. The main objective is to search the biological markers to predict the nephritis development. Using modern molecular immunology methods and statistical analysis, the authors investigate the informativeness of determining such immunological markers as IL-6, IL-8, IL-4, IL-13, IL-2, TGF-β, C4, C3, C1q. As a result, it was proved that the molecules C4, C1q, IL-13 and IL-6 can be recommended for determination in the urine of patients with systemic lupus erythematosus as biomarkers for predicting the development and lupus nephritiscourse.

Keywords: systemic lupus erythematosus, lupus nephritis, biomarkers, components of the complement system, interleukins.

Поступила 09.06.2021