

© И.А.Козыро, А.В.Сукало, 2015
УДК 616.61-002-07-053.32:575.17

И.А. Козыро¹, А.В. Сукало¹

НОВЫЕ МАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ ЛЮПУС-НЕФРИТА У ДЕТЕЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ 1-я кафедра детских болезней Белорусского государственного медицинского университета, г. Минск, Беларусь

I.A. Kazyra¹, A.V. Sukalo¹

NEW MARKERS IN THE DIAGNOSTICS OF LUPUS NEPHRITIS IN CHILDREN (LITERATURE REVIEW)

¹Department №1 of the Pediatrics of the Belarus State Medical University, Minsk, Belarus

РЕФЕРАТ

В обзоре литературы представлены современные знания о новых маркерах, применяемых для диагностики и мониторинга активности волчаночного нефрита у детей, что может быть использовано в практической работе педиатра-нефролога для оптимизации проводимого лечения и определения его продолжительности.

Ключевые слова: люпус-нефрит, дети, антитела, цитокины, микро-РНК.

ABSTRACT

Review presents the present knowledge of the new markers for diagnostics and monitoring the activity of lupus nephritis in children, which can be used in practice of pediatric-nephrologist to optimize the treatment and determine its duration.

Key words: lupus nephritis, children, antibodies, cytokines, micro-RNAs.

Системная красная волчанка (СКВ) – аутоиммунное заболевание, при котором разнообразные иммунологические события приводят к клинической картине, характеризующейся широким спектром проявлений и поражением органов-мишеней с непредсказуемыми периодами обострений и ремиссий [1].

Такие факторы, как пол, раса, этническая принадлежность играют важную роль в распространённости заболевания, частоте его проявлений и ответе на лечение. При СКВ в патологический процесс, как правило, вовлекаются несколько органов и систем, в том числе суставы, кожа, мозг, сердце, легкие, кровеносные сосуды и почки. Люпус-нефрит (ЛН) является одним из наиболее серьезных проявлений СКВ и остается основным предиктором неблагоприятного прогноза [2].

Заболеваемость и распространённость люпус-нефрита варьирует в зависимости от изучаемой популяции. Так, кумулятивная частота выше у людей азиатского (55%), африканского (51%) и испано-язычного (43%) происхождения по сравнению с лицами кавказской национальности (14%)

[2]. Поражение почек при СКВ, дебютировавшей в детском возрасте, случается до 80% случаев, в сравнении с теми, у кого манифестация заболевания произошла во взрослой жизни (до 40%). ЛН нередко является стартовым синдромом при СКВ. В детском возрасте заболевание ассоциируется с более серьезным полиорганным поражением и агрессивной терапией по сравнению со взрослыми. Примерно в 44% у детей с ЛН хроническая почечная недостаточность формируется уже в молодом взрослом возрасте [3].

При СКВ чаще страдают представительницы женского пола, чем мужского (5–10:1). Большинство случаев СКВ приходится на подростковый и молодой возраст [4,5].

Выживаемость при СКВ за последние 20 лет значительно повысилась. Благодаря рациональному применению глюкокортикостероидов и цитостатиков 10-летняя выживаемость пациентов с СКВ на сегодняшний день достигает 90%. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении этого заболевания, продолжительность жизни существенно ниже у детей в сравнении с взрослыми, а риск смерти превышает популяционный в 4 раза в отличие от взрослых пациентов (в 2,5 раза) [2–5].

Козыро Н.А. 220116, Республика Беларусь, г. Минск, пр. Дзержинского, д. 83. 1-я кафедра детских болезней Учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет». E-mail: kozyroia@mail.ru

Исход заболевания определяется ранним назначением иммуносупрессивной терапии на основании выявления маркеров неблагоприятного прогноза в дебюте.

Считают, что на сегодняшний день не существует ни одного «универсального» специфического для ЛН маркера, позволяющего проводить раннюю диагностику, мониторинг активности непосредственно нефрита, что указывает на необходимость поиска наиболее чувствительных и специфичных предикторов обострения почечного процесса для оптимизации лечения и прогноза при данном заболевании [6].

Для диагностики СКВ традиционно используются критерии, предложенные Американской ассоциацией ревматологов (1997) [5]. «Золотым стандартом» для верификации люпус-нефрита считается морфологическое исследование биоптатов почечной ткани с выделением класса, индексов «активности и хронизации», согласно классификации Международного общества нефрологов (International Society of Nephrology, ISN) и Общества патоморфологов (Renal Pathology Society, RPS) ISN/RPS (2004) [5].

Выполнение биопсии почки проводят у всех пациентов с СКВ при наличии патологических изменений в моче, по мнению некоторых авторов, даже при отсутствии изменений, поскольку прогноз во многом зависит от морфологических особенностей заболевания. Внедрение в протокол исследования электронной микроскопии позволило доказать вовлечение в процесс почек практически во всех случаях СКВ, даже при отсутствии мочевого синдрома. И хотя более тяжелые морфологические изменения часто соответствуют и более ярким клиническим и иммунологическим проявлениям, гистологическая картина не может быть с уверенностью предсказана, исходя только из особенностей клиники [7].

Морфология люпус-нефрита отличается значительным полиморфизмом, как в различных клубочках, так и в пределах одного клубочка. Специфических светооптических признаков люпус-нефрита не выделено, однако существуют характерные электронно-микроскопические изменения, представленные отложением субэпителиальных и субэндотелиальных иммунных депозитов по типу «отпечатков пальца» [7]. Иммунные депозиты включают как иммуноглобулины различных классов, так и компоненты комплемента. Для характеристики изменений в связи с полиморфизмом картины в англоязычной литературе используют термин «full house» [7]. При люпус-нефрите в процесс могут вовлекаться и другие структурные эле-

менты почечной ткани – канальцы, интерстиций, сосуды, чему в классификации ISN/RPS не уделено достаточного внимания [8].

Данные о прогностической роли как класса люпус-нефрита, так и индексов «хронизации и активности» довольно противоречивы и сильно варьируют в зависимости от возрастных, половых и этнических характеристик выборки. Кроме того, в некоторых крупных исследованиях, проводивших анализ многократных биопсий до и после лечения, продемонстрировано изменение класса люпус-нефрита, а также индексов «активности и хронизации» в течение развития заболевания. Вместе с этим, меняется и прогноз люпус-нефрита, так же как и необходимость в агрессивной иммуносупрессивной терапии [9].

Поиск новых стратегий воздействия на заболевание на сегодняшний день связан с механизмами, основанными на биологических характеристиках процесса. Прогресс в области молекулярных биотехнологий открыл значительные возможности для индивидуальной характеристики и обеспечил возможность развития новых диагностических и терапевтических подходов [10].

С целью планирования терапии крайне важна идентификация пациентов с факторами риска прогрессирования заболевания. В первую очередь, это касается детей, у которых отсутствует эффект при лечении согласно современным стандартным протоколам, а также пациентов с изначально неблагоприятными в плане прогноза формами заболевания. В связи с этим значительно возрастает интерес к поиску новых «биомаркеров» лекарственной резистентности, предикторов ближайшего и отдаленного прогноза люпус-нефрита [11].

В настоящее время основной причиной смерти при СКВ являются инфекции, возникающие либо вследствие недостаточности иммунной системы, которая вызвана самим заболеванием, либо агрессивной иммуносупрессивной терапии. Именно иммунным нарушениям отводится ключевая роль в развитии и прогрессировании СКВ [4, 5].

В основе СКВ лежит генетически обусловленное несовершенство множества иммунорегуляторных механизмов, что реализуется образованием большого количества гетерогенных аутоантител (аутоАТ) к собственным клеткам организма и их структурам. Это мультигенное и мультифакториальное заболевание с потерей иммунологической толерантности и продукцией аутоАТ, направленных, главным образом, против ядерных антигенов (АГ) (антинуклеосомных и АТ к двуспиральной ДНК). Формирующиеся в результате этого иммун-

ные комплексы (ИК), фиксируясь на клеточных структурах микрососудистого русла многих органов и систем организма, ведут к развитию там иммунного воспаления, что проявляется клиническим полиморфизмом и системной полиорганностью. Ранние депозиты ИК включают АТ к нуклеосоме, ДНК, экстрагируемому ядерному АГ, антирибонуклеопротеину, против C1q-комплемента и продуктов распада C3-, C4-компонентов, а также ряд побочных продуктов неэффективного фагоцитоза апоптотных телец.

АТ к ядру и его компонентам (АТ к двуспиральной ДНК, антинуклеарные АТ, anti-Ro, anti-Smith и др.) традиционно считаются одними из главных признаков активности заболевания. Именно ДНК-содержащие иммунные комплексы наиболее агрессивны и вызывают крайне тяжелые поражения почек и ЦНС. Важное значение для клинициста приобретает определение уровня антиядерных АТ в динамике с целью оценки течения заболевания и эффективности терапии.

В качестве АГ выступают нуклеосомы (гистоны/ДНК), конъюгированные с АТ к двуспиральной ДНК, откладывающиеся в мезангии клубочковой и интерстициальной ткани, в проксимальных трубчатых эпителиальных клетках [5]. Циркулирующие нуклеосомы ассоциируются с протеиновыми маркерами апоптоза. Как известно, дефекты апоптоза относятся к фундаментальным нарушениям в иммунной системе у больных с СКВ. С одной стороны, высокий уровень нуклеосом ведет к усилению апоптоза лимфоцитов, а с другой стороны – может способствовать нарушению удаления клеток, подвергшихся апоптозу [5].

Депозиты ИК инициируют высвобождение провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких как хемоаттрактант моноцитов протеина-1 (MCP-1), ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО α и молекул клеточной адгезии (СAM), вызывая миграцию и инфильтрацию клеток воспаления, поддерживая развитие хронического воспалительного процесса. Нарушение гомеостаза цитокинов может приводить к пролиферации мезангиоцитов, формированию полулуний и прогрессированию склеротических и фиброзных процессов [6, 8].

Патогенетические механизмы при СКВ включают разбалансированность функционирования специфического клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Отмечается снижение CD8-клеток, повышение CD4, нарушение баланса Th1 и Th2 с преобладанием Th1-лимфоцитов, что является причиной синтеза цитокинов с провоспалительной и нетолерогенной активностью, ведущих к

поликлональной активации и снижению толерантности В-лимфоцитов. Ключевым цитокином для вовлечения В-клеток в воспалительный процесс считается фактор активации В-лимфоцитов –BAFF, для Т-клеток – RANTES (CCL5) (его экспрессия ассоциируется непосредственно с почечным повреждением). Работами ряда авторов показано повышение провоспалительных молекул BAFF и RANTES в сыворотке крови у пациентов с активным люпус-нефритом как у взрослых, так и у детей [8, 11].

Одни АТ, неконтролируемо продуцируемые аутореактивными В-лимфоцитами, могут оказывать прямое повреждающее действие на ткани, другие – осуществляют свою агрессивную направленность через иммунорегуляцию Т-клеток, образование ИК и активацию комплемента. Комплемент непосредственно или с помощью активированных лимфоцитов повреждает почечную ткань, что, в свою очередь, увеличивает высвобождение целой сети провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6 и TNF- α), хемокинов MCP-1, RANTES, TWEAK и активацию молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1), усиливая иммунную реакцию. Молекулы васкулярной клеточной адгезии участвуют в регуляции миграции лейкоцитов. Установлены достоверно позитивные корреляции концентрации VCAM сыворотки крови (sVCAM) с активностью ЛН, что рекомендуется использовать в клинической практике для мониторинга эффективности проводимой терапии [8, 10, 11].

Об интенсивности формирования ИК, откладывающихся в клубочках почек, косвенно судят по содержанию сывороточного комплемента или его компонентов, прежде всего C3 и C4. Снижение сывороточного C3 и особенно C4 является маркером активности СКВ. Однако представляют интерес данные о том, что низкий уровень C4 может быть следствием генетических причин, в то время как повышение уровня C3 и C4, как острофазных протеинов, может наблюдаться в период обострения заболевания, что может приводить к заблуждению в диагностике. На сегодняшний день работами ряда авторов предложено определять концентрацию продуктов деградации C3 и C4, в частности C3b, C4a, C4d, C3dg, C5a, как более «надежных» и «чувствительных» в плане мониторинга активности заболевания [1, 4, 8].

Дефицит раннего компонента классического пути активации комплемента C1q индуцирует повреждение ткани почки, а антитела против C1q достоверно связаны с гипокомплементемией и тяжелым активным ЛН [8].

Исходя из вышеизложенного, определение в динамике факторов активации иммунной системы (BAFF, RANTES), комплемента (C1q, C3d, C4, C5a), эндотелиальной клеточной активации (sVCAM-1), некоторых АТ (АТ к C1q, антиядерных АТ) в сыворотке крови позволит проводить мониторинг активности заболевания, может нести прогностическую ценность в плане предсказания развития рецидива болезни, мониторинга ответа на лечение и его оптимизации, и по праву считаться «неинвазивным».

СКВ является хроническим воспалительным многофакторным заболеванием, поражающим большинство органов и систем организма. В большинстве случаев диагноз уже подозревается к моменту проведения нефробиопсии, которая необходима для определения варианта и тяжести люпус-нефрита, что, в свою очередь, является решающим в выборе терапии. Нередко пациенту требуется повторная биопсия ткани почки, так как не исключена трансформация классов нефрита, а также оценка индексов «активности» и «склероза» для определения дальнейшей тактики ведения и прогноза заболевания, поскольку заболевание характеризуется периодами обострения и ремиссии.

Взятие кусочка почечной ткани для морфологического исследования – инвазивная процедура, что ограничивает ее использование для мониторинга активности заболевания, особенно в детском возрасте. Поиск новых биологических маркеров в качестве дополнительных критериев для осуществления ранней диагностики и своевременного начала агрессивной иммуносупрессивной терапии, а также мониторинга активности процесса и, соответственно, прекращения лечения, во избежание серьезных побочных эффектов, представляется весьма актуальным. Новые биомаркеры должны быть высокочувствительными, специфичными и преимущественно «неинвазивными». Достаточно многообещающими в этом плане представляются так называемые «мочевые» маркеры, количественное определение которых позволяет отслеживать выраженность структурно-функциональных нарушений в нефроне [6, 11].

После повреждения различными факторами (гемодинамическими, медиаторами воспаления) подоциты подвергаются структурно-функциональным изменениям (так называемая подоцитопатия) с появлением в моче как целых клеток (феномен подоцитурии), так и специфических подоцитарных маркеров и компонентов гломерулярного барьера. В настоящее время установлено, что изменение структуры и функции подоцита (подоцитопатия), ранее считавшееся специфическим признаком

болезни минимальных изменений, встречается при различных вариантах первичных и вторичных нефропатий. Повреждение подоцитов приводит к нарушению синтеза подоцитарных адгезивных белков, отделению этих клеток от ГБМ и, в конечном счете, – к подоцитурии. Изменение экспрессии белков щелевой диафрагмы при всех протеинурических нефропатиях является стереотипной реакцией подоцита на повреждение, поэтому уровень экскреции нефрина и/или подокаликсина с мочой можно рассматривать в качестве маркера активного повреждения межподоцитарной щелевой диафрагмы и выраженности изменений клубочков. Поэтому выявление признаков декомпенсированной подоцитопатии по мочевым тестам очень важно с клинических позиций для мониторингирования течения, оценки прогноза, определения эффективности иммуносупрессивной терапии и выбора тактики лечения нефропатий.

Согласно данным литературы, определение в моче NGAL («ренального тропонина», липокалина-2) поможет в диагностике активного тяжелого ЛН, а также может быть использовано в качестве предиктора обострения почечного процесса. NGAL, в отличие от креатинина и цистатина С, которые считаются маркерами функционального почечного повреждения, относят к биомаркерам структурного повреждения. Нарастание концентрации NGAL в моче связано с повреждением проксимальных канальцев или синтезом «denovo» лейкоцитами во время воспаления, ишемии, воздействии токсинов и пр. При остром повреждении почки (ОПП) уровень в моче может увеличиваться в 25–1000 раз через 2 ч от начала повреждения. На сегодняшний день определение NGAL широко используется в нефрологии для диагностики ОПП, трансплантологии, кардиохирургии. При системных заболеваниях соединительной ткани «мочевой» NGAL начал использоваться в качестве предиктора обострения почечного процесса при СКВ, системных васкулитах [12–14].

В последние годы резко возросло внимание к проблеме микроРНК и их роли в онтогенезе и развитии заболеваний, что подтверждается множеством публикаций в различных источниках. Открытие микроРНК в качестве новых регуляторов экспрессии генов может обеспечить прорыв в области диагностики и определения новых стратегий в лечении ряда заболеваний с использованием технологий микроРНК [15].

Несмотря на то, что с момента описания микроРНК прошло не более двух десятков лет, эти молекулы сегодня считаются наиболее важными

регуляторами активности генов на посттрансляционном уровне. Исследования показывают, что микроРНК играют важную роль в многочисленных метаболических и биологических процессах, хотя функции большинства из идентифицированных микроРНК остаются до конца не установленными. МикроРНК являются классом малых РНК длиной 19–24 нуклеотидов, которые не кодируют синтез белка. МикроРНК могут быть закодированы в любом участке генома и описаны у животных, растений, беспозвоночных и вирусов. Обнаружено, что микроРНК занимают приблизительно около 3% генома человека и регулируют экспрессию примерно 60% всех генов, кодирующих информацию о структуре белков, что делает их одними из наиболее важных генных регуляторов. Одна микроРНК может контролировать экспрессию более ста различных генов.

Изучение экспрессии микроРНК может быть полезным для определения и предсказания причины развития почечных заболеваний. Согласно данным литературы, потеря микроРНК в эксперименте у мыши приводит к снижению числа нефронов, семейство miRNA-30 обеспечивает нормальную структуру подоцитов, miRNA-21 через регуляцию экспрессии TGF β принимает участие в развитии фиброза почечной ткани, miR-34a – в ишемии при остром повреждении почек, miRNA-17-92 – в развитии опухоли Вильмса. Описана корреляция miRNA-146a и miRNA-155 (сыворотки крови, мочи, ткани почки) с уровнем протеинурии, СКФ и тубулоинтерстициальными повреждениями при IgA-нефропатии, а также семейства miRNA-200 с активностью люпус-нефрита [16, 17].

А.В.Смирновым и соавт. (2014) [18] по результатам определения экспрессии микроРНК-21 в моче у 17 пациентов с нефропатиями установлен уровень экспрессии выше, чем у здоровых. Уровень экспрессии микроРНК-21 в моче прямо коррелировал с выраженностью суточной протеинурии, но коррелятивных связей между величиной мочевой экспрессии микроРНК-21 и выраженностью морфологических повреждений при нефропатиях у пациентов не обнаружено. Авторы считают серьезным аргументом в пользу значимости микроРНК-21 в развитии фибропластической трансформации почек выявленную корреляцию мочевой экспрессии микроРНК-21 с величиной протеинурии, которая, как известно, рассматривается предиктором гломерулярного и тубулоинтерстициального фиброза [18].

Исследование микроРНК в клинической практике педиатра-нефролога является перспективным

для уточнения патогенеза, диагностики люпус-нефрита на ранней стадии, оценки степени тяжести, прогнозирования течения и ответа пациента на лечение.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Lehman Thomas J A, Mouradian Janet A. Systemic Lupus Erythematosus. In: T.M. Barratt, E.D. Avner, W.E. Harmon. *Pediatric Nephrology*, 4th ed. Pennsylvania: Lippincott Williams&Wilkins. 1999; 793-810
2. Salgado A., Herrera-Diaz C. Lupus nephritis: an overview of recent findings. *Autoimmune disease*. 2012; Article ID 849684: 21
3. Jordan N, Lutalo PM, D'Cruz DP. Novel therapeutic agents in clinical development for Systemic Lupus Erythematosus. *BMC Medicine*. 2013; 3 11(1):120
4. Niaudet P, Salomon R. Systemic Lupus Erythematosus. In: E.D Avner, W.E. Harmon, P Niaudet. *Pediatric Nephrology*, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2004; 865-886
5. Rees L. In L. Rees, N. Webb, P. Brogan. *Paediatric nephrology*, London: Oxford University Press, 2007; 282-296
6. Avramescu C, Biciusca V, Daianu T. et al. Cytokine panel and histopathological aspects in the systemic lupus erythematosus. *Romanian journal of Morphology and Embryology*. 2010; 51(4): 633-640
7. Brunner HI, Bennett MR, Mina R et al. Association of noninvasively measured renal protein biomarkers with histologic features of lupus nephritis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64(8):2687-2697
8. Edelbauer M., Kshirsagar S., Riedl M. et al. Markers of childhood lupus nephritis indicating disease activity. *Pediatr. Nephrol*. 2011; 26:401-410
9. Vachvanichsanong P, McNeil E. Pediatric lupus nephritis: more options, more chances? *Lupus*. 2013; 22(6):545-553
10. Watson L., Beresford M. Urine biomarkers in juvenile-onset SLE nephritis. *Pediatr. Nephrol*. 2013; 28(3): 363-374
11. Vincent FB, Saulep-Easton D., Feggett WA et al. The BAFF/ APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013;24(3):203-215
12. Hammad A, Mosaad Y, Elhanbly S et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of severe lupus nephritis in children. *Lupus* 2013; 22(5):486-491
13. Yang CC, Hsieh SC, Li KJ et al. Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a potential biomarker for renal damage in patients with systemic lupus erythematosus. *J Biomed Biotechnol*. 2012; In press. DOI:10.1155/2012/759313
14. Hinze CH, Suzuki M, Klein-Gitelman M et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is a predictor of the course of global and renal childhood-onset systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Rheum*. 2009; 60(9):2772-2781
15. Lorenzen JM, Haller H, Thum T. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011; 7(5):286-294
16. Wang G, Tam LS, Kwan BC et al. Serum and urinary free microRNA level in patients with SLE. *Lupus* 2011; 20(5): 493-500
17. Wang G, Kwan BC, Lai F et al. Expression of microRNAs in the urinary sediment of patients with IgA nephropathy. *Disease Markers*. 2010; 28:79-86
18. Смирнов А.В., Карунная А.В., Зарайский М.И. и др. Экспрессия микроРНК-21 в моче у пациентов с нефропатиями. *Нефрология* 2014; 16(6):59-63 [A.V.Smirnov, A.I.Karunnaja, M.I.Zarajskij, i dr. Jekspressija mikroRNK-21 v moche u pacientov s nefropatijami. *Nefrologija* 2014; 18(6): 59-63]

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 20.10.2014 г.
Принята в печать: 05.03.2015 г.