

Aleksandra Musiała

Uczestnik Studiów Doktoranckich

Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej
Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

Biomarkery ogniskowego i segmentalnego kłębuszkowego zapalenia nerek (FSGS) w optymalnej strategii diagnostyczno-terapeutycznej

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu,
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotorzy: dr hab. n. med. Dorota Kamińska
dr hab. n. med. Piotr Donizy, prof. UMW

STRESZCZENIE

Wstęp

Ogniskowe i segmentalne stwardnienie kłębuszków (FSGS, ang. *focal segmental glomerulosclerosis*) jest zaliczane do podocytopatii, charakteryzujących się ogniskową i segmentalną sklerotyzacją pętli włosniczkowych kłębuszków nerkowych. W zależności od typu przebieg kliniczny FSGS objawia się białkomoczem o różnym nasileniu, aż do zespołu nerczycowego z nasilonymi obrzękami i hipoalbuminemią, w połowie przypadków z krwinkomoczem, niekiedy z towarzyszącym nadciśnieniem tętniczym lub upośledzeniem funkcji filtracyjnej nerek. Obecny podział poszczególnych typów FSGS według *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* z 2021 roku wyróżnia FSGS pierwotny, wtórny, uwarunkowany genetycznie oraz o nieustalonej etiologii.

Wtórny FSGS rozpoznawany jest częściej niż pierwotny, a jego przyczyną są zmiany adaptacyjne związane z hiperfiltracją kłębuszków nerkowych lub uszkodzenia podocytów

wywołane przez toksyczność leków, zespół hemofagocytowy lub zakażenia wirusowe. We wtórnych typach FSGS zwykle nie stwierdza się zespołu nerczycowego.

Dotychczas nie ustalono etiologii pierwotnego FSGS. Przypuszcza się, że za powstanie choroby odpowiadają rozpuszczalne, niezidentyfikowane czynniki, które prowadzą do uszkodzenia podocytów z zatarciem wyrostków stopowatych podocytów i białkomoczem. Wiadomo, że antygeny zlokalizowane na podocytach mogą odgrywać kluczową rolę w inicjacji i progresji zmian obserwowanych w FSGS.

Lepsze zrozumienie patogenezы FSGS oraz roli różnych cząsteczek w patologii uszkodzenia podocytów może prowadzić do wdrożenia terapii ukierunkowanej na etiologię.

Cele

Celem przeprowadzonego retrospektywnego badania było określenie czynników klinicznych i parametrów histopatologicznych prognozujących przebieg kliniczny pierwotnego i wtórnego FSGS. W szczególności celem było określenie znaczenia ekspresji tkankowej polimerazy poli(ADP-rybozy) 1 (PARP-1) oraz 2,3-dioksygenazy indolaminy (IDO-1) dla prognozowania progresji niewydolności nerek oraz różnicowania pomiędzy pierwotnym a wtórnym FSGS. Ponadto przeanalizowano zależności pomiędzy ekspresją tkankową PARP-1 i IDO-1 oraz parametrami oceny histopatologicznej bioptatu nerek a nasileniem białkomoczu oraz czynnością nerek w okresie biopsji.

Materialy i metody

Do badania zostali włączeni pacjenci pozostający pod opieką Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu z potwierdzonym histopatologicznie uszkodzeniem kłębuszków o typie pierwotnego lub wtórnego FSGS (52 pacjentów). Badanie immunohistochemiczne celem oceny ekspresji PARP-1 i IDO-1 zostało wykonane z archiwalnych bloczków parafinowych zawierających materiał tkankowy pochodzący z diagnostycznych przeskrónych gruboigłowych biopsji nerek. Wyniki oceny ekspresji PARP-1 i IDO-1 oraz parametry histopatologiczne bioptatów nerek zostały przeanalizowane w odniesieniu do danych demograficznych oraz klinicznych, w tym wykładników postępu przewlekłej choroby nerek w przebiegu FSGS.

Wyniki

Grupy z pierwotnym i wtórnym FSGS różniły się istotnie statystycznie pod względem stężeń następujących parametrów w surowicy krwi: albumin (3,1 [2,6–3,4] vs 3,9 [3,4–4,2] g/dl, $p < 0,001$), białka całkowitego (5,5 [4,6–6,0] vs 6,4 [6,08–7,13] g/dl, $p < 0,001$), cholesterolu

całkowitego (289 [244–402] vs 215[203–252] mg/dl, $p=0,002$), a także pod względem białkomoczu dobowego (UPCR, 3,06 [1,23–4,34] vs 1,4 [0,38–2,02], $p=0,008$). Średnie stężenie kreatyniny u pacjentów wynosiło 1,79 mg/dl. Stwierdzono istotną różnicę między grupą pacjentów z upośledzeniem czynności nerek w okresie okołobiopsyjnym, a grupą z prawidłową czynnością nerek w odniesieniu do odsetka niezmiennych kłębuszków, który był istotnie wyższy w grupie z prawidłową czynnością nerek (mediana 36 [27–51%] vs 17 [0–28%], $p<0,001$). Równocześnie obserwowano istotnie mniejszy odsetek kłębuszków z całkowitą sklerotyzacją w biopatach od pacjentów z prawidłową czynnością nerek (mediana 10 [0–18] vs 25 [13–46], $p<0,001$). Pacjenci z upośledzoną czynnością nerek mieli istotnie wyższy odsetek powierzchni objętej włóknieniem w obrębie śródmiąższu (mediana 20 [15–20] vs 5 [0–10], $p <0,001$) i zanikiem cewek (mediana 18 [0–20] vs 0 [0–8,5], $p=0,001$) oraz obecnością arteriolosklerozy (26 pacjentów, 83,9% vs 9 pacjentów, 42,9%, $p=0,002$).

Czynność nerek w okresie okołobiopsyjnym, była zmienną determinującą przeżycie nerek (HR 11,8, 95% CI 4,3–32,7, $p<0,001$). Zaobserwowano również niekorzystny wpływ rozpoznania wtórnego FSGS (HR 3,4, 95% CI 1,0–10,9, $p=0,042$) oraz białkomoczu dobowego (UPCR, HR 1,6, 95% CI 1,2–2,0, $p<0,001$).

Wykazano, że odsetek sklerotyzacji kłębuszków $> 50\%$ istotnie podnosi ryzyko wystąpienia niewydolności nerek.

Nie stwierdzono istotnych różnic pod względem intensywności ekspresji PARP-1 i IDO-1 w poszczególnych kompartmentach biopatów nerek w grupach z pierwotnym i wtórnym FSGS. Nie stwierdzono różnicy pomiędzy nasileniem intensywności reakcji immunohistochemicznej dla PARP-1 i IDO-1 a cechami morfologicznymi kłębuszków nerkowych, włóknieniem miąższu, zanikiem cewek oraz nasileniem zapaleniem cewkowo-śródmiąższowym o charakterze przewlekłym w obrębie śródmiąższu.

W analizie jednoczynnikowej wykazano potencjalny związek z przeżyciem nerek w przypadku następujących parametrów histopatologicznych:

- TIN – HR 4,0 (95% CI 2,1–7,6), $p<0,001$;
- % włóknienia – HR 2,1 (95% CI 1,4–3,2) / każde 10%, $p<0,001$;
- % zaniku cewek – HR 1,6 (95% CI 1,2–2,1) / każde 10%, $p=0,002$;
- odsetek nasilonej sklerotyzacji kłębuszków (50–100%) – HR 1,54 (95% CI 1,1–2,2) / każde 20% , $p=0,022$;

- odsetek kłębuszków niezmiennych – HR 0,44 (95% CI 0,2–0,9) / każde 20%, p=0,025;
- a także w ekspresji PARP-1 (HR 2,2, 95% CI 1,2–4,4, p=0,006) oraz IDO-1 (HR 3,2, 95% CI 1,4–7,4, p=0,006) w śródmiąższowym nacieku zapalnym.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych w materiale własnym badań sformułowano następujące wnioski:

1. IDO-1 i PARP-1 biorą udział w procesach prowadzących do progresji do schyłkowej niewydolności nerek u pacjentów z pierwotnym i wtórnym FSGS.
2. Ekspresja tkankowa IDO-1 i PARP-1 nie jest przydatna w różnicowaniu pierwotnego i wtórnego FSGS.
3. Zarówno ekspresja IDO-1, jak i PARP-1, oraz poszczególne parametry oceny histopatologicznej biopsji nerek nie mają związku z nasileniem białkomoczu w okresie biopsji.
4. Stężenie kreatyniny w surowicy krwi w czasie biopsji, nasilenie białkomoczu, odsetek kłębuszków ze sklerotyzacją powyżej 50%, nasilone włóknienia śródmiąższu i zanik cewek nerkowych, występowanie śródmiąższowego nacieku zapalnego, wtórny typ FSGS oraz ekspresja PARP-1 i IDO-1 w nacieku zapalnym w śródmiąższu mają istotny wpływ na wystąpienie schyłkowej niewydolności w długotrwałej obserwacji.
5. Upośledzona czynność nerek w czasie biopsji jest związana z wyższym odsetkiem kłębuszków ze sklerotyzacją, odsetkiem powierzchni śródmiąższu objętej włóknieniem i zanikiem cewek nerkowych oraz obecnością zapalenia cewkowo-śródmiąższowego (TIN) i arteriolosklerozy.

SUMMARY

Introduction

Focal and segmental glomerulosclerosis is a podocytopathy, which is characterized by focal and segmental sclerosis of the glomerular capillary loops. Depending on the FSGS type, its clinical course is manifested with proteinuria of various intensity, including nephrotic syndrome with severe swelling and hypoalbuminemia. Erythrocyturia is also present in 50% of cases. Accompanying hypertension or impaired glomerular filtration are also sometimes observed. According to the Kidney Disease: Improving Global Outcomes 2021 nomenclature, FSGS has been classified into primary, genetic, secondary and for-undetermined-cause forms.

Secondary FSGS is more often recognized than the primary one, and its causes include adaptation changes related to hyperfiltration of glomeruli or podocyte injury, which result from drug toxicity, hemophagocytic syndrome or viral infections. Secondary FSGS is rarely manifested with nephrotic syndrome.

The cause underlying the primary form of FSGS has not been defined yet. It is assumed that the disease is caused by unidentified soluble factors, which lead to podocyte injury with obliteration of foot processes and proteinuria. It is known that podocyte related antigens may play crucial role in initiation and progression of injury.

Better understanding of FSGS pathogenesis and the pathological roles of various molecules in podocyte injury may lead to implementation of a etiology-focused therapy.

Aims

The goal of the project was to determine clinical factors and histopathological parameters that are prognostic for clinical course of primary and secondary FSGS. In particular, the aim was to assess the significance of kidney tissue expression of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) and indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO-1) for prediction of long-term renal function in FSGS patients and differentiation between primary and secondary type of the disease. Moreover, the associations between the above molecules' tissue expression or histopathological parameters and proteinuria degree or renal function at the time of the biopsy were studied.

Material and methods

The study included the patients of the Department of Nephrology and Transplantation Medicine of Wroclaw University Hospital, who had a kidney biopsy with a result suggesting FSGS of primary or secondary cause (52 patients). The immunohistochemical assessment of

PARP-1 and IDO-1 expression was performed on sections from archival paraffin blocks containing tissue material from diagnostic percutaneous core needle biopsies of the kidneys. The results of PARP-1 and IDO-1 expression together with histopathological parameters were related to demographic and clinical data, including the measures of progression of chronic kidney disease in the course of FSGS.

Results

The primary and secondary FSGS groups differed statistically significantly in terms of serum concentrations of the following parameters: albumin (3.1 [2.6–3.4] vs 3.9 [3.4–4.2] g/dl, $p < 0.001$), total protein (5.5 [4.6–6.0] vs 6.4 [6.08–7.13] g/dl, $p < 0.001$), total cholesterol (289 [244–402] vs 215 [203–252] mg/dl, $p = 0.002$), and 24-hour proteinuria (UPCR, 3.06 [1.23–4.34] vs 1.4 [0.38–2.02], $p = 0.008$). The patients' mean creatinine was 1,79 mg/dL. There was a significant difference between the group of patients with renal impairment at the time of biopsy period and the group with normal renal function in the percentage of unchanged glomeruli, which was significantly higher in the group with normal renal function (median 36 [27–51%] vs 17 [0–28%], $p < 0.001$). At the same time, a significantly lower percentage of glomeruli with complete sclerosis in biopsies from patients with normal renal function was observed (median 10 [0–18] vs 25 [13–46], $p < 0.001$). Patients with impaired renal function had a significantly higher percentage of interstitial fibrosis (median 20 [15–20] vs 5 [0–10], $p < 0.001$) as well as tubular atrophy (median 18 [0–20] vs 0 [0–8.5], $p = 0.001$) and arteriolosclerosis (26 patients, 83,9% vs 9 patients, 42,9%, $p = 0,002$).

Renal function at the time of biopsy period was the determinant of renal survival (HR 11.8, 95% CI 4.3–32.7, $p < 0.001$). There was also an adverse effect of diagnosis of secondary FSGS (HR 3.4, 95% CI 1.0–10.9, $p = 0.042$) and 24-hour proteinuria (UPCR, HR 1.6, 95% CI 1.2–2.0, $p < 0.001$).

It has been shown that the percentage of glomerular sclerosis $> 50\%$ significantly increases the risk of renal failure.

There were no significant differences in the intensity of PARP-1 and IDO-1 expression in particular compartments of renal biopsies in groups with primary and secondary FSGS. There was no difference between the intensity of the immunohistochemical reaction for PARP-1 and IDO-1 and the morphological features of the glomeruli, interstitial fibrosis, tubular atrophy and the severity of chronic tubulointerstitial inflammation.

Univariate analysis showed a potential association with renal survival for the following histopathological parameters:

- TIN – HR 4.0 (95% CI 2.1–7.6), $p < 0.001$;
- % fibrosis – HR 2.1 (95% CI 1.4–3.2) / every 10%, $p < 0.001$;
- % tubular atrophy – HR 1.6 (95% CI 1.2–2.1) / every 10%, $p = 0.002$;
- percentage of increased glomerular sclerosis (50–100%) – HR 1.54 (95% CI 1.1–2.2) / every 20%, $p = 0.022$;
- proportion of unchanged glomeruli – HR 0.44 (95% CI 0.2–0.9) / each 20%, $p = 0.025$;
- and the expression of PARP-1 (HR 2.2, 95% CI 1.2–4.4, $p = 0.006$) and IDO-1 (HR 3.2, 95% CI 1.4–7.4, $p = 0.006$) in interstitial inflammatory infiltration.

Conclusions

Based on the research conducted in the own material, the following conclusions were formulated:

1. IDO-1 and PARP-1 are involved in the processes leading to progression to end-stage renal disease in patients with primary and secondary FSGS.
2. Tissue expression of IDO-1 and PARP-1 is not useful in differentiating between primary and secondary FSGS.
3. Both the expression of IDO-1 and PARP-1 as well as individual histopathological parameters of the kidney biopsy are not related to the severity of proteinuria during the time of biopsy.
4. Serum creatinine concentration at the time of biopsy, increased proteinuria, percentage of glomeruli with sclerosis above 50%, severe interstitial fibrosis and tubular atrophy, presence of interstitial inflammatory infiltrates, secondary type of FSGS, and expression of PARP-1 and IDO-1 in the interstitial inflammatory infiltrates have a significant impact on the occurrence of end-stage disease in long-term follow-up.
5. Impaired renal function at the time of biopsy is associated with a higher percentage of sclerotic glomeruli, percentage of interstitial area and tubular atrophy, and the presence of tubulointerstitial inflammation (TIN) and arteriolosclerosis.