

lek. Ewelina Olczyk

ROZPRAWA DOKTORSKA

## Diagnostyczna i rokownicza wartość nowych biomarkerów w nefropatii IgA

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Magdalena Krajewska

### Streszczenie

#### Wstęp

Nefropatia IgA jest najczęściej występującym pierwotnym zapaleniem kłębuszków nerkowych na świecie i jedną z głównych przyczyn schyłkowej niewydolności nerek w przebiegu glomerulopatii pierwotnych. Pomimo łagodnego przebiegu choroby schyłkowa niewydolność nerek jest opisywana po 20 latach u 30-40% chorych.

Podstawą diagnostyki nefropatii IgA jest stwierdzenie w badaniu histopatologicznym biopsjatu nerki obecności złogów immunologicznych zawierających IgA w kłębuszkach nerkowych. Choroba manifestuje się szerokim spektrum obrazów klinicznych: od bezobjawowego krwinkomoczu do gwałtownie postępującego kłębuszkowego zapalenia nerek. U części chorych z nefropatią IgA w miarę upływu czasu dochodzi do rozwoju nadciśnienia tętniczego oraz nasilenia białkomoczu.

Aktualnie nie są dostępne nieinwazyjne biomarkery umożliwiające diagnostykę oraz ocenę aktywności i rokowania u pacjentów z nefropatią IgA. Uważa się, że kluczową rolę w patogenezie nefropatii IgA odgrywa niedogalaktozylowana cząsteczka immunoglobuliny IgA1 (Gd-IgA1), indukująca powstanie autoprzeciwciał i tworzenie złogów immunologicznych w kłębuszkach nerkowych. Dodatkowo wskazuje się na znaczenie jej oddziaływania z receptorem CD89, prowadzące do uwalniania rozpuszczalnej formy CD89 (sCD89). Interakcja pomiędzy sCD89 i tranferyną 1 (CD71) sprawia, że dochodzi do aktywacji enzymu

transglutaminazy 2 (TG2), a w efekcie pobudzenia komórkach mezangium, pobudzenia reakcji zapalnej, prowadzącej do uszkodzenia nerek.

## **Cele**

Celem przeprowadzonego badania była ocena przydatności oznaczeń ekspresji i/lub stężenia wybranych biomarkerów dla diagnostyki i rozpoznania nefropatii IgA, monitorowania jej aktywności i oceny przebiegu przewlekłej choroby nerek w grupie chorych leczonych w jednym ośrodku. W badaniu uwzględniono ocenę ekspresji receptora CD89 na neutrofilach i monocytach krwi obwodowej, a także stężenia Gd-IgA1 i sCD89 w surowicy krwi oraz CD89, CD71 i TG2 w moczu. Przeanalizowano zależności pomiędzy wszystkimi badanymi biomarkerami oraz zmianami histopatologicznymi stwierdzonymi w biopsjach nerek.

## **Metody**

Do badania zostali włączeni pacjenci pozostający pod opieką Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu z potwierdzoną histopatologicznie nefropatią IgA oraz zdrowi ochotnicy. Ekspresję receptora CD89 na neutrofilach i monocytach oznaczono z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Stężenia Gd-IgA1 i sCD89 w surowicy krwi oraz CD89, CD71 i TG2 w moczu oceniono z wykorzystaniem metody immunoenzymatycznej ELISA. W analizie wyników uwzględnione zostały dane demograficzne oraz kliniczne, w tym wykładniki postępu przewlekłej choroby nerek w przebiegu nefropatii IgA, a także parametry histopatologiczne biopsji nerek.

## **Wyniki**

W grupie badanej obserwowano istotnie wyższe stężenie sCD89 ( $p < 0,001$ ) w surowicy krwi oraz wyższe stężenia CD89 ( $p < 0,001$ ) i CD71 ( $p = 0,014$ ) w moczu w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu Gd-IgA1 w surowicy krwi oraz TG2 w moczu pomiędzy grupami. Równocześnie nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji CD89 na neutrofilach i monocytach krwi obwodowej pomiędzy grupami.

Obserwowano istotne statystycznie ujemne korelacje pomiędzy stężeniem albumin a stężeniami CD71 ( $r = -0,437$ ,  $p = 0,002$ ) oraz TG2 ( $r = -0,346$ ,  $p = 0,016$ ) w moczu. Równocześnie stwierdzono istotne statystycznie ujemne korelacje pomiędzy stężeniem białka całkowitego a stężeniem sCD89 w surowicy krwi ( $r = -0,378$ ,  $p = 0,010$ ), a także stężeniami CD89 ( $r = -0,296$ ,

p=0,046) oraz CD71 (r=-0,353, p=0,016) w moczu. Ponadto wykazano istotne statystycznie dodatnie korelacje pomiędzy nasileniem białkomoczu a stężeniami sCD89 (r=0,349, p=0,015), CD71 (r=0,611, p <0,001) oraz TG2 (r=0,454, p=0,001) w moczu.

Przeprowadzono analizę wpływu stosowania terapii immunosupresyjnej na badane biomarkery. Stwierdzono, że stosowanie glikokortykosteroidoterapii powoduje zmniejszenie stężenia Gd-IgA1 w surowicy krwi (p=0,028) oraz zmniejsza stężenie CD89 w moczu (p=0,035). Nie zaobserwowano wpływu glikokortykosteroidoterapii na pozostałe biomarkery.

W badaniu wykazano zależność pomiędzy występowaniem cech nieodwracalnych, tj. segmentalnego twardnienia kłębuszków oraz włóknienia zrębu i zaniku cewek nerkowych a upośledzeniem funkcji filtracyjnej w okresie okołobiopsyjnym. Nie stwierdzono zależności pomiędzy stopniem zaawansowania zmian nieodwracalnych a analizowanymi biomarkerami.

Oceniono przebieg kliniczny nefropatii IgA w okresie od wykonania biopsji nerki do utraty czynności nerek lub końca obserwacji w badaniu (od 2 do 154 miesięcy, mediana 44,5 [26-61] miesięcy). Zaobserwowano niekorzystny wpływ obecności zmian nieodwracalnych w badaniu histopatologicznym na częstość występowania pogorszenia funkcji nerek do wartości poniżej 30 ml/min/1,73m<sup>2</sup>.

## **Wnioski**

Na podstawie badań przeprowadzonych w grupie chorych z nefropatią IgA leczonych w Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej stwierdzono, że:

1. Ocena stężenia rozpuszczalnego receptora CD89 (sCD89) w surowicy krwi oraz w moczu metodą ELISA może znaleźć zastosowanie w diagnostyce nefropatii IgA.
2. Do diagnostyki nefropatii IgA może być również potencjalnie wykorzystana ocena stężenia tranferyny 1 (CD71, TfR) w moczu metodą ELISA.
3. Nie potwierdzono znaczenia ekspresji receptora CD89 na neutrofilach i monocytach oraz stężeń niedogalaktozylowanej immunoglobuliny IgA1 (Gd-IgA1) w surowicy i enzymu transglutaminazy 2 (TG2) w moczu dla rozpoznania nefropatii IgA.
4. Stwierdzone korelacje pomiędzy stężeniem rozpuszczalnego receptora CD89 (sCD89) w surowicy oraz receptora CD89 i CD71 w moczu a stężeniem białka całkowitego oraz pomiędzy stężeniem receptorów CD89 oraz CD71 w moczu

a nasileniem białkomoczu pozwalają na wykorzystanie CD89 i CD71 w ocenie aktywności choroby.

5. Stężenie Gd-IgA1 w surowicy oraz CD71 w moczu zależą od funkcji filtracyjnej nerek.
6. Nie stwierdzono zależności pomiędzy ekspresją i/lub stężeniem badanych biomarkerów a zmianami histopatologicznymi w biopsatach nerek.
7. Dodatkowo w przeprowadzonym badaniu potwierdzono, że zmiany nieodwracalne stwierdzone w badaniu histopatologicznym biopsatów nerek mają niekorzystny wpływ na postęp przewlekłej choroby nerek.

## Summary

### Introduction

IgA nephropathy is the most common glomerulonephritis worldwide and one of the leading causes of end-stage renal disease. Due to the course of the disease, end-stage renal failure is described after 20 years in 30-40% of patients.

The basis for the diagnosis of IgA nephropathy is the histopathological finding of the presence of immunological deposits of IgA in the renal glomeruli in the kidney biopsy. The disease manifests itself with a wide spectrum of symptoms: from asymptomatic hematuria to rapidly progressive glomerulonephritis. Some patients with IgA nephropathy develop hypertension and increased proteinuria over time.

Currently, non-invasive biomarkers for diagnostic testing, activity assesment and prognosis in patients with IgA nephropathy are not available. It is believed that the key role in the pathogenesis of IgA nephropathy is played by the galactose-deficient immunoglobulin IgA1 (Gd-IgA1) and its interaction with the CD89 receptor, followed by the membrane shedding of the soluble form of CD89 (sCD89). The interaction between sCD89 and transferrin 1 (CD71) causes the activation of the transglutaminase 2 (TG2) enzyme and, as a result, stimulates mesangial cells, induces the inflammatory reaction leading to renal injury.

## **Aim**

The aim of the study was to assess the usefulness of expression and/or concentration of selected biomarkers for the diagnosis of IgA nephropathy, monitoring its activity and assessing the prognosis in a group of patients treated in one center. The study included the assessment of the expression of the CD89 receptor on peripheral blood neutrophils and monocytes, as well as the concentration of Gd-IgA1 and sCD89 in the blood serum and CD89, CD71 and TG2 in the urine. The relationships between all biomarkers, together with histopathological changes found in the kidney biopsies, and clinical parameters of disease activity and progression were analyzed.

## **Methods**

The study included patients treated in the Department of Nephrology and Transplantation Medicine of the University Hospital in Wrocław with histopathologically confirmed IgA nephropathy and healthy volunteers. CD89 receptor expression on neutrophils and monocytes was determined by flow cytometry. Concentrations of Gd-IgA1 and sCD89 in the blood serum, as well as CD89, CD71 and TG2 in the urine, were assessed using the immunoenzymatic ELISA method. The analysis of the results included demographic and clinical data, including indicators of the progression of chronic kidney disease in the course of IgA nephropathy, as well as histopathological parameters of kidney biopsies.

## **Results**

In the study group, significantly higher concentrations of sCD89 ( $p < 0.001$ ) in the blood serum and higher concentrations of CD89 ( $p < 0.001$ ) and CD71 ( $p = 0.014$ ) in the urine were observed compared to the control group. There were no statistically significant differences in the concentration of Gd-IgA1 in blood serum and TG2 in urine between the groups. At the same time, there were no statistically significant differences in the level of CD89 expression on peripheral blood neutrophils and monocytes between the groups.

Statistically significant negative correlations were observed between albumin concentration and CD71 ( $r = -0.437$ ,  $p = 0.002$ ) and TG2 ( $r = -0.346$ ,  $p = 0.016$ ) concentrations in urine. At the same time, statistically significant negative correlations were found between the concentration of total protein and the concentration of sCD89 in the blood serum ( $r = -0.378$ ,  $p = 0.010$ ), as well as the concentrations of CD89 ( $r = -0.296$ ,  $p = 0.046$ ) and CD71 ( $r = -0.353$ ,

p=0.046) =0.016) in urine. In addition, statistically significant positive correlations were found between the severity of proteinuria and the concentrations of CD89 (r=0.349, p=0.015), CD71 (r=0.611, p<0.001) and TG2 (r=0.454, p=0.001) in the urine.

Analysis of the impact of the use of immunosuppressive therapy on the studied biomarkers was carried out. It was found that the use of steroid therapy causes a decrease in the concentration of Gd-IgA1 in the blood serum (p=0.028) and CD89 in the urine (p=0.035). No effect of steroid therapy on other biomarkers was observed.

The study showed a relationship between the occurrence of irreversible features, i.e. segmental glomerulosclerosis, interstitial fibrosis and renal tubular atrophy, and the impairment of filtration function in the peribiopsy period. There was no correlation between the degree of irreversible changes and the analyzed biomarkers.

The clinical course of IgA nephropathy was assessed from renal biopsy to loss of renal function or end of study follow-up (2 to 154 months, median 44.5 [26-61] months). An unfavorable effect of the presence of irreversible changes in the histopathological examination on the incidence of renal function deterioration below 30 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> was observed.

## **Conclusions**

Based on the research conducted in a group of patients with IgA nephropathy treated at the Department of Nephrology and Transplantation Medicine, it was found that:

1. Evaluation of the soluble CD89 receptor (sCD89) in the blood by ELISA method can be useful in the diagnosis of IgA nephropathy.
2. Evaluation of transferrin factor 1 (CD71, TfR) in urine by ELISA method can also be valuable in the diagnosis of IgA nephropathy.
3. The significance of the CD89 receptor expression on neutrophils and monocytes, as well as serum concentration of galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1) or urine concentration of transglutaminase 2 (TG2) enzyme, for the diagnosis of IgA nephropathy has not been confirmed.
4. Correlations found between the concentration of soluble CD89 receptor (sCD89) in serum and the concentration of CD89 and CD71 receptor in urine and the concentration of total protein, and between the concentration of CD89 and CD71 receptors in urine and the

severity of proteinuria allow the use of CD89 and CD71 in the assessment of disease activity.

5. Serum Gd-IgA1 and urine CD71 concentrations depend on the renal filtration function.
6. No relationship was found between the expression and/or concentration of the biomarkers tested and histopathological changes in kidney biopsies.
7. In addition, the study confirmed that irreversible changes found in the histopathological examination of kidney biopsies have an adverse effect on the progression of chronic kidney disease.