

Katedra i Klinika Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

lek. Ewelina Olczyk

ROZPRAWA DOKTORSKA

Diagnostyczna i rokownicza wartość nowych biomarkerów
w nefropatii IgA

Promotor:

Prof. dr hab. n. med. Magdalena Krajewska

Wrocław 2023

Serdeczne podziękowania składam

Pani Profesor Magdalenie Krajewskiej za inspirację, wyrozumiałość, poświęcony czas i nieocenioną pomoc merytoryczną w realizacji pracy doktorskiej.

Pani Doktor Katarzynie Kościelskiej – Kasprzak za zaangażowanie, wyjątkową cierpliwość i serdeczność.

Pani Doktor Marcelinie Żabińskiej za cenne wskazówki i wsparcie techniczne.

Pani Doktor hab. Dorocie Kamińskiej za bezinteresowną pomoc.

Wyrazy wdzięczności pragnę także przekazać Współpracownikom z Katedry i Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej oraz Laboratorium Specjalistycznego za okazaną mi pomoc i życzliwość.

Dziękuję także mojej Rodzinie, a w szczególności mojemu Mężowi, za motywację i wsparcie na każdym etapie realizacji pracy doktorskiej.

Spis treści

1	Wstęp.....	6
1.1	Epidemiologia	6
1.2	Przyczyny choroby.....	6
1.3	Patogeneza.....	7
1.4	Obraz kliniczny	9
1.5	Diagnostyka i rozpoznanie choroby.....	11
1.6	Leczenie nefropatii IgA.....	13
1.6.1	Leczenie wspomagające.....	13
1.6.1.1	Kontrola ciśnienia tętniczego	13
1.6.1.2	Inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEI) oraz antagoniści receptora angiotensyny (ARB).....	13
1.6.1.3	Flozyny.....	14
1.6.1.4	Prozdrowotny tryb życia	14
1.6.2	Leczenie immunosupresyjne.....	15
1.6.2.1	Glikokortykosteroidy	15
1.6.2.2	Cyklofosfamid (CTX)	16
1.6.2.3	Azatiopryna (AZA)	17
1.6.2.4	Mykofenolan mofetilu (MMF).....	17
1.6.2.5	Inhibitory kalcyneuryny (IK)	18
1.6.2.6	Rytuksymab (RTX)	18
2	Cele pracy.....	19
3	Materiał.....	20
4	Metody.....	22
4.1	Pobieranie i przechowywanie materiału biologicznego.....	22
4.2	Ekspresja CD89 na komórkach krwi obwodowej	22
4.2.1	Ocena stężenia biomarkerów w surowicy i moczu	24
4.3	Ocena histopatologiczna bioptatów nerki	25
4.4	Standardowe oznaczenia laboratoryjne.....	26
4.4.1	Ocena białkomoczu dobowego oraz aktywnego osadu moczu.....	26
4.4.2	Ocena funkcji wydalniczej nerek	27
4.5	Analizy statystyczne.....	27
5	Wyniki	28

5.1	Analiza obrazów histopatologicznych biopłatów nerki	28
5.2	Charakterystyka kliniczna pacjentów w okresie okołobiopsyjnym	29
5.3	Zależność pomiędzy stanem klinicznym w okresie okołobiopsyjnym a obrazem histopatologicznym	29
5.4	Charakterystyka kliniczna pacjentów w okresie włączenia do badania.....	30
5.5	Ocena ekspresji i/lub stężenia badanych biomarkerów u pacjentów z nefropatią IgA oraz w grupie kontrolnej	31
5.5.1	Ekspresja receptora CD89 na neutrofilach oraz monocytach	31
5.5.2	Stężenia niedogalaktozylowanej IgA1 (Gd-IgA1) oraz rozpuszczalnego CD89 (sCD89) w surowicy krwi	32
5.5.3	Stężenie receptora CD89, receptora transferyny 1 (CD71) oraz transglutaminazy 2 (TG2) w moczu	33
5.5.4	Korelacje pomiędzy badanymi biomarkerami	33
5.6	Ocena badanych biomarkerów w zależności od płci, wieku i okresu czasu od biopsji do badania	36
5.7	Ocena wpływu glikokortykosteroidoterapii na badane biomarkery	38
5.8	Ocena badanych biomarkerów w zależności od wskaźników aktywności choroby	39
5.9	Ocena zależności pomiędzy badanymi biomarkerami a funkcją filtracyjną nerek ..	41
5.10	Zaawansowanie zmian histopatologicznych a biomarkery	41
5.11	Ocena przebiegu klinicznego choroby	42
6	Omówienie i dyskusja	45
6.1	Parametry kliniczne i obraz histopatologiczny	45
6.2	Czynniki rokownicze oceniane w biopsji nerki	46
6.3	Ekspresja receptora CD89 na neutrofilach i monocytach	47
6.4	Stężenia biomarkerów w surowicy	48
6.5	Stężenia biomarkerów w moczu	49
6.6	Zależność stężeń poszczególnych biomarkerów w moczu i surowicy	50
6.7	Wpływ terapii glikokortykosteroidami na ekspresję i/lub stężenia badanych biomarkerów	50
6.8	Wpływ badanych biomarkerów na obraz kliniczny i przebieg IgAN.....	51
6.8.1	Wykładniki kliniczne aktywności choroby a ekspresja i/lub stężenia badanych biomarkerów	51
6.8.2	Czynność nerek a ekspresja i/lub stężenia badanych biomarkerów	51

6.8.3	Ocena histopatologiczna bioptatów nerek a ekspresja i/lub stężenia badanych biomarkerów u pacjentów z nefropatia IgA.....	52
7	Wnioski.....	53
8	Streszczenie	54
9	Summary.....	57
10	Spis rycin	60
11	Spis tabel	61
12	Bibliografia.....	62

Wykaz stosowanych skrótów

ACEI – inhibitory konwertazy angiotensyny (*ang. angiotensin-converting-enzyme inhibitors*)

ARB – antagoniści receptora angiotensyny II (*ang. angiotensin receptor blockers*)

AZA – azatiopryna

BMI – wskaźnik masy ciała (*ang. body mass index*)

CD71, TfR – transferyna 1

CTX – cyklofosfamid

eGFR – współczynnik przesączania kłębuszkowego (*ang. estimated glomerular filtration rate*)

Gd-IgA1 – niedogalaktozylowana cząsteczka IgA1

GKS – glikokortykosteroidy

HLA – ludzki antygen leukocytny (*ang. human leukocyte antigen*)

IgA – immunoglobulina A

IgAN – nefropatia IgA

IgG – immunoglobulina G

IK – inhibitory kalcyneuryny

IL-6 – interleukina 6

IQR – zakres międzykwartyłowy (*ang. interquartile range*)

KDIGO – *Kidney Disease Improving Global Outcomes*

MALT – tkanka limfoidalna związana z błoną śluzową (*ang. mucosa associated lymphoid tissue*)

MDRD – *Modification of Diet in Renal Disease*

MMF – mykofenolan mofetilu

RAA – układ renina – angiotensyna – aldosteron

RTX – rytuksymab

sCD89 – rozpuszczalny receptor CD89 (*ang. soluble CD89*)

SD – odchylenie standardowe (*ang. standard deviation*)

SGLT-2 – kotransporter sodowo-glukozowy 2 (*ang. sodium glucose transporter*)

SNN – schyłkowa niewydolność nerek

TG2 – tranzglutaminaza 2

TGF β – transformujący czynnik wzrostu beta (*ang. transforming growth factor β*)

UPCR – wskaźnik białko kreatynina w moczu (*ang. Urine Protein Creatinine Ratio*)

1 Wstęp

Nefropatia IgA (IgAN) to jednostka chorobowa opisana po raz pierwszy w roku 1968 przez Bergera i Hinglais [1]. Jest najczęściej występującym pierwotnym zapaleniem kłębuszków nerkowych na świecie i jedną z głównych przyczyn schyłkowej niewydolności nerek w przebiegu glomerulopatii pierwotnych [2,3].

1.1 Epidemiologia

Z uwagi na fakt, że część osób z łagodnym przebiegiem choroby nie jest poddawana diagnostycznej biopsji nerki, liczba osób z potwierdzoną chorobą jest niedoszacowana [4]. Dane z Japonii, dotyczące wyników biopsji przeprowadzonych u żywych dawców nerek, u których w 16% stwierdzono mezangialne złogi IgA sugerują, że częstość subklinicznej IgAN może być wyższa niż dotychczas podejrzewano [5].

Istnieje duże zróżnicowanie geograficzne dotyczące występowania choroby [6]. Jednostka ta jest często rozpoznawana wśród populacji azjatyckich oraz kaukaskich, natomiast rzadziej stwierdza się ją u mieszkańców Afryki [4,7]. Obserwuje się także różny rozkład płci w zależności od regionu geograficznego występowania choroby: przewaga mężczyzn jest wyraźnie widoczna w Ameryce Północnej, gdzie stosunek mężczyzn do kobiet wynosi 2 – 3 : 1 oraz Europie (M:K – 1,5:1), podczas gdy w Azji IgAN występuje z taką samą częstotliwością u obu płci [7,8]. Choroba najczęściej rozpoznawana jest u osób w wieku 20-40 lat [9].

1.2 Przyczyny choroby

Nefropatia IgA nie jest uważana za chorobę występującą rodzinnie. Jedyne około 5–8% pacjentów ma krewnego pierwszego lub drugiego stopnia z potwierdzoną biopsyjnie nefropatią IgA lub nieprawidłowościami stwierdzanymi w badaniu moczu [8]. Istnieją jednak badania sugerujące, że pewne uwarunkowania genetyczne mogą predysponować do wystąpienia choroby [10]. Wśród genów, których warianty mogą mieć związek ze zwiększonym ryzykiem występowania nefropatii IgA należą: antygeny zgodności tkankowej (m.in.: HLA-DRB1, HLA-DQB1, HLA-DQA1), geny związane z O-glikozylacją (*CIGALTI*, *CIGALTIC1*), wchodzące w skład układu dopełniacza i inne geny wrodzonej odpowiedzi immunologicznej [10–13].

Wskazuje się również na znaczenie narażenia na alergeny pokarmowe i patogeny górnych dróg oddechowych w rozwoju nefropatii IgA [13,14].

Nefropatia IgA może również występować jako postać wtórna. Do chorób, którym mogą towarzyszyć depozyty IgA w kłębuszkach należą m.in.: alkoholowa marskość wątroby, celiakia, wrzodziejące zapalenie jelita grubego, choroba Leśniowskiego-Crohna, łuszczyca, opryszczkowe zapalenie skóry, przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B, sarkoidoza, toczeń układowy, zespół Goodpasture'a, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca, sarkoidoza, zespół Sjogrena, nowotwory (płuc, krtani, trzustki) i inne [15]. Należy jednak pamiętać, że stwierdzenie depozytów w kłębuszkach nerkowych nie jest jednoznaczne z rozpoznaniem choroby [5].

1.3 Patogeneza

Aktualnie uważa się, że kluczową rolę w patogenezie IgAN odgrywa niedogalaktozylowana cząsteczka IgA1 (Gd-IgA1). W badaniach obserwowano wyższe stężenie Gd-IgA1 u pacjentów z nefropatią IgA w porównaniu z grupą kontrolną [16,17] oraz jego związek z upośledzeniem funkcji filtracyjnej i krótszym przeżyciem nerek [18].

Wysokie poziomy Gd-IgA1 obserwowano również u zdrowych krewnych pacjentów z IgAN, co sugeruje, że istnieją dodatkowe czynniki biorące udział w rozwoju choroby [19]. Ludzka immunoglobulina A składa się z dwóch podklas: IgA1 i IgA2, które mogą występować w postaci monomerów i polimerów [20,21]. Region zawiasowy cząsteczki IgA u zdrowych osób zbudowany jest z krótkich O-połączonych łańcuchów oligosacharydowych składających się z N-acetylogalaktozaminy sprzężonej z galaktozą wiązaniami β -1,3 i kwasem sialowym przyłączonym do jednego lub obu cukrów. U pacjentów z IgAN zachodzi wadliwy proces galaktozylacji, prowadzący do syntezy nieprawidłowej IgA1. Nieprawidłowe cząsteczki IgA1 są rozpoznawane przez naturalnie występujące autoprzeciwciała, głównie izotyp IgG lub znacznie rzadziej IgA. Przeciwciała są specyficzne dla N-acetylogalaktozaminy regionu zawiasowego Gd-IgA1, a to prowadzi do tworzenia kompleksów immunologicznych i ich odkładania się w kłębuszkach nerkowych. Akumulacja kompleksów doprowadza do aktywacji komórek mezangialnych, uwalniania mediatorów zapalnych oraz aktywacji dopełniacza i uszkodzenia kłębuszków nerkowych. Nefropatia IgA uważana jest za chorobę autoimmunologiczną z wieloetapowym procesem patogennym. W literaturze opisywana jest

hipoteza „multi-hit”, która wyjaśnia patofizjologię tej jednostki chorobowej zakładając występowanie czterech etapów prowadzących do jej rozwoju [22,23]:

- podwyższone poziomy Gd-IgA1 w surowicy,
- rozpoznawanie Gd-IgA1 przez specyficzne przeciwciała w klasie IgA/IgG,
- powstawanie kompleksów immunologicznych IgA1-IgG i IgA1-IgA oraz ich odkładanie się w nerkach,
- aktywacja komórek mezangialnych, uwalnianie mediatorów zapalnych i włóknienie, aktywacja dopełniacza i uszkodzenie kłębuszków nerkowych.

Istotne zagadnienie w kontekście patofizjologii nefropatii IgA dotyczy receptorów dla immunoglobuliny IgA. Jednym z nich jest Fc α RI/CD89. Jest to glikoproteina typu I, związana z błoną komórkową, występująca głównie na komórkach krwi obwodowej: monocytach/makrofagach, neutrofilach, komórkach Kupffera, komórkach dendrytycznych i eozynofilach. Receptor ten wiąże się wyłącznie z immunoglobuliną IgA: zarówno IgA1, jak i IgA2, z podobnym powinowactwem [24,25]. Krążące polimery Gd-IgA1 indukują uwalnianie zewnątrzkomórkowego fragmentu receptora CD89 w formie rozpuszczalnej (sCD89) do osocza [26]. W surowicach pacjentów z IgAN sCD89 wiąże się z Gd-IgA1 w krążących rozpuszczalnych kompleksach sCD89-Gd-IgA1 [26,27]. Odkładanie się tych kompleksów w mezangium stymuluje naciekanie makrofagów, ekspansję macierzy i reakcję zapalną w kłębuszkach nerkowych i śródmiąższu, co klinicznie objawia się występowaniem krwimoczku i białkomoczku [28]. Fc α RI/CD89 nie ulega ekspresji na komórkach mezangialnych oraz nie bierze udziału w wiązaniu się kompleksów immunologicznych do komórek mezangium w nerkach [29].

Transferyna 1 (CD71, TfR) – kolejny receptor biorący udział w patogenezie nefropatii IgA zlokalizowany na komórkach mezangium wiąże wyłącznie cząsteczkę IgA1, bez IgA2. W proliferujących komórkach mezangialnych odnotowano nadekspresję receptora CD71, który wychwytuje krążące kompleksy immunologiczne sCD89-Gd-IgA1 [24,27,30]. Interakcja pomiędzy sCD89 i CD71 sprawia, że aktywuje się enzym transglutaminaza 2 (TG2). Dochodzi do pobudzenia komórek mezangium i produkcji cytokin zapalnych, a w efekcie do uszkodzenia nerek [24,31].

Mechanizmem uczestniczącym w patogenezie IgAN jest aktywacja układu dopełniacza [32]. Immunoglobulina A jest zdolna do aktywacji alternatywnej oraz lektynowej drogi

dopełniacza. W mezangialnych immunodepozytach znajdują się składowe: properdyna, czynnik H, lektyna wiążąca mannozę, proteazy serynowe 1 i 2 związane z lektyną wiążącą mannozę oraz C4d [33]. Złogi składowej C3 są obecne w ponad 90% biopsji nerek z rozpoznaniem nefropatii IgA [9]. Dopełniacz jest aktywowany obecnością kompleksów immunologicznych zawierających IgA1 bezpośrednio w krążeniu i/lub po ich osadzeniu w mezangium [33]. Każda z dróg aktywacji dopełniacza kończy się aktywacją konwertazy C3, która razem z innymi składnikami dopełniacza powoduje powstanie kompleksu atakującego błonę (C5b-9). Ilość C5b-9 zwykle nie jest wystarczająca do wywołania lizy komórek jądrzastych. Jednak sublityczne ilości C5b-9 mogą prowadzić do uwalniania przez podocyty mediatorów zapalnych i składników macierzy zewnątrzkomórkowej, powodując dysfunkcję błony podstawnej kłębuszków nerkowych, prowadząc do ich bliznowacenia oraz apoptozy podocytów [34]. W badaniu mezangioproliferacyjnego zapalenia nerek przeprowadzonym na szczurach wykazano, że komórki mezangium także podlegają działaniu C5b-9, co przejawia się syntezą fibronektyny, TGFβ, IL-6 lub apoptozą komórkową [35,36]. Kisara i wsp. badając aktywację dopełniacza u pacjentów z IgAN zaobserwowali u nich wyższe stężenia C5b-9 w moczu oraz ich dodatnią korelację ze stężeniem kreatyniny w surowicy, białkomoczem, a także globalnym twardnieniem kłębuszków oraz włóknieniem śródmiąższowym w badaniu histopatologicznym [37].

Uważa się również, że w patogenezie IgAN uczestniczy tzw. odporność śluzówkowa. Istnieje hipoteza wskazująca związek osi jelito – nerki w patogenezie nefropatii IgA. Mikroflora jelitowa jest zróżnicowana w zależności od stosowanej diety oraz czynników środowiskowych i może wpływać na aktywność MALT (*ang. mucosa associated lymphoid tissue*) i powstawanie chorób zapalnych jelit oraz innych chorób autoimmunologicznych. Zaburzona tolerancja immunologiczna oraz nieprawidłowa odpowiedź na mikroflorę jelit i niektóre antygeny pokarmowe skutkują zmianami przepuszczalności bariery jelitowej oraz aktywacją MALT prowadząc do zapalenia jelit. W efekcie w jelitach dochodzi do produkcji Gd-IgA1, która następnie przedostaje się do krążenia [20,38,39].

1.4 Obraz kliniczny

W nefropatii IgA obserwowany jest szerokie spektrum obrazów klinicznych: od bezobjawowego krwinkomoczu do gwałtownie postępującego kłębuszkowego zapalenia nerek. Pacjenci z bezobjawowym krwiomoczem z towarzyszącym białkomoczem poniżej 0,5 g/dobę często identyfikowani są przypadkowo w programie badań przesiewowych, prowadzonych

przez szkoły czy programy ubezpieczeniowe w niektórych krajach. Występowanie izolowanego krwinkomoczu u chorych, u których obserwuje się prawidłową funkcją filtracyjną nerek bez współistniejącego białkomoczu lub z minimalną proteinurią, szczególnie w populacji kaukaskiej, wiąże się z korzystnym rokowaniem [40]. U części chorych z nefropatią IgA w miarę upływu czasu dochodzi do rozwoju nadciśnienia tętniczego oraz nasilenia białkomoczu, co wiąże się z koniecznością długotrwałego monitorowanie tych pacjentów [41,42].

Ocenia się, że 10-letnie przeżycie nerek w nefropatii IgA wynosi 80%-85% [43]. Oprócz zmian występujących w badaniu histopatologicznym bioptatu nerki, czynnikami złego rokowania w nefropatii IgA są także: nadciśnienie tętnicze, białkomocz i obniżony eGFR w chwili rozpoznania [43,44]. Czynnikiem rokowniczym jest również przynależność etniczna [45]. Rzadszą manifestacją choroby jest makroskopowy krwimocz, towarzyszący infekcji górnych dróg oddechowych, który często występuje jako pierwszy objaw choroby. Jest to symptom niepokojący dla pacjentów, skłaniający do konsultacji lekarskiej. Fenotyp ten występuje u około 10-15% badanych, najczęściej poniżej 40 roku życia [46]. Nawracający makroskopowy krwimocz wiąże się z korzystnym rokowaniem, jednak u części chorych w późniejszym okresie dochodzi do rozwoju białkomoczu i progresji przewlekłej choroby nerek [47]. U pacjentów z nefropatią IgA występowanie zespołu nerczycowego jest rzadkie. Jeżeli jest obecny, w badaniu histopatologicznym stwierdza się często zmiany takie jak: zwiększenie komórkowości wewnątrzkapilarnej, ogniskowe twardnienie kłębuszków i tworzenie się półksiężyców, natomiast rzadko zmiany o charakterze łagodnej choroby mezangialnej [48]. U 5% pacjentów z zespołem nerczycowym w badaniu histopatologicznym obecne są łagodne zmiany mezangialne typowe dla IgAN oraz rozlane stopienie wypustek stopowatych podocytów, charakterystyczne dla choroby zmian minimalnych. Nierozstrzygniętym pozostaje czy obraz ten jest wariantem nefropatii IgA, czy są to przypadkowe złogi immunoglobuliny A u pacjentów z submikroskopowym kłębuszkowym zapaleniem nerek [49]. W jednym z badań w porównaniu z pacjentami z IgAN, chorzy z współistniejącą chorobą zmian minimalnych byli młodsi i charakteryzowali się większym białkomoczem oraz lepszą funkcją filtracyjną nerek, a także łagodniejszymi zmianami w badaniu histopatologicznym wycinka nerki oraz lepszym rokowaniem [50]. U pacjentów tych czynność nerek jest zwykle zachowana i występuje zespół nerczycowy z towarzyszącymi obrzękami. W badaniach laboratoryjnych obserwowana jest dyslipidemia i hipoalbuminemia. Charakterystyczna jest także dobra odpowiedź na leczenie glikokortykosteroidami oraz

rokowanie jak w chorobie zmian minimalnych [50]. Nefropatia IgA z gwałtownie postępującą przewlekłą chorobą nerek występuje rzadko i najczęściej wiąże się z obecnością półksiężyców w >50% kłębuszków w badaniu histopatologicznym nerki [51].

1.5 Diagnostyka i rozpoznanie choroby

Podstawą diagnostyki nefropatii IgA jest badanie histopatologiczne materiału pobranego podczas biopsji nerki. Do postawienia rozpoznania niezbędna jest obecność w materiale histopatologicznym złogów immunologicznych zawierających IgA w kłębuszkach, wykazanych w badaniu immunohistochemicznym lub immunofluoresencyjnym. Biopsje z rozpoznaną nefropatią IgA mogą prezentować szerokie spektrum obrazów histopatologicznych, mające odzwierciedlenie w klinicznym zróżnicowaniu nefropatii IgA, od niemal prawidłowych obrazów histopatologicznych do bardzo zaawansowanych zmian takich jak: twardnienie kłębuszków nerkowych i atrofia kanalików nerkowych. Wiele zmian histologicznych ma wartość prognostyczną. Zanik kanalików, włóknienie śródmiąższowe i twardnienie kłębuszków nerkowych odzwierciedlają zaawansowane stadium choroby i są najsilniejszymi histopatologicznymi predyktorami złego rokowania. W badaniach, w których porównywano szybkość progresji przewlekłej choroby nerek, a także odpowiedź na leczenie immunosupresyjne, największą wartość predykcyjną okazywały się mieć aktywne zmiany kłębuszkowe, takie jak: rozplem mezangialny oraz wewnątrzwołniczkowe lub zewnątrzwołniczkowe zwiększenie komórkowości [52]. W 2004 r. powstała międzynarodowa grupa badawcza, której celem było wypracowanie opartego na dowodach konsensusu kliniczno-patologicznego klasyfikacji nefropatii IgA. Celem działalności grupy było zidentyfikowanie cech histopatologicznych, które mogłyby dokładniej oceniać ryzyko progresji w IgAN, w tym cech przewidujących reakcję na leczenie immunosupresyjne lub inne terapie. W trakcie pracy dokonano analizy retrospektywnej danych klinicznych, uzyskanych od 265 dorosłych oraz dzieci z rozpoznaną nefropatią IgA, u których mediana czasu obserwacji wynosiła 5 lat. Biopsje nerek wszystkich pacjentów były oceniane przez patologów nie zapoznanych z danymi klinicznymi pacjentów. Zidentyfikowano 4 zmienne patologiczne o wysokiej wartości prognostycznej, niezależnie od danych klinicznych. Należą do nich:

- zwiększenie komórkowości mezangium,
- zwiększenie komórkowości wewnątrzwołniczkowej,
- segmentalne twardnienie kłębuszków nerkowych,
- atrofia kanalików/ włóknienie zrębu.

Wartość obecności półksiężyców nie została uwzględniona w powyższym badaniu z powodu ich niskiej częstości występowania w badanej kohorcie [53].

W 2014 roku opublikowano wyniki wieloośrodkowego badania VALIGA [54], walidującego klasyfikację oksfordzką w kohorcie europejskiej. Badanie to uwzględniało dane kliniczne pacjentów w połączeniu z cechami histopatologicznymi oraz brało pod uwagę wpływ leczenia na rokowanie. W badaniu VALIGA wzięło udział 1147 pacjentów z całym spektrum nefropatii IgA z 13 krajów europejskich. Mediana czasu obserwacji wynosiła 4,7 roku. Wśród badanych chorych 86% otrzymało w leczeniu blokery układu RAA, a 42% glikokortykosteroidy/leki immunosupresyjne. Wykazano, że cechy M, S i T niezależnie przewidywały utratę funkcji filtracyjnej i krótsze przeżycie nerek. U osób z eGFR <30 ml/min/1,73m², zmiany M i T niezależnie przewidywały gorsze przeżycie nerek. W grupie pacjentów z białkomoczem poniżej 0,5 g/dobę, cechy M i E były związane ze wzrostem białkomoczu >1 g/dobę. Zestawienie cech M, S i T wraz z danymi klinicznymi pacjentów istotnie poprawiły zdolność przewidywania progresji przewlekłej choroby nerek u pacjentów, którzy nie otrzymali leczenia immunosupresyjnego.

Tabela 1. Nefropatia IgA – zmodyfikowana Klasyfikacja Oksfordzka, skala MEST-C (2016 r.) [55].

Cecha	Parametr histopatologiczny	Natężenie zmian	Skala
M	Zwiększenie komórkowości mezangium	<50% kłębuszków	M 0
		>50% kłębuszków	M 1
E	Zwiększenie komórkowości wewnątrzwołniczkowej	Nieobecne	E 0
		Obecne	E 1
S	Segmentalne twardnienie kłębuszków	Nieobecne	S 0
		Obecne	S 1
T	Atrofia kanalików/ włóknienie zrębu	0-25% kory nerki	T 0
		25-50% kory nerki	T 1
		>50% kory nerki	T 2
C	Obecność półksiężyców	Nieobecne	C 0
		obecne w <25% kłębuszków	C 1
		obecne w ≥25% kłębuszków	C 2

W 2016 roku zaktualizowano oksfordzką klasyfikację nefropatii IgA o obecność półksiężyców. Przeanalizowano dane 3096 pacjentów, pochodzących z 4 retrospektywnych badań: VALIGA [54], Oxford [53,56] oraz dwóch badań azjatyckich [57,58]. Ustalono, że obecność półksiężyców komórkowych i włóknisto-komórkowych ma związek z szybkością utraty funkcji filtracyjnej nerek. Tym samym skala MEST została zaktualizowana o cechę C – obecność półksiężyców, gdzie: C0 oznacza brak półksiężyców, C1 – półksiężyce obecne w <25% kłębuszków oraz C2 – półksiężyce obecne w $\geq 25\%$ kłębuszków [55]. Zaktualizowaną Klasyfikację Oksfordzką przedstawia Tabela 1.

1.6 Leczenie nefropatii IgA

1.6.1 Leczenie wspomagające

1.6.1.1 Kontrola ciśnienia tętniczego

Ciśnienie krwi w nefropatii IgA wzrasta już we wczesnych etapach choroby w związku ze znaczną aktywacją układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAA) [59]. Lekami pierwszego rzutu w leczeniu hipotensyjnym są leki z grupy ACEI i ARB. Inne grupy leków, które mogą być wykorzystane w terapii to m.in.: niedihydropirydynowe blokery kanału wapniowego (werapamil, diltiazem), antagoniści aldosteronu, beta-adrenolityki [60]. Nie zaleca się stosowania dihydropirydonowych blokerów kanału wapniowego, z uwagi na ich działanie rozszerzające naczynia przedkłębuszkowe, co może zwiększać ciśnienie krwi w kłębuszkach nerkowych [61].

1.6.1.2 Inhibitory konwertazy angiotensyny (ACEI) oraz antagoniści receptora angiotensyny (ARB)

Blokadę układu RAA powodują leki z grupy ACEI i ARB, które powinny być stosowane jako leki hipotensyjne pierwszego rzutu u wszystkich chorych z nefropatią IgA. Leki te powinny być włączane u chorych z białkomoczem powyżej 0,5 g/dobę, niezależnie od tego czy występuje u nich nadciśnienie tętnicze (rekomendacja KDIGO 1B) [62]. Wykazano, że pacjenci z nefropatią IgA, leczeni ACEI lub ARB w celu kontroli ciśnienia tętniczego, mieli lepiej zachowaną czynność nerek niż pacjenci stosujący leki z innych grup [63]. ACEI należy stosować w maksymalnej tolerowanej dawce w celu redukcji białkomoczu. W badaniu STOP-IgAN, w którym zastosowano ACEI/ARB w połączeniu z innymi metodami leczenia wspomagającego, uznano je za równie skuteczne jak terapia skojarzona lekami

immunosupresyjnymi w zapobieganiu progresji przewlekłej choroby nerek [64]. Podwójna blokada RAA budzi kontrowersje. Wykazano, że skutkuje ona większą redukcją białkomoczu w porównaniu do monoterapii, jednak kosztem częstszych zdarzeń niepożądanych, bez wyraźnych dowodów na długotrwałą poprawę funkcji nerek [65,66].

1.6.1.3 Flozyny

Inhibitory kotransportera sodowo-glukozowego to grupa leków, które blokują w kanalikach nerkowych transporter sodu i glukozy (SGLT2), odpowiedzialny za wchłanianie zwrotne glukozy, zwiększając jej wydalanie z moczem. Początkowo opracowane zostały jako lek przeciwcukrzycowy, wkrótce stały się przedmiotem zainteresowania nefrologów przez swoje działanie nefro- oraz kardioprotekcyjne [67]. Dla dapagliflozyny, jednego z inhibitorów SGLT2, wykazano działanie nefroprotekcyjne u pacjentów z cukrzycą i bez cukrzycy. Dapagliflozyna została zatwierdzona do leczenia przewlekłej choroby nerek. W badaniu fazy III DAPA-CKD stwierdzono, że jej zastosowanie powoduje zmniejszenie o 39% ryzyka wystąpienia przewlekłej choroby nerek i zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych lub nerkowych u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek. Dapagliflozyna dodana do standardowego leczenia prowadziła do zmniejszenia częstości występowania złożonego nerkowego punktu końcowego lub ryzyka zgonu z przyczyn sercowo-naczyniowych lub nerkowych o 39% w porównaniu z placebo u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek w stopniu 2-4 i ze zwiększonym wydalaniem albumin [68]. W badaniu DAPA-CKD wzięli także udział pacjenci z nefropatią IgA. Spośród 270 uczestników z nefropatią IgA, 137 losowo przydzielono do grupy otrzymującej dapagliflozynę, a 133 do grupy otrzymującej placebo. Mediana czasu obserwacji wynosiła 2,1 roku. W badaniu udowodniono, że dapagliflozyna zmniejszała stosunek albuminy do kreatyniny w moczu o 26% w porównaniu z placebo. Zdarzenia niepożądane prowadzące do odstawienia badanego leku były podobne w obu grupach, co potwierdziło korzystny profil bezpieczeństwa leku [69].

1.6.1.4 Prozdrowotny tryb życia

Udowodniono, że stosowanie diety niskosodowej jest korzystne w nefropatii IgA. Wpływa ona na prawidłową kontrolę ciśnienia krwi, co zapobiega uszkodzeniu kłębuszków nerkowych. Jedno z badań wykazało także, że dieta niskosodowa ma wpływ na zmniejszenie białkomoczu nawet przy prawidłowym ciśnieniu krwi [70]. W badaniach na szczurach wykazano, że działanie nefroprotekcyjne leków z grupy ACEI/ARB nie jest skuteczne przy stosowaniu diety bogatej w sód [71]. Dodatkowymi elementami leczenia wspomagającego są:

aktywność fizyczna oraz unikanie stosowania w leczeniu przeciwbólowym niesteroidowych leków przeciwzapalnych [60]. Istnieją również badania, które wskazują, że palenie papierosów może być niezależnym i/lub zależnym od dawki czynnikiem ryzyka postępującej utraty funkcji nerek [72].

Udowodniono także, że bardzo wysoki, a także bardzo niski wskaźnik masy ciała (*body mass index*, BMI), koreluje ze zwiększoną chorobowością oraz śmiertelnością w przewlekłej chorobie nerek [73]. W jednym z badań wykazano związek między niskim BMI ($<18,5 \text{ kg/m}^2$) a prawdopodobieństwem wystąpienia schyłkowej niewydolności nerek (SNN) w nefropatii IgA [74]. Udowodniono także, że pacjenci z podwyższonym BMI ($>23 \text{ kg/m}^2$) mieli niższe wskaźniki remisji białkomoczu po leczeniu [75]. Uważa się, że otyłość zwiększa białkomocz poprzez wywoływanie ultrastrukturalnych zmian w błonie podstawnej kłębuszków nerkowych [76]. Redukcja masy ciała w połączeniu maksymalną blokadą RAA, kontrolą nadciśnienia i ograniczeniem sodu w diecie jest korzystna dla pacjentów z rozpoznaną nefropatią IgA [77].

1.6.2 Leczenie immunosupresyjne

Wiele leków immunosupresyjnych zostało przebadanych pod względem skuteczności u pacjentów z nefropatią IgA. Należą do nich m.in.: glikokortykosteroidy, cyklofosfamid, azatiopryna, mykofenolan mofetilu. Wytyczne na temat leczenia immunosupresyjnego są jednak oparte na małej liczbie badań i nadal brakuje jednoznacznych standardów postępowania [78–80].

1.6.2.1 Glikokortykosteroidy

Znaczenie glikokortykosteroidów w leczeniu nefropatii IgA pozostaje tematem dyskusji. Wytyczne KDIGO [62] zalecają stosowanie glikokortykosteroidów ogólnoustrojowo u chorych z białkomoczem przekraczającym 1 g/dobę oraz $\text{eGFR} >50 \text{ ml/min/1,73m}^2$ pomimo stosowania leczenia wspomagającego. Najpowszechniej stosowany jest schemat Pozziego obejmujący podanie metyloprednizolonu $0,5\text{--}1,0 \text{ g i.v.}$ przez 3 dni w pierwszym, trzecim i piątym miesiącu oraz prednizonu doustnie $0,5 \text{ mg/kg}$ co drugi dzień przez 6 miesięcy [81–83].

W badaniu retrospektywnym VALIGA wykazano korzyści ze stosowania glikokortykosteroidów u pacjentów z białkomoczem $>1 \text{ g/dobę}$ i $\text{eGFR} <50 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Najlepsze efekty leczenia glikokortykosteroidami uzyskano u chorych z białkomoczem

>3 g/dobę. Nie zebrano jednak danych dotyczących bezpieczeństwa terapii i występowania działań niepożądanych [54].

W badaniu STOP-IgAN, pacjenci początkowo otrzymywali terapię wspomagającą przez okres 6 miesięcy, następnie chorzy z eGFR >60 ml/min/1,73m² byli leczeni glikokortykosteroidami w monoterapii przez 6 miesięcy. Z kolei osoby z eGFR 39-50 ml/min/1,73m² otrzymali cyklofosfamid przez 3 miesiące, a następnie azatioprynę i glikokortykosteroidy podawane doustnie. Chorych obserwowano przez okres 3 lat [64]. Wykazano, że leczenie immunosupresyjne dodane do leczenia wspomagającego nie przyniosło jednoznacznych korzyści. W grupie pacjentów z wyjściowym eGFR >60 ml/min/1,73m² wykazano większe szanse na osiągnięcie pełnej remisji klinicznej w monoterapii glikokortykosteroidami, niż w przypadku leczenia wspomagającego, podczas gdy pacjenci z wyjściowym eGFR 30-59 ml/min/1,73 m² leczeni immunosupresyjnie terapią skojarzoną mieli podobne wskaźniki remisji klinicznej jak przy leczeniu wspomagającym. Wskaźniki utraty funkcji nerek (eGFR) nie różniły się między schematami leczenia. Należy wziąć pod uwagę fakt, że u chorych leczonych glikokortykosteroidami lub terapią skojarzoną częściej niż w przypadku leczenia wspomagającego występowały działania niepożądane takie jak: ciężkie infekcje, upośledzona tolerancja glukozy i/lub przyrost masy ciała. Indywidualizując schemat leczenia trzeba więc dążyć do zachowania równowagi pomiędzy potencjalnymi korzyściami a ryzykiem wystąpienia efektów ubocznych terapii glikokortykosteroidami [84,85].

Kolejnym badaniem dotyczącym immunosupresji w nefropatii IgA było badanie TESTING, w którym pacjenci otrzymywali leki z grupy ACEI przez co najmniej 3 miesiące, a następnie podzielono ich na dwie grupy: jedna otrzymywała placebo, a druga metyloprednisolon doustnie w dużej dawce (0,6–0,8 mg/kg/dobę; maksymalnie 48 mg/dobę) ze stopniową redukcją dawki przez 6-8 miesięcy. Wyjściowo średni białkomocz u chorych wynosił 2,4 g/dobę, a eGFR 60 ml/min/1,73m². Badanie przerwano z uwagi na poważne zdarzenia niepożądane, które wystąpiły u 14,7% pacjentów w grupie otrzymującej metyloprednisolon w porównaniu z 3,2% w grupie placebo (poważne infekcje, w tym dwa zgony). Wyniki uzyskane do momentu zakończenia wskazywały na większą skuteczność glikokortykosteroidów w porównaniu z ACEI/ARB [86].

1.6.2.2 Cyklofosfamid (CTX)

Cyklofosfamid nie jest powszechnie stosowany w leczeniu IgAN u pacjentów z przewlekłym, powolnym przebiegiem klinicznym. Wskazany jest w grupie pacjentów

z ryzykiem szybkiej progresji choroby nerek – gwałtownie postępującym kłębuszkowym zapaleniem nerek z obecnością półksiężyców [60].

1.6.2.3 Azatiopryna (AZA)

Nie udowodniono żadnych korzyści u pacjentów otrzymujących dodatkowe leczenie azatiopryną w porównaniu z pacjentami otrzymującymi glikokortykosteroidy w monoterapii, podczas gdy częstotliwość zdarzeń niepożądanych była istotnie wyższa [87].

1.6.2.4 Mykofenolan mofetilu (MMF)

Mykofenolan mofetilu był badany u pacjentów z nefropatią IgA w różnych populacjach. Badania te przyniosły zróżnicowane wyniki, różnią się one także jakością, doborem pacjentów i czasem trwania leczenia.

Badania przeprowadzone na pacjentach populacji azjatyckiej wykazały korzystny wpływ MMF u pacjentów z nefropatią IgA. Pierwsze badanie chińskie obejmowało 62 pacjentów z IV i V stopniem zaawansowania zmian histopatologicznych wg skali Lee-Haasa i białkomoczem >2 g/dobę. Pacjenci, którzy otrzymali MMF wykazywali poprawę w zakresie białkomoczu i stężenia lipidów w surowicy w porównaniu z tymi, którzy otrzymali prednizon. Ponadto leczenie MMF wiązało się zmniejszą ilością działań niepożądanych oraz lepszą tolerancją [88]. Badanie z Hongkongu obejmowało 40 pacjentów z utrzymującym się białkomoczem >1 g/dobę i łagodnymi zmianami histopatologicznymi pomimo stosowania leczenia ACEI/ARB. U chorych poddanych leczeniu mykofenolanem mofetylu przez 6 miesięcy doszło do istotnego zmniejszenia białkomoczu i poprawy przeżywalności nerek w 6-letniej obserwacji w porównaniu z zastosowaniem samego blokera RAA [89].

Przeprowadzono także badania w populacji kaukaskiej. Do jednego z nich włączono 34 pacjentów z zaburzeniami czynności nerek (eGFR $20 - 70$ ml/min/1,73m²), białkomoczem dobowym >1 g/dobę, niekorzystnymi zmianami w badaniu histopatologicznym oraz nadciśnieniem tętniczym. Wszyscy stosowali dietę niskosodową oraz leczenie ACEI/ARB. Udowodniono, że leczenie wysokimi dawkami MMF (3 g/dobę) przez 3 lata, które otrzymało 21 chorych nie przyniosło korzystnego efektu w zakresie funkcji filtracyjnej nerek oraz nasilenia białkomoczu w porównaniu z grupą otrzymującą placebo (13 chorych) [90]. Podobne badanie przeprowadzono w USA. Obejmowało ono pacjentów z zaawansowaną przewlekłą chorobą nerek, u których stosowano MMF w dawce 2 g/dobę jako terapię „ratunkową”. Nie

obserwowano korzyści u pacjentów otrzymujących MMF, w porównaniu z grupą otrzymującą placebo [91]. Biorąc pod uwagę wyniki powyższych badań w wytycznych nie ma jednoznacznych wskazań do stosowania mykofenolanu mofetilu u pacjentów z nefropatią IgA. Istnieją natomiast przesłanki do stosowania MMF w dawce 1,5-2 g/dobę w leczeniu skojarzonym z prednizonem u pacjentów z dużą aktywnością morfologiczną i kliniczną choroby (ubytek filtracji kłębuszkowej, aktywny osad moczu) [92].

1.6.2.5 Inhibitory kalcyneuryny (IK)

Inhibitory kalcyneuryny nie są zalecane w leczeniu nefropatii IgA. Badanie dotyczące stosowania cyklosporyny wykazało brak skuteczności i nefrotoksyczność terapii [93]. Jednak metaanaliza 10 badań z udziałem 472 pacjentów wykazała, że takrolimus w skojarzeniu z glikokortykosteroidami istotnie zmniejszył białkomocz w porównaniu z pacjentami z grupy kontrolnej, nie nasilając działań niepożądanych [94]. Jego długoterminowa skuteczność i bezpieczeństwo w IgAN wymaga dalszych badań.

1.6.2.6 Rytuksymab (RTX)

Rytuksymab jest szeroko stosowanym przeciwciałem monoklonalnym, które działa na receptor CD20 znajdujący się na limfocytach B. Spekulowano, czy rytuksymab może redukować stężenia Gd-IgA1 oraz produkcję przeciwciał anty-Gd-IgA1 w klasie IgG poprzez deplecję limfocytów B, co miałyby działać nefroprotekcyjnie. Przeprowadzone badania wykazały jednak brak wpływu RTX na stężenie Gd-IgA1, stężenie autoprzeciwciał, białkomocz oraz eGFR. Z tego powodu rytuksymab nie jest zalecany w wytycznych w leczeniu nefropatii IgA [95].

Inne leki, takie jak: ataticcept, fostamatynib, bortezomib, acthar, avacopan pozostają wciąż w fazie badań klinicznych.

2 Cele pracy

Aktualnie nie są dostępne nieinwazyjne biomarkery diagnostyczne w nefropatii IgA. Celem przeprowadzonego badania była ocena przydatności oznaczeń ekspresji i/lub stężenia wybranych biomarkerów do rozpoznania, oceny aktywności, a także przewidywania przebiegu przewlekłej choroby nerek w grupie chorych leczonych z powodu nefropatii IgA w jednym ośrodku.

Cele szczegółowe obejmowały:

1. Określenie ekspresji receptora CD89 na neutrofilach i monocytach metodą cytometrii przepływowej.
2. Ocenę stężenia niedogalaktozylowanej immunoglobuliny IgA1 (Gd-IgA1) oraz rozpuszczalnego receptora CD89 (sCD89) metodą ELISA w surowicy.
3. Ocenę stężenia rozpuszczalnego receptora CD89, receptora transferyny 1 (CD71, TfR) oraz enzymu transglutaminazy 2 (TG2) metodą ELISA w moczu.
4. Analizę zależności ekspresji i/lub stężeń badanych biomarkerów w surowicy krwi i w moczu oraz parametrów klinicznych aktywności choroby.
5. Analizę zależności ekspresji i/lub stężeń badanych biomarkerów w surowicy krwi i w moczu oraz zmian histopatologicznych w bioptatach nerek.

3 Materiał

Badanie zostało przeprowadzone w okresie od września 2017 r. do listopada 2021 r. W badaniu wzięli udział pacjenci Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu, którzy otrzymali informację na temat badania oraz wyrazili na nie pisemną, świadomą zgodę. Na przeprowadzenie badań została wyrażona zgoda Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu (nr KB-648/2018).

Do badania kwalifikowano pacjentów powyżej 18 roku życia, z potwierdzoną biopsyjnie nefropatią IgA. Wykluczono pacjentów z aktywną infekcją, z rozpoznaną chorobą nowotworową, po przeszczepieniu nerki oraz chorych, u których przewidywana konieczność rozpoczęcia leczenia nerkozastępczego była krótsza niż 6 miesięcy, a także z nefropatią IgA wtórną do innych chorób. Grupa badana liczyła 48 osób, w tym 19 kobiet (39,6%) i 29 mężczyzn (60,4%) w wieku od 22 do 76 lat. Średnia wieku grupy badanej wynosiła $42,0 \pm 14,5$ lat (mediana 40 [32-52] lat).

Leczenie nefropatii IgA u pacjentów włączonych do badania było prowadzone w Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu. Leki były wdrażane na podstawie wskazań klinicznych, zgodnie z obowiązującą wiedzą medyczną.

Po uzyskaniu wyniku badania histopatologicznego, w którym rozpoznano nefropatię IgA, leczenie immunosupresyjne otrzymało 38 chorych (79,2%), w tym 31 chorych (64,6%) otrzymało leczenie wg schematu Pozziego, a 5 pacjentów (10,4%) było leczonych glikokortykosteroidami w zmiennych dawkach. U 2 osób (4,2%) stosowano mykofenolan mofetilu w monoterapii z uwagi na obecność czynników ryzyka miażdżycy. W leczeniu immunosupresyjnym stosowano ponadto cyklosporynę (13 pacjentów, 27%), mykofenolan mofetylu (łącznie 13 pacjentów, 27%), takrolimus (9 pacjentów, 18,8%), azatioprynę (6 pacjentów, 12,5%), rytuksymab (6 pacjentów, 12,5%) oraz cyklofosfamid (4 pacjentów 8,3%). Równolegle z leczeniem immunosupresyjnym, stosowano leczenie nefroprotecyjne.

Z uwagi na małą aktywność choroby (białkomocz subnerczycowy oraz prawidłowa funkcja filtracyjna) lub zaawansowanie zmian wstecznych, stwierdzonych w badaniu

histopatologicznym biopsji nerki, u 3 chorych (6,3%) nie włączono farmakoterapii, a 7 chorych (14,6%) otrzymało wyłącznie leczenie nefroprotekcyjne.

Ocena biomarkerów w surowicy krwi i moczu została wykonana w próbkach pobranych od pacjentów w chwili kwalifikacji do badania. Uzyskane wyniki zostały przeanalizowane w odniesieniu do klinicznych i laboratoryjnych wykładników postępu przewlekłej choroby nerek w przebiegu nefropatii IgA. W badaniu uwzględniono wyniki badania histopatologicznego materiału pobranego w trakcie biopsji nerki w celu oceny zaawansowania choroby nerek przy użyciu skali MEST-C. Średni czas od momentu wykonania biopsji do momentu włączenia do badania wynosił $26,4 \pm 35,0$ miesięcy (mediana 10 [3,5-35,5] miesięcy). Analiza objęła również czynniki demograficzne oraz dane kliniczne, w tym stosowanie immunosupresji. W badaniu, za zgodą pacjentów, wykorzystano dane kliniczne oraz laboratoryjne, rutynowo oznaczane w Laboratorium Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu w trakcie hospitalizacji pacjentów w Klinice Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej. Uwzględniono następujące parametry: morfologia krwi, stężenie białka całkowitego, albumin, kreatyniny oraz CRP w surowicy krwi, wielkość przesączania kłębuszkowego (eGFR), badanie ogólne moczu, szacunkowy białkomocz dobowy, obecność erytrocyturii. Dodatkowo analizie poddano wybrane wskaźniki długoterminowego przeżycia nerkowego, w tym wielkość filtracji kłębuszkowej oraz nasilenie białkomoczu (do stycznia 2023).

Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych ochotników, 9 kobiet (45%) oraz 11 mężczyzn (55%) w wieku $44,0 \pm 12,1$ lat (mediana 41,5 [33,5-57,5]). Grupa kontrolna nie różniła się w sposób istotny statystycznie pod względem wieku ($p=0,450$) oraz płci ($p=0,441$) od grupy badanej.

4 Metody

4.1 Pobieranie i przechowywanie materiału biologicznego

Od każdego z uczestników badania w dniu włączenia do badania pobrano trzy próbki materiału biologicznego. 4 ml krwi obwodowej pobierano do próbówki z aktywatorem krzepnięcia. Po wykrzepieniu przez 20 minut w temperaturze pokojowej, próbki krwi wirowano 10 min, 1000×g. Uzyskaną po odwirowaniu surowicę dzielono na porcje i przechowywano w temperaturze poniżej -70°C do czasu przeprowadzenia oceny biomarkerów. 2 ml krwi obwodowej pobierano do próbówki z heparyną litową w celu oceny ekspresji CD89 na monocytach i neutrofilach, badanie to wykonywano w dniu pobrania materiału. Próbki porannego moczu (10 ml) odwirowywano 10 min, 1000×g. Supernatant dzielono na porcje i przechowywano w temperaturze poniżej -70°C do czasu przeprowadzenia oceny biomarkerów.

4.2 Ekspresja CD89 na komórkach krwi obwodowej

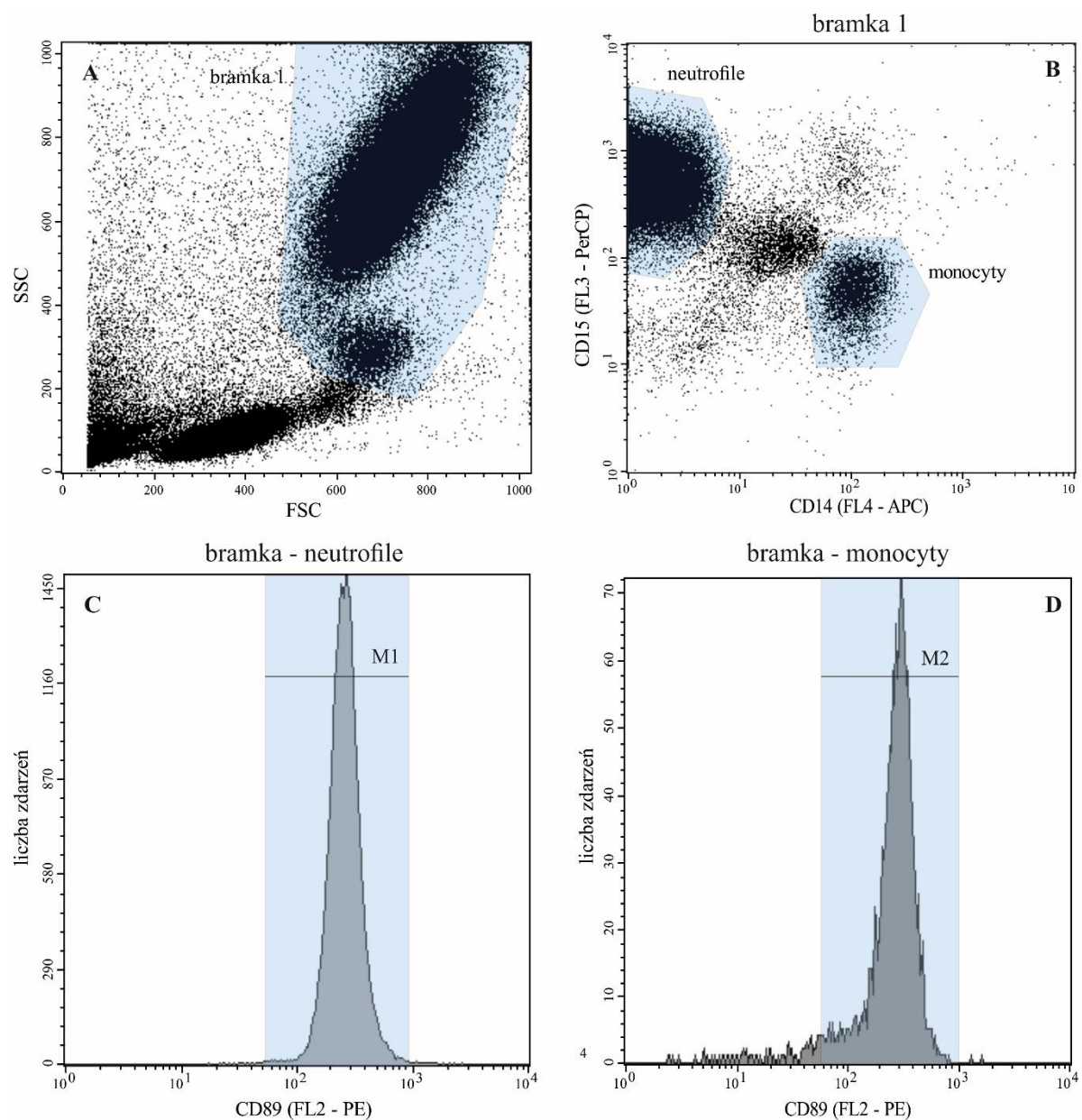
Ekspresję CD89 na monocytach i granulocytach oznaczano w próbkach pełnej krwi obwodowej z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Barwienie próbek krwi (300 µl) przeprowadzono z wykorzystaniem mysich przeciwciał monoklonalnych (Becton Dickinson):

- anty-CD89-PE, klon A59, nr kat. 555686 (20 µl),
- anty-CD15- PerCP-Cy5.5, klon HI98, nr kat. 560828 (5 µl),
- anty-CD14-APC, klon M5E2, nr kat. 555399 (20 µl).

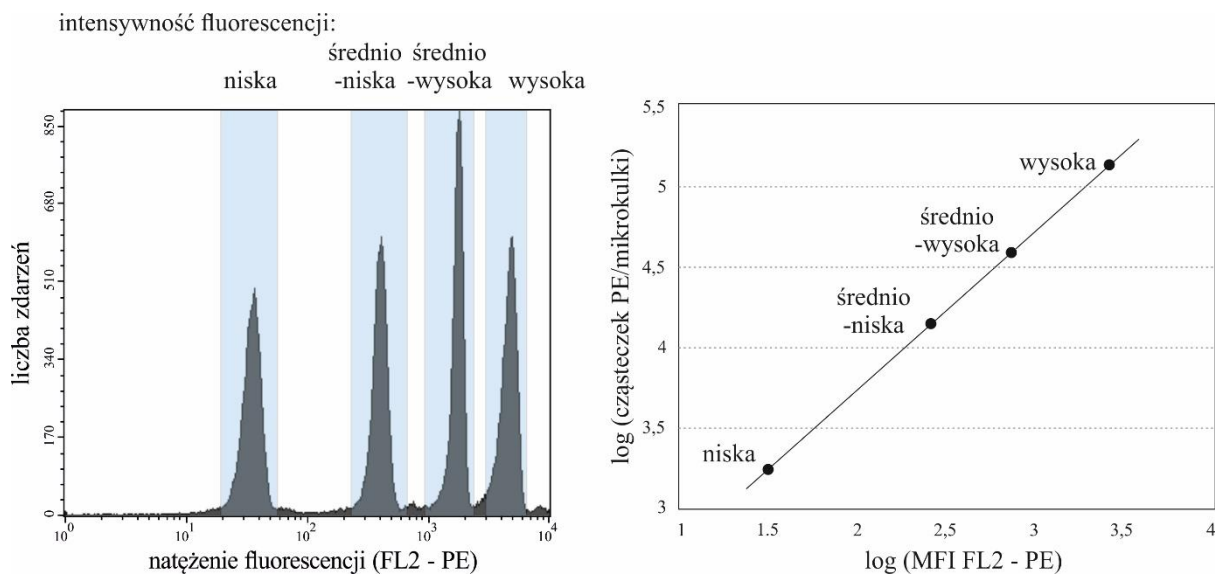
Próbkę inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Lizę erytrocytów przeprowadzano z wykorzystaniem płynu lizującego BD Lysing Solution (Becton Dickinson). W tym celu po inkubacji z przeciwciałami dodawano 2,7 ml 10-krotnie rozcieńzonego koncentratu płynu lizującego i inkubowano w temperaturze pokojowej bez dostępu światła przez 15 minut. Próbkę odwirowano (350×g, 5 minut, 4°C), a osad komórkowy dwukrotnie wypłukano dodając za każdym razem 2 ml buforu płuczącego Stain Buffer (FBS) BD Pharmingen (Becton Dickinson) i wirując w analogicznych warunkach. Wypłukany osad komórkowy zawieszano w 300 µl buforu płuczącego i analizowano na czterokolorowym cytometrze przepływowym BD FACSCalibur przy użyciu oprogramowania CELLQUEST (Becton Dickinson). Dla poszczególnych próbek analizowano średnią intensywność

fluorescencji znacznika PE osobno w populacjach monocytów i neutrofilii. Schemat analizy przykładowej próbki krwi przedstawiono na Rycinie 1.

Oszacowanie poziomu ekspresji CD89 na wybranych populacjach komórek możliwe było dzięki zastosowaniu referencyjnego zestawu Quantibrite™ PE Phycoerytin Fluorescence Quantitation Kit (Becton Dickinson). Zestaw zawiera 4 populacje mikrokulek o znanej gęstości znaczników PE (Rycina 2). Równoległa analiza próbki badanej i zestawu referencyjnego pozwala na powiązanie wartości MFI z ilościowym opisem poziomu ekspresji badanego markera.



Rycina 1. Przykładowa analiza próbki krwi z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.



Rycina 2. Przykładowa analiza referencyjnego zestawu Quantibrite™ PE Phycoerytin Fluorescence Quantitation Kit (Becton Dickinson)

4.2.1 Ocena stężenia biomarkerów w surowicy i moczu

Stężenie cząsteczki Gd-IgA1 w surowicy krwi oceniono testem immunoenzymatycznym Gd-IgA1 Galactose-deficient IgA1 Assay Kit (nr kat. 27600, IBL-International) zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Czulość metody wynosi 0,49 ng/ml, a zakres metody to 1,56-100 ng/ml. Wszystkie próbki surowicy zostały rozcieńczone 201 razy, a wyniki przedstawiono po uwzględnieniu rozcieńczenia materiału.

Stężenie rozpuszczalnej cząsteczki CD89 w surowicy krwi i moczu oceniono testem immunoenzymatycznym Human FCAR/CD89 ELISA Kit (numer kat. LS-F35810, LifeSpan BioSciences, Inc.) zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Czulość testu wynosi 0,47 ng/ml, a zakres pomiarowy 0,78-50 ng/ml. Próbki surowicy analizowano po 2-krotnym rozcieńczeniu, a wyniki przedstawiono po uwzględnieniu rozcieńczenia materiału. Oznaczenia próbek moczu wykonywano bez rozcieńczenia. Stężenia CD89 w moczu przedstawiono w przeliczeniu na mg kreatyniny.

Badanie poziomu cząsteczki TG2 w moczu wykonano testem immunoenzymatycznym Human Transglutaminase2/TG2 ELISA Kit (numer kat. EH462RB, Invitrogen) zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Czulość metody wynosi 0,82 ng/ml, a zakres pomiarowy testu

0,82-200 ng/ml. Próbki moczu nie były rozcieńczane w trakcie analizy. Stężenia TG2 w moczu przedstawiono w przeliczeniu na mg kreatyniny.

Badanie poziomu cząsteczki CD71 w moczu wykonano testem immunoenzymatycznym Human TfR/Transferrin R/CD71 ELISA Kit (numer kat. EH448RB, Invitrogen) zgodnie z instrukcją producenta zestawu. Czulość metody wynosi 0,81 ng/ml, a zakres pomiarowy testu 0,82-200 ng/ml. Próbki moczu nie były rozcieńczane w trakcie badania. Stężenia CD71 w moczu przedstawiono w przeliczeniu na mg kreatyniny.

Wszystkie testy immunoenzymatyczne wykonano przy użyciu automatycznej płuczki do płytek 96-dołkowych HydroFlex (Tecan), spektrofotometru do płytek 96-dołkowych Elx800 (Biotek) oraz oprogramowania analizującego Gen 5 2.09 (Biotek).

4.3 Ocena histopatologiczna bioptatów nerki

Ocena histopatologiczna bioptatów nerki została przeprowadzona w Katedrze i Zakładzie Patomorfologii i Cytologii Onkologicznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Do badań wykorzystano materiał tkankowy utrwalony w 10% roztworze buforowanej formaliny i zatopiony w bloczkach parafinowych. Z bloczków parafinowych zawierających utrwalone tkanki przy użyciu mikrotomu sporządzano skrawki grubości 5 μ m, które następnie odparafinowywano w ksylenie i umieszczano na szkiełkach podstawowych firmy Super Frost Plus (Menzel GLASSER, Braunschweig, Niemcy), które następnie wybarwiano metodami rutynowo stosowanymi w nefropatologii (HE, PAS, trichrom Mallory'ego, czerwień Kongo).

Ocenę patomorfologiczną przeprowadzono przy użyciu skali MEST-C [55]. Uwzględniono następujące cechy histopatologiczne:

1) zwiększenie komórkowości mezangium (M), gdzie:

0 – oznacza zwiększenie komórkowości mezangium (które jest definiowane jako obecność ≥ 4 w 1 lub więcej segmentach kłębuszkowych) w $\leq 50\%$ kłębuszków;

1 – zwiększenie komórkowości mezangium w $>50\%$ kłębuszków;

2) ocena komórkowości wewnątrzłośniczkowej (E), gdzie:

0 – brak wzrostu komórkowości;

1 – zwiększenie komórkowości obecne przynajmniej w niektórych włóscinkach;

3) segmentalne twardnienie kłębuszków (S), gdzie:

0 – brak cech twardnienia segmentalnego;

1 – cechy twardnienia segmentalnego obecne w co najmniej 1 kłębuszku;

4) włóknienie zrębu i zanik cewek (T), gdzie:

0 – obszar kory nerki objęty włóknieniem zrębu i zanikiem cewek $\leq 25\%$ powierzchni dostępnej ocenie;

1 – obszar kory nerki objęty włóknieniem zrębu i zanikiem cewek obejmuje 25-50% powierzchni dostępnej ocenie;

2 – obszar kory nerki objęty włóknieniem zrębu i zanikiem cewek obejmuje $>50\%$ powierzchni dostępnej ocenie;

5) obecność półksiężyców (C), gdzie:

0 – brak półksiężyców;

1 – półksiężyce obecne w $<25\%$ kłębuszków;

2 – półksiężyce obecne w $\geq 25\%$ kłębuszków.

4.4 Standardowe oznaczenia laboratoryjne

Standardowe oznaczenia laboratoryjne: morfologia krwi obwodowej, stężenia białka całkowitego, albumin, kreatyniny w surowicy krwi, badanie ogólne moczu, stężenie białka i kreatyniny w próbce moczu porannego wykonywano przy użyciu komercyjnych testów diagnostycznych w Laboratorium Diagnostycznym Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego.

4.4.1 Ocena białkomoczu dobowego oraz aktywnego osadu moczu

Aktywny osad moczu definiowany był jako obecność 6 lub więcej erytrocytów w polu widzenia w mikroskopowej analizie w osadzie moczu.

Białkomocz dobowy szacowano na podstawie pomiaru stężenia białka oraz kreatyniny w porannej próbce moczu (UPCR, *urinary protein/creatinine ratio*), przy założeniu, że średnie wydalanie kreatyniny z moczem wynosi 1 g/dobę. Wskaźnik obliczano ze wzoru:

$$UPCR = \text{stężenie białka w moczu (g/l)} \times 100 / \text{stężenie kreatyniny w moczu (mg/dl)}.$$

Wyliczona wartość UPCR odpowiada szacowanemu białkomoczowi dobowemu wyrażonemu w g/dobę.

4.4.2 Ocena funkcji wydalniczej nerek

Zastosowano kryteria podziału przewlekłej choroby nerek zgodne z wytycznymi KDIGO 2021 [62] według aktualnego szacunkowego współczynnika przesączania kłębuszkowego, eGFR (ang. *estimated glomerular filtration rate*). Wskaźnik eGRF wyliczany był według uproszczonego wzoru MDRD (ang. *Modification of Diet in Renal Disease*):

$$eGFR (ml/min/1,73m^2) = 186,3 \times st. \text{ kreatyniny}^{-1,154} \times \text{wiek}^{-0,203} \times [0,742 \text{ dla kobiet}] [96].$$

4.5 Analizy statystyczne

W podstawowych tabelach zbiorczych dane liczbowe opisywano podając wartość średnią \pm odchylenie standardowe (SD) oraz medianę i zakres międzykwartyłowy (IQR, zakres podany w nawiasach kwadratowych). Ocenę podobieństwa rozkładu zmiennych liczbowych do rozkładu normalnego przeprowadzono przy zastosowaniu testu Shapiro-Wilka. W przypadku większości zmiennych nie stwierdzono podobieństwa rozkładu do rozkładu normalnego. Różnice pomiędzy grupami analizowano zatem testem Manna-Whitneya (2 grupy) lub testem rangowym Kruskala-Wallisa (3 lub więcej grup) uzupełnionym analizą post-hoc według Conovera [97]. Współzależności pomiędzy zmiennymi oceniano korelacją rang Spearmana. Dane jakościowe przedstawiano jako liczebność (%). Różnice w częstościach porównywano testem chi-kwadrat lub dokładnym testem Fishera. Ocenę przeżycia przeprowadzano za pomocą analizy krzywych Kaplana-Meiera i testem log-rank.

Istotność statystyczną dla wszystkich analiz przyjęto na poziomie prawdopodobieństwa $p < 0,05$. Obliczenia statystyczne wykonano z wykorzystaniem pakietu Statistica v.13 (Tibco Software Inc.) oraz MedCalc (MedCalc Software, Ltd.).

5 Wyniki

5.1 Analiza obrazów histopatologicznych bioptatów nerki

W grupie badanej oceniono obrazy histopatologiczne bioptatów nerek pobranych od pacjentów ze wskazań klinicznych. Do badania zostali zakwalifikowani pacjenci, u których w badaniu patomorfologicznym rozpoznano nefropatię IgA. Zwiększenie komórkowości mezangium (M=1) stwierdzono w przypadku 43 bioptatów (89,6%), a zwiększenie komórkowości wewnątrzwołniczkowej (E=1) obserwowane było w 9 (18,8%) bioptatach. Segmentalne twardnienie kłębuszków (S=1) wystąpiło w 37 (77,1%) preparatów, a włóknienie zrębu i zanik cewek (T=1) w 10 (20,8%). W analizowanych bioptatach nie obserwowano włóknienia zrębu i zaniku cewek o stopniu T=2. Ponadto w 5 (10,4%) przypadkach zaobserwowano obecność półksiężyców (C=1), a w 3 C=2 (6,3%).

Analizie poddano jedynie cechy nieodwracalne (obecność segmentalnego twardnienia kłębuszków oraz włóknienia zrębu i zaniku cewek) ze względu na różny czas, który upłynął od momentu wykonania biopsji nerki do włączenia do badania.

W Tabeli 2 przedstawiono charakterystykę histopatologiczną bioptatów z podziałem na kategorie o różnym stopniu zaawansowania zmian o charakterze nieodwracalnym.

Tabela 2. Częstość obserwowanych obrazów histopatologicznych w bioptatach nerek pacjentów włączonych do badania z podziałem na kategorie o różnym stopniu zaawansowania zmian o charakterze nieodwracalnym.

S=0 T=0 11 (22,9%)	S=1 T=0 27 (56,3%)	S=1 T=1 10 (20,8%)
M=1 E=0 S=0 T=0 C=0 8 (16,7%)	M=0 E=0 S=1 T=0 C=0 4 (8,3%)	M=0 E=0 S=1 T=1 C=0 1 (2,1%)
M=1 E=1 S=0 T=0 C=1 1 (2,1%)	M=1 E=0 S=1 T=0 C=0 21 (43,7%)	M=1 E=0 S=1 T=1 C=0 4 (8,3%)
M=1 E=1 S=0 T=0 C=2 2 (4,2%)	M=1 E=1 S=1 T=0 C=0 2 (4,2%)	M=1 E=0 S=1 T=1 C=2 1 (2,1%)
		M=1 E=1 S=1 T=1 C=1 4 (8,3%)

5.2 Charakterystyka kliniczna pacjentów w okresie okołobiopsyjnym

W przypadku 18 (37,5%) pacjentów w momencie wykonania biopsji obserwowano obniżoną funkcję filtracyjną nerek (eGFR <60 ml/min/1,73m²). Dla całej grupy średnie stężenie kreatyniny w surowicy w okresie okołobiopsyjnym wynosiło 1,343±0,623 mg/dl (mediana 1,27 [0,90-1,60] mg/dl), co odpowiadało eGFR średnio 67,8±28,7 ml/min/1,73m² (mediana 67 [46-82,5] ml/min/1,73m²). Średni białkomocz oszacowany na podstawie stosunku białka do kreatyniny w moczu (UPCR) wynosił 2,83±2,61, mediana 1,9 [0,9-3,9] g/dobę. U 7 (14,6%) pacjentów stwierdzono białkomocz nerczycowy, u 38 (79,2%) subnerczycowy, a u 3 (6,2%) nie obserwowano białkomoczu w okresie okołobiopsyjnym.

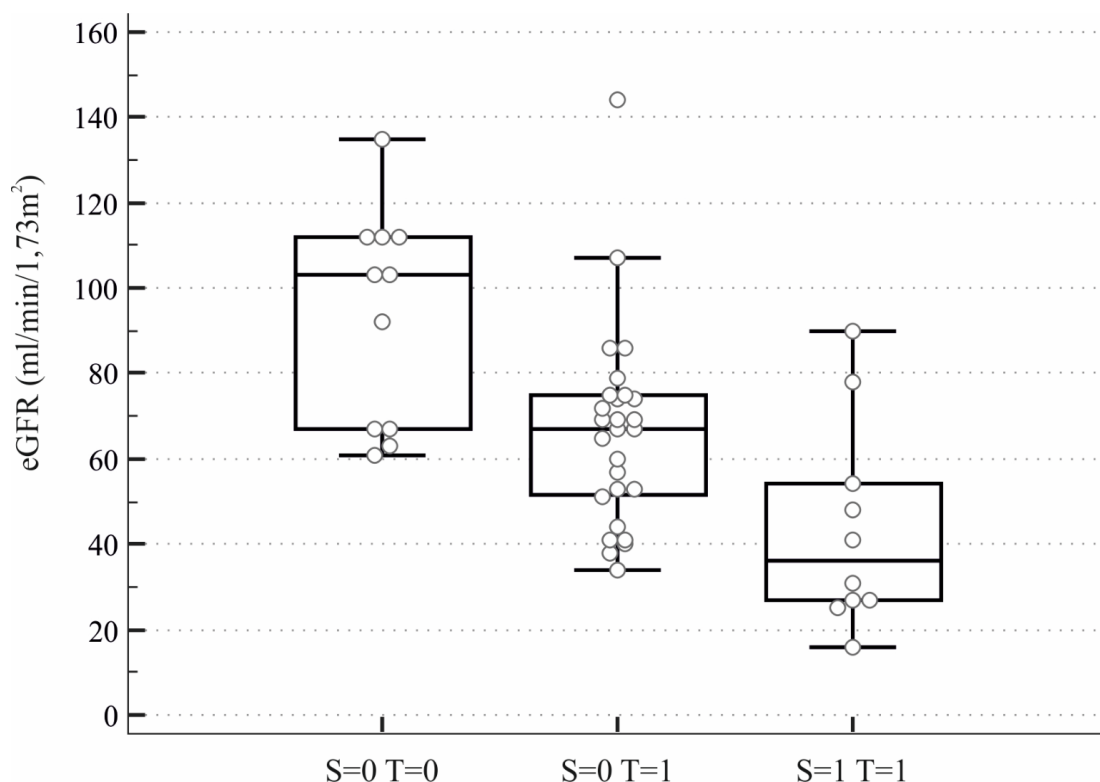
5.3 Zależność pomiędzy stanem klinicznym w okresie okołobiopsyjnym a obrazem histopatologicznym

Przeanalizowano związek pomiędzy czynnością nerek oraz białkomoczem w okresie okołobiopsyjnym a parametrami histopatologicznymi (Tabela 3). Zaobserwowano istotną statystycznie zależność pomiędzy występowaniem segmentalnego twardnienia kłębuszków oraz włóknienia zrębu i zaniku cewek a upośledzeniem funkcji filtracyjnej (Rycina 3).

Tabela 3. Zależność pomiędzy stanem klinicznym w okresie okołobiopsyjnym a nasileniem zmian nieodwracalnych w bioptacie nerki.

	S=0 T=0	S=1 T=0	S=1 T=1	p
Stężenie kreatyniny w surowicy krwi	0,90 [0,74-0,94]	1,27 [0,99-1,56]	1,75 [1,58-2,08]	<0,001*
eGFR ml/min/1,73m ²	103 [67-135]	67 [51,5-75]	36 [27-54]	<0,001*
Liczba pacjentów z eGFR<60 ml/min/1,73m ²	0	10 37,0%	8 80,0%	<0,001
UPCR	1,9 [0,7-4,1]	1,0 [0,7-1,6]	1,1 [0,5-2,2]	0,327
Liczba pacjentów bez białkomoczu / z białkomoczem subnerczycowym / nerczycowym	1 / 6 / 4 9,1 / 54,5 / 36,4%	2 / 23 / 2 7,4 / 85,2 / 7,4%	0 / 9 / 1 0 / 90,0 / 10,0%	0,158

* w analizie post-hoc wykazano istotne statystycznie różnice pomiędzy wszystkimi trzema grupami



Rycina 3. Funkcja filtracyjna nerek w zależności od stopnia zaawansowania zmian o charakterze nieodwracalnym w badaniu histopatologicznym bioptatów nerek.

5.4 Charakterystyka kliniczna pacjentów w okresie włączenia do badania

W Tabeli 4 przedstawiono wyniki badań laboratoryjnych, uzyskane w trakcie hospitalizacji, podczas której pacjenci zostali włączeni do badania.

Upośledzenie funkcji filtracyjnej nerek ($eGFR < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$) stwierdzono u 20 (41,7%) pacjentów. Białkomocz obserwowano u 38 (79,1%) pacjentów, w tym u 5 osób (10,4%) zespół nerczycowy. Aktywny osad moczu obserwowano u 30 pacjentów (62,5%).

W przypadku 14 pacjentów (29,2%) stwierdzono nieznaczłą neutrocytozę (średnio $8,344 \pm 2,749$, mediana 7,40 [6,26-9,64] tys/ μl). Była ona istotnie statystycznie częściej stwierdzana u pacjentów przyjmujących glikokortykosteroidy ($p=0,024$). Liczba monocytów była nieznacznie podwyższona u 7 pacjentów (14,6%).

Tabela 4. Parametry laboratoryjne grupy badanej w chwili włączenia do badania.

Charakterystyka pacjentów	Średnia ± odchylenie standardowe	Mediana [IQR]	Zakres referencyjny
Hb (g/dl)	13,38 ± 1,74	13,2 [12,4-14,6]	K: 12,0-16,0 M: 14,0-18,0
Leukocyty (tys/ μ l)	7,692 ± 2,586	7,43 [5,99-8,58]	4,00-10,00
Neutrofile (tys/ μ l)	4,826 ± 2,366	4,31 [3,50-5,78]	2,50-6,00
Limfocyty (tys/ μ l)	2,029 ± 0,745	1,92 [1,51-2,37]	1,50-3,50
Monocyty (tys/ μ l)	0,598 ± 0,222	0,57 [0,46-0,68]	0,08-1,20
Białko C reaktywne (mg/l)	2,621 ± 4,622	1,14 [0,71-2,73]	0,0-5,0
Białko całkowite (g/dl)	6,15 ± 0,78	6,3 [5,7-6,7]	6,60-8,30
Albuminy (g/dl)	3,62 ± 0,53	3,8 [3,3-4,0]	3,50-5,20
Białkomocz dobowy (g/d)	1,38 ± 1,64	0,8, 0,3-2,0]	<0,3
Kreatynina (mg/dl)	1,690 ± 1,170	1,33 [0,92-2,12]	K: 0,70-1,10 M: 0,80-1,30
GFR (ml/min/1,73m ²)	59,9 ± 2,9	62 [30-80]	>60

5.5 Ocena ekspresji i/lub stężenia badanych biomarkerów u pacjentów z nefropatią IgA oraz w grupie kontrolnej

5.5.1 Ekspresja receptora CD89 na neutrofilach oraz monocytach

W Tabeli 5 przedstawiono wyniki oceny ekspresji receptora CD89 na monocytach oraz neutrofilach krwi obwodowej w grupie badanej oraz kontrolnej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji CD89 pomiędzy grupami.

Tabela 5. Wyniki oznaczenia ekspresji receptora CD89 na neutrofilach oraz monocytach.

Populacja komórek	Grupa badana	Grupa kontrolna	Wartość p
	Średnia liczba cząsteczek CD89 / komórkę	Średnia liczba cząsteczek CD89 / komórkę	
Monocyty	4388 ± 1663 4470 [3690-5280]	4735 ± 1249 4600 [4080-4990]	0,411
Neutrofile	3395 ± 1630 3320 [2460-4390]	3566 ± 1275 3170 [2780-3750]	0,607

Dane liczbowe przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe oraz mediana [IQR]

5.5.2 Stężenia niedogalaktozylowanej IgA1 (Gd-IgA1) oraz rozpuszczalnego CD89 (sCD89) w surowicy krwi

W Tabeli 6 przedstawiono wyniki analizy stężenia Gd-IgA1 oraz sCD89 w surowicy krwi obwodowej w grupie badanej oraz kontrolnej. W grupie badanej obserwowano istotnie wyższe stężenie sCD89 w surowicy krwi w porównaniu z grupą kontrolną ($p < 0.001$). Nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu Gd-IgA1 pomiędzy grupą badaną a kontrolną.

Tabela 6. Wyniki oznaczenia stężenia Gd-IgA1 oraz sCD89 w surowicy krwi.

Biomarker	Grupa badana	Grupa kontrolna	Wartość p
Gd-IgA1 (µg/ml)	6,690 ± 4,408 5,53 [3,62-8,85]	6,063 ± 5,178 3,53 [2,56-9,29]	0,287
sCD89 (ng/ml)	70,66 ± 21,46 69,0 [50,7-84,1]	49,53 ± 17,59 43,7 [40,4-47,7]	<0,001

Dane liczbowe przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe oraz mediana [IQR]

5.5.3 Stężenie receptora CD89, receptora transferyny 1 (CD71) oraz transglutaminazy 2 (TG2) w moczu

W Tabeli 7 przedstawiono wyniki analizy stężenia CD89, CD71 oraz TG2 w moczu w grupie badanej oraz kontrolnej. W próbkach moczu pobranych w grupie badanej obserwowano istotnie statystycznie wyższe stężenie CD89 ($p < 0.001$) oraz CD71 ($p = 0.014$) w porównaniu z grupą kontrolną. Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniu TG2 pomiędzy grupą badaną a kontrolną.

Tabela 7. Wyniki oznaczenia stężenia CD89, CD71 oraz TG2 w moczu.

Biomarker	Grupa badana	Grupa kontrolna	Wartość p
CD89 (ng/mg kreatyniny)	24,82 ± 25,59 18,4 [9,1-30,2]	9,09 ± 8,63 6,0 [3,2-12,2]	<0,001
CD71 (ng/mg kreatyniny)	3,647 ± 5,632 1,73 [0,81-3,37]	1,748 ± 2,696 0,80 [0,52-1,40]	0,014
TG2 (ng/mg kreatyniny)	1,224 ± 0,972 0,93 [0,59-1,50]	1,052 ± 1,158 0,76 [0,49-0,91]	0,169

Dane liczbowe przedstawiono jako średnia ± odchylenie standardowe oraz mediana [IQR]

5.5.4 Korelacje pomiędzy badanymi biomarkerami

Przeanalizowano zależności pomiędzy poszczególnymi biomarkerami w grupie badanej (Tabela 8) oraz w grupie kontrolnej (Tabela 9).

W grupie badanej stwierdzono silną dodatnią korelację pomiędzy natężeniem ekspresji CD89 na neutrofilach i monocytach ($r = 0,808$, $p < 0,001$). Ponadto zaobserwowano dodatnie korelacje pomiędzy trzema biomarkerami ocenianymi w moczu, tj. CD89, CD71 oraz TG2.

Podobnie w grupie kontrolnej wykazano dodatnią, ale nieco słabszą korelację pomiędzy nasileniem ekspresji CD89 na neutrofilach i monocytach ($r = 0,612$, $p = 0,004$). Ponadto wykazano zależność pomiędzy stężeniami TG2 a CD89 ($r = 0,678$, $p < 0,001$) i CD70 ($r = 0,597$, $p < 0,001$) w moczu. Odnotowano również istotny statystycznie związek pomiędzy stężeniami sCD89 a Gd-IgA1 w surowicy krwi ($r = 0,483$, $p = 0,031$).

Tabela 8. Macierz korelacji pomiędzy biomarkerami w grupie badanej.

Ekspresja CD89 (monocyty)	Ekspresja CD89 (neutrofile)	Gd-IgA1 (µg/ml)	sCD89 (ng/ml)	CD89 (ng/mg kreatyniny)	CD71 (ng/mg kreatyniny)	TG2 (ng/mg kreatyniny)	
	r=0,808 p<0,001	r=-0,076 p=0,606	r=-0,132 p=0,372	r=0,159 p=0,280	r=-0,007 p=0,964	r=-0,103 p=0,485	Ekspresja CD89 (monocyty)
		r=-0,031 p=0,834	r=-0,198 p=0,177	r=0,066 p=0,658	r=-0,123 p=0,406	r=-0,229 p=0,118	Ekspresja CD89 (neutrofile)
			r=0,024 p=0,872	r=-0,066 p=0,655	r=0,089 p=0,547	r=0,213 p=0,146	Gd-IgA1 (µg/ml)
				r=0,051 p=0,729	r=-0,010 p=0,945	r=0,011 p=0,940	sCD89 (ng/ml)
					r=0,424 p=0,027	r=0,678 p<0,001	CD89 (ng/mg kreatyniny)
						r=0,597 p<0,001	CD71 (ng/mg kreatyniny)
							TG2 (ng/mg kreatyniny)

Tabela 9. Macierz korelacji pomiędzy biomarkerami w grupie kontrolnej.

Ekspresja CD89 (monocyty)	Ekspresja CD89 (neutrofile)	Gd-IgA1 (µg/ml)	sCD89 (ng/ml)	CD89 (ng/mg kreatyniny)	CD71 (ng/mg kreatyniny)	TG2 (ng/mg kreatyniny)	
	r=0,612 p=0,004	r=-0,147 p=0,535	r=-0,286 p=0,222	r=-0,126 p=0,596	r=-0,223 p=0,346	r=-0,326 p=0,160	Ekspresja CD89 (monocyty)
		r=0,056 p=0,816	r=-0,247 p=0,295	r=-0,029 p=0,905	r=-0,335 p=0,148	r=-0,349 p=0,132	Ekspresja CD89 (neutrofile)
			r=0,483 p=0,031	r=0,379 p=0,099	r=-0,099 p=0,677	r=0,006 p=0,980	Gd-IgA1 (µg/ml)
				r=-0,101 p=0,673	r=-0,054 p=0,821	r=0,119 p=0,618	sCD89 (ng/ml)
					r=0,214 p=0,366	r=0,528 p=0,017	CD89 (ng/mg kreatyniny)
						r=0,750 p<0,001	CD71 (ng/mg kreatyniny)
							TG2 (ng/mg kreatyniny)

5.6 Ocena badanych biomarkerów w zależności od płci, wieku i okresu czasu od biopsji do badania

Przeanalizowano zależności pomiędzy badanymi biomarkerami a płcią (Tabela 10), wiekiem pacjenta oraz okresem czasu od wykonania biopsji do przeprowadzenia badania (Tabela 11). U kobiet włączonych do badania stwierdzono wyższą ekspresję CD89 na neutrofilach ($p=0,006$) oraz wyższe stężenie sCD89 w surowicy krwi ($p=0,034$) w porównaniu do mężczyzn. Zaobserwowano słabą ujemną korelację ekspresji CD89 na neutrofilach krwi obwodowej z wiekiem pacjentów ($r=-0,345$, $p=0,016$). W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności.

Tabela 10. Zależność pomiędzy badanymi markerami a płcią pacjentów.

Biomarker	Kobiety	Mężczyźni	Wartość p
Ekspresja CD89 na monocytach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	3762 ± 1514 3890 [3440-4510]	4798 ± 1652 4520 [3870-5620]	0,056
Ekspresja CD89 na neutrofilach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	2622 ± 1337 2540 [1970-3490]	3901 ± 1625 3546 [2920-4700]	0,006
Stężenie Gd-IgA1 w surowicy krwi (µg/ml)	7,366 ± 4,734 5,92 [3,92-11,35]	6,240 ± 4,206 5,33 [3,30-8,61]	0,393
Stężenie sCD89 w surowicy krwi (ng/ml)	63,65 ± 21,12 61,1 [47,6-78,2]	75,25 ± 20,75 80,5 [58,5-87,7]	0,034
Stężenie CD89 w moczu (ng/mg kreatyniny)	21,02 ± 12,74 22,2 [11,5-30,7]	27,31 ± 31,28 15,3 [8,5-30,1]	0,823
Stężenie CD71 w moczu (ng/mg kreatyniny)	2,231 ± 1,715 1,75 [0,94-2,90]	4,447 ± 7,061 1,23 [0,64-4,72]	0,467
Stężenie TG2 w moczu (ng/mg kreatyniny)	1,547 ± 1,177 1,22 [0,71-1,75]	1,013 ± 0,761 0,81 [0,56-1,13]	0,059

Tabela 11. Zależność pomiędzy badanymi markerami a wiekiem pacjentów oraz okresem czasu od wykonania biopsji do przeprowadzenia badania.

Biomarker	wiek pacjenta	czas od biopsji do badania
Ekspresja CD89 na monocytach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	r=-0,162 p=0,272	r=-0,202 p=0,168
Ekspresja CD89 na neutrofilach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	r=-0,345 p=0,016	r=-0,084 p=0,572
Stężenie Gd-IgA1 w surowicy krwi (µg/ml)	r=0,002 p=0,990	r=0,011 p=0,942
Stężenie sCD89 w surowicy krwi (ng/ml)	r=0,214 p=0,144	r=0,080 p=0,590
Stężenie CD89 w moczu (ng/mg kreatyniny)	r=0,216 p=0,140	r=0,146 p=0,321
Stężenie CD71 w moczu (ng/mg kreatyniny)	r=0,131 p=0,375	r=0,164 p=0,266
Stężenie TG2 w moczu (ng/mg kreatyniny)	r=0,284 p=0,051	r=0,124 p=0,400

5.7 Ocena wpływu glikokortykosteroidoterapii na badane biomarkery

22 pacjentów (45,8%) otrzymywało w chwili włączenia do badania leczenie glikokortykosteroidami. Przeprowadzono analizę wpływu terapii immunosupresyjnej na ekspresję CD89 i/lub stężenia badanych biomarkerów (Tabela 12). 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 stwierdzono wpływu glikokortykosteroidoterapii na pozostałe biomarkery.

Tabela 12. Wpływ glikokortykosteroidoterapii (GKS) na badane biomarkery.

Biomarker	GKS (+)	GKS (-)	Wartość p
Ekspresja CD89 na monocytach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	4463 ± 1863 4370 [3710-5230]	4324 ± 1509 4490 [3640-5330]	0,918
Ekspresja CD89 na neutrofilach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	3381 ± 1695 3080 [2540-4660]	3406 ± 1607 3420 [2380-4340]	0,951
Stężenie Gd-IgA1 w surowicy krwi (µg/ml)	5,431 ± 4,326 4,08 [2,22-7,36]	7,748 ± 4,273 6,37 [4,41-11,20]	0,028
Stężenie sCD89 w surowicy krwi (ng/ml)	75,40 ± 23,20 79,9 [54,6-100,3]	66,65 ± 19,41 67,0 [48,6-83,0]	0,207
Stężenie CD89 w moczu (ng/mg kreatyniny)	34,29 ± 33,52 23,8 [9,7-35,6]	16,80 ± 11,89 14,2 [7,4-23,0]	0,035
Stężenie CD71 w moczu (ng/mg kreatyniny)	4,651 ± 7,123 2,05 [0,75-4,37]	2,654 ± 3,963 1,39 [0,68-2,58]	0,321
Stężenie TG2 w moczu (ng/mg kreatyniny)	1,444 ± 1,221 1,04 [0,51-1,78]	1,038 ± 0,667 0,88 [0,61-1,35]	0,456

5.8 Ocena badanych biomarkerów w zależności od wskaźników aktywności choroby

U pacjentów z nefropatią IgA przeanalizowano korelacje pomiędzy ekspresją receptora CD89 na monocytach i neutrofilach oraz stężeniem biomarkerów w surowicy krwi i moczu a stężeniem albumin, białka całkowitego, nasileniem białkomoczu oraz obecnością aktywnego osadu moczu. Wyniki zebrano w Tabelach 13 i 14.

Tabela 13. Macierz korelacji pomiędzy badanymi markerami a wykładnikami aktywności choroby.

	Stężenie albumin w surowicy krwi (mg/dl)	Stężenie białka całkowitego w surowicy krwi (mg/dl)	Białkomocz dobowy (g/d)
Ekspresja CD89 na monocytach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	r=-0,044 p=0,766	r=-0,152 p=0,315	r=0,031 p=0,833
Ekspresja CD89 na neutrofilach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	r=0,011 p=0,940	r=-0,103 p=0,494	r=-0,055 p=0,708
Stężenie Gd-IgA1 w surowicy krwi (µg/ml)	r=-0,111 p=0,452	r=0,041 p=0,786	r=0,171 p=0,246
Stężenie sCD89 w surowicy krwi (ng/ml)	r=-0,199 p=0,176	r=-0,378 p=0,010	r=0,048 p=0,748
Stężenie CD89 w moczu (ng/mg kreatyniny)	r=-0,276 p=0,057	r=-0,296 p=0,046	r=0,349 p=0,015
Stężenie CD71 w moczu (ng/mg kreatyniny)	r=-0,437 p=0,002	r=-0,353 p=0,016	r=0,611 p<0,001
Stężenie TG2 w moczu (ng/mg kreatyniny)	r=-0,346 p=0,016	r=-0,143 p=0,342	r=0,454 p=0,001

W grupie badanej 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. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie korelacji pomiędzy stężeniem albumin i pozostałymi analizowanymi biomarkerów.

Równocześnie obserwowano 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. Nie wykazano istotnych statystycznie korelacji stężenia białka całkowitego i pozostałych analizowanych biomarkerów.

Ponadto stwierdzono istotne statystycznie dodatnie korelacje pomiędzy nasileniem białkomoczu a stężeniami CD89 ($r=0,349$, $p=0,015$), CD71 ($r=0,611$, $p<0,001$) oraz TG2 ($r=0,454$, $p=0,001$) w moczu. Nie stwierdzono istotnych statystycznie zależności pomiędzy nasileniem białkomoczu a stężeniami pozostałych analizowanych biomarkerów.

Tabela 14. Zależność badanych biomarkerów od obecności erytrocyturii.

	Erytrocyturia (+) n=30	Erytrocyturia (-) n=18	Wartość p
Ekspresja CD89 na monocytach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	4395 ± 1407 4500 [3830-5120]	4376±2067 3910 [3640-5530]	0,441
Ekspresja CD89 na neutrofilach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	3606 ± 1475 3492 [2807-4432]	3043 ± 1850 2610 [2020-3950]	0,079
Stężenie Gd-IgA1 w surowicy krwi (µg/ml)	7,861 ± 4,993 6,97 [4,09-11,20]	4,727 ± 2,167 4,30 [2,91-6,03]	0,037
Stężenie sCD89 w surowicy krwi (ng/ml)	71,16 ± 22,84 69,9 [51,7-87,0]	69,83 ± 19,55 68,0 [49,0-82,8]	0,666
Stężenie CD89 w moczu (ng/mg kreatyniny)	23,28 ± 22,84 14,8 [8,6-26,1]	27,38 ± 30,15 23,7 [9,5-31,5]	0,441
Stężenie CD71 w moczu (ng/mg kreatyniny)	4,374 ± 6,504 2,05 [1,16-3,90]	2,434 ± 3,611 1,02 [0,69-2,94]	0,065
Stężenie TG2 w moczu (ng/mg kreatyniny)	1,169 ± 0,842 0,93 [0,57-1,37]	1,316 ± 1,179 0,93 [0,62-1,68]	0,874

Dane przedstawiono w tabeli jako średnia ± odchylenie standardowe oraz mediana [IQR]

U pacjentów z nefropatią IgA, u których występowała erytrocyturia, obserwowano istotnie statystycznie wyższe stężenie Gd-IgA1 w surowicy krwi niż u pacjentów bez obecnej erytrocyturii. Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w zakresie stężeń pozostałych badanych biomarkerów w zależności od obecności erytrocyturii.

5.9 Ocena zależności pomiędzy badanymi biomarkerami a funkcją filtracyjną nerek

W Tabeli 15 przedstawiono wyniki analizy korelacji pomiędzy ekspresją receptora CD89 na monocytach i neutrofilach oraz stężeniami badanych biomarkerów w surowicy krwi i moczu a wielkością przesączania kłębuszkowego (eGFR) obserwowaną w dniu badania.

Tabela 15. Korelacje pomiędzy badanymi biomarkerami a wielkością przesączania kłębuszkowego (eGFR).

Biomarker	eGFR (ml/min/1,73m ²)
Ekspresja CD89 na monocytach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	r=0,124, p=0,400
Ekspresja CD89 na neutrofilach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	r=0,156, p=0,289
Stężenie Gd-IgA1 w surowicy krwi (µg/ml)	r=-0,288, p=0,047
Stężenie sCD89 w surowicy krwi (ng/ml)	r=-0,117, p=0,426
Stężenie CD89 w moczu (ng/mg kreatyniny)	r=-0,015, p=0,917
Stężenie CD71 w moczu (ng/mg kreatyniny)	r=-0,289, p=0,047
Stężenie TG2 w moczu (ng/mg kreatyniny)	r=-0,283, p=0,051

W grupie badanej obserwowano istotne statystycznie słabe ujemne korelacje pomiędzy wielkością przesączania kłębuszkowego (eGFR) a stężeniami Gd-IgA1 w surowicy krwi (r=-0,288, p=0,047) oraz CD71 (r=-0,289, p=0,047) w moczu. Nie stwierdzono innych istotnych korelacji pomiędzy wielkością przesączania kłębuszkowego a analizowanymi biomarkerami.

5.10 Zaawansowanie zmian histopatologicznych a biomarkery

Nie stwierdzono zależności pomiędzy stopniem zaawansowania zmian nieodwracalnych opisanych w badaniu histopatologicznym biopłatów nerek a analizowanymi biomarkerami. Wyniki analizy przedstawiono w Tabeli 16.

Tabela 16. Zależność badanych biomarkerów od zmian nieodwracalnych stwierdzonych w badaniu histopatologicznym biopłatów nerek.

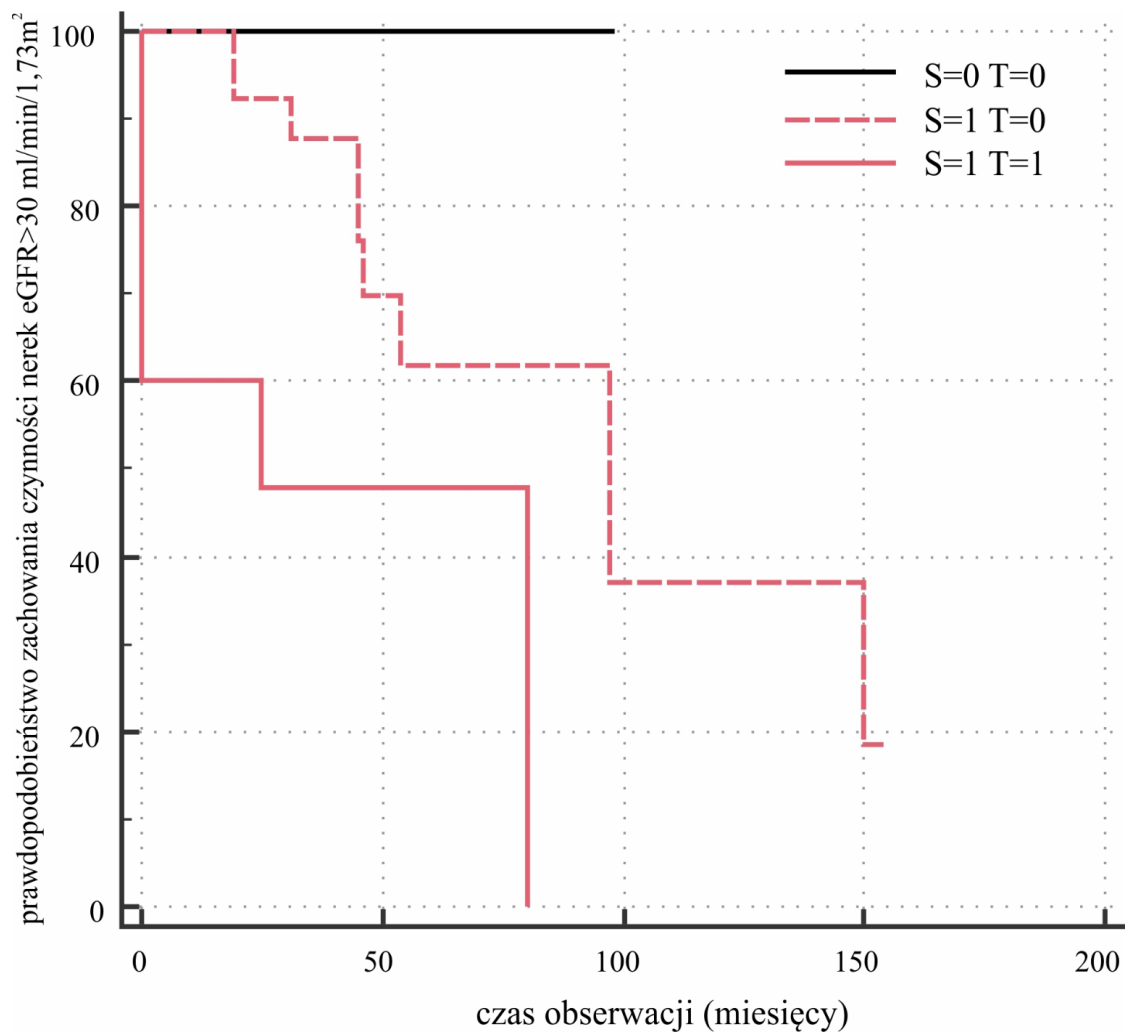
	S=0 T=0	S=1 T=0	S=1 T=1	Wartość p
Ekspresja CD89 na monocytach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	4311 ± 1523 4470 [3520-5680]	4243 ± 1940 4170 [3300-5060]	4864 ± 821 4690 [4360-5530]	0,283
Ekspresja CD89 na neutrofilach (średnia liczba cz. CD89 / komórkę)	3322 ± 1589 3550 [2060-4670]	3323 ± 1682 3090 [2430-3940]	3889 ± 1671 3170 [2610-3950]	0,896
Stężenie Gd-IgA1 w surowicy krwi (µg/ml)	6,044 ± 4,184 4,60 [2,53-8,77]	7,129 ± 5,048 6,03 [2,90-10,24]	6,195 ± 2,657 5,81 [4,23-6,71]	0,869
Stężenie sCD89 w surowicy krwi (ng/ml)	67,26 ± 23,16 61,1 [47,5-82,9]	74,33 ± 21,07 70,4 [57,3-89,1]	64,48 ± 20,69 59,3 [48,6-80,1]	0,313
Stężenie CD89 w moczu (ng/mg kreatyniny)	16,75 ± 9,13 11,9 [9,6-23,9]	24,17 ± 23,94 16,6 [6,4-33,5]	35,44 ± 38,26 24,8 [14,9-31,5]	0,326
Stężenie CD71 w moczu (ng/mg kreatyniny)	1,907 ± 1,458 1,84 [0,70-3,09]	4,162 ± 6,968 1,23 [0,66-2,71]	3,800 ± 4,489 2,33 [0,75-4,58]	0,782
Stężenie TG2 w moczu (ng/mg kreatyniny)	1,283 ± 1,506 0,56 [0,50-1,51]	1,169 ± 0,840 0,93 [0,62-1,36]	1,308 ± 0,598 1,22 [0,93-1,68]	0,197

Dane przedstawiono w tabeli jako średnia ± odchylenie standardowe oraz mediana [IQR]

5.11 Ocena przebiegu klinicznego choroby

Oceniono przebieg kliniczny nefropatii IgA w okresie od wykonania biopsji nerki do utraty czynności nerek (5 pacjentów, 10,4%) lub końca obserwacji w badaniu (od 2 do 154 miesięcy, mediana 44,5 [26-61] miesięcy).

Przeanalizowano częstość występowania pogorszenia funkcji nerek do wartości poniżej 30 ml/min/1,73m² u pacjentów z różnym stopniem zaawansowania zmian nieodwracalnych w badaniu histopatologicznym i zaobserwowano niekorzystny wpływ obecności tych zmian (p<0,001, Rycina 4). Dane przedstawiono w tabeli 17.



Rycina 4. Porównanie częstości ubytku funkcji filtracyjnej nerek poniżej 30 ml/min/1,73m² u pacjentów różnym stopniem zaawansowania zmian nieodwracalnych w badaniu histopatologicznym (p<0,001).

Tabela 17. Zależność czasu zachowania czynności nerek w zależności od stopnia zaawansowania zmian nieodwracalnych w badaniu histopatologicznym.

	S=0 T=0	S=1 T=0	S=1 T=1
Całkowity czas obserwacji od biopsji nerki (miesiące)	55 [23-59]	46 [32-75]	23 [7-41]
Liczba osób z progresją przewlekłej choroby nerek do eGFR<30 ml/min/1,73m ²	0	10 (37,0%)	6 (60,0%)

U 32 pacjentów (66,7%) w całym okresie obserwacji utrzymywał się białkomocz $>0,3$ g/dobę. U 13 (27,1%) chorych uzyskano remisję białkomoczu do wartości $<0,3$ g/dobę. U trzech pacjentów (6,2%) nie stwierdzano białkomoczu w całym okresie obserwacji. Nie wykazano związku pomiędzy nasileniem białkomoczu a stopniem zaawansowania zmian nieodwracalnych w badaniu histopatologicznym ($p=0,269$).

Oceniono również przebieg kliniczny nefropatii IgA od momentu oceny biomarkerów przez okres od 0 do 60 miesięcy (mediana 21,5 [13-31] miesięcy). W powyższym okresie u większości chorych stopień zaawansowania przewlekłej choroby nerek nie uległ zmianie. Jedynie w przypadku 2 osób (4,2%), u których w chwili włączenia stwierdzano prawidłową lub umiarkowanie obniżoną funkcję filtracyjną, zaobserwowano pogorszenia funkcji filtracyjnej poniżej do <30 ml/min/1,73m², co spowodowało brak możliwości oceny wartości predykcyjnej badanych biomarkerów na progresję choroby.

6 Omówienie i dyskusja

Nefropatia IgA to najczęściej występujące zapalenie kłębuszków nerkowych w populacji [98]. Rozpoznawana jest na podstawie badania histopatologicznego wycinka nerki pobranego w trakcie biopsji (skala MEST-C) [55]. Pomimo łagodnego przebiegu schyłkowa niewydolność nerek jest opisywana po 20 latach u 30-40% chorych [99].

Rozwój procesu zapalnego w kłębuszku stanowiący podstawę patogenetyczną, związany jest z upośledzoną galaktozylacją regionu zawiasowego IgA1 w surowicy krwi pacjentów, następnie tworzeniem się autoprzeciwciał, a w konsekwencji kompleksów immunologicznych. Osadzanie się kompleksów w mezangium kłębuszków nerkowych prowadzi do aktywacji układu dopełniacza i produkcji prozapalnych cytokin, co skutkuje rozplemem komórek mezangium i przybytkiem macierzy. Toczący się proces zapalny doprowadza w konsekwencji do twardnienia kłębuszków nerkowych i włóknienia tkanki śródmiąższowej [22].

Aktualnie brakuje zwalidowanych biomarkerów klinicznych, umożliwiających rozpoznanie choroby i jej nasilenie [83]. W niniejszej pracy podjęto próbę oceny potencjalnych biomarkerów oraz określenia zależności pomiędzy ich ekspresją i/lub stężeniem a aktywnością choroby, funkcją filtracyjną nerek, zmianami histopatologicznymi wycinka pobranego w trakcie biopsji nerki oraz progresją przewlekłej choroby nerek.

6.1 Parametry kliniczne i obraz histopatologiczny

W przedstawionym badaniu przeanalizowano obrazy histopatologiczne bioptatów nerek pacjentów z nefropatią IgA wg skali MEST-C [55]. W znakomitej większości bioptatów stwierdzono zwiększenie komórkowości mezangium (89,6%), a tylko w nielicznych (18,8%) zwiększenie komórkowości wewnątrzwołniczkowej. Segmentalne twardnienie obserwowano u 77,1% chorych, natomiast włóknienie zrębu i zanik cewek wśród 20,8% chorych.

Berg i wsp. [100] w swojej pracy zaobserwowali, że pacjenci pediatryczni z niewielkim/umiarkowanym zwiększeniem objętości oraz proliferacją komórek mezangium mieli niższy współczynnik filtracji kłębuszkowej niż pacjenci bez zmian mezangialnych. Z kolei Widstam-Attorp i wsp. [101] nie stwierdzili zależności pomiędzy zmianami aktywnymi w badaniu histopatologicznym bioptatów a funkcją filtracyjną nerek oraz białkomoczem. W naszej pracy, w związku z różnicami w okresie czasu, który upłynął od biopsji nerek do

włączenia chorych do badania, nie analizowano cech aktywnych tj. rozplemu mezangium oraz zwiększenia komórkowości wewnątrzwołniczkowej. Ocenie poddano natomiast cechy nieodwracalne: obecność segmentalnego twardnienia kłębuszków, a także włóknienia zrębu oraz zaniku cewek, i ich związek z aktywnością choroby.

W przedstawionym badaniu analizie poddane zostały dane kliniczne pacjentów z okresu okołobiopsyjnego. Średnie stężenie kreatyniny w surowicy krwi u pacjentów wynosiło 1,34 mg/dl, co odpowiadało eGFR średnio 67,8 ml/min/1,73m². Pacjenci z upośledzoną funkcją filtracyjną nerek w okresie wykonywania biopsji nerki (definiowaną jako eGFR <60 ml/min/1,73m²) stanowili 37,5% chorych. U większości (93,8%) pacjentów w okresie okołobiopsyjnym stwierdzono białkomocz, u 79,2% był to białkomocz subnerczycowy, natomiast u 14,6% nerczycowy.

W przeprowadzonym badaniu czynność nerek w czasie biopsji w sposób istotny wiązała się z obecnością segmentalnego twardnienia kłębuszków oraz włóknienia zrębu i zaniku cewek w biopatach nerek. Przedstawione obserwacje są zgodne z danymi dostępnymi w literaturze. Berg i wsp. [100] wykazali, że pacjenci z segmentalnym twardnieniem kłębuszków oraz włóknieniem zrębu i zanikiem cewek mieli istotnie statystycznie niższy eGFR w porównaniu z pacjentami bez obecności tych cech w badaniu histopatologicznym. Podobnie Widstam-Attorps i wsp. [101] stwierdzili, że niższy GFR i większy białkomocz obserwowany był u pacjentów z bardziej zaawansowanymi wstecznymi zmianami morfologicznymi. Segmentalne twardnienie kłębuszków korelowało z funkcją filtracyjną nerek oraz białkomoczem, podczas gdy twardnienie globalne jedynie z GFR.

6.2 Czynniki rokownicze oceniane w biopsji nerki

W pracy przeanalizowano także częstość wystąpienia pogorszenia funkcji filtracyjnej nerek (do wartości poniżej 30 ml/min/1,73m²) w czasie kilkuletniej obserwacji u pacjentów z nefropatią IgA z różnym stopniem zaawansowania zmian nieodwracalnych w badaniu histopatologicznym i zaobserwowano niekorzystny wpływ obecności tych zmian. W stosowanej powszechnie klasyfikacji oksfordzkiej (skala MEST-C) [55] obecność segmentalnego twardnienia kłębuszków wiązana jest z szybszą utratą funkcji nerek. Podobnie włóknienie zrębu i zanik cewek, stwierdzane w badaniu histopatologicznym predysponują w kierunku krótszego przeżycia nerek. Alamartine E i wsp. [102] w swojej pracy udowodnili, że obecność powyższych cech miała istotny statystycznie związek z progresją oraz gorszym

rokowaniem przewlekłej choroby nerek. Podobnie Coppo i wsp. [103] obserwowali, że twardnienie kłębuszków nerkowych oraz włóknienie zrębu i zanik cewek są silnymi niezależnymi predyktorami progresji przewlekłej choroby nerek w analizie wieloczynnikowej.

W literaturze dostępne są również prace oceniające przebieg kliniczny choroby w zależności od obecności zmian aktywnych w biopsji nerki. D'Amico i wsp. [104] w swoim badaniu wykazali, że progresja przewlekłej choroby nerek była szybsza u pacjentów z rozproszoną i globalną proliferacją mezangium. Odmienne wyniki zaprezentowali Coppo i wsp. [103] oraz Alamartine E i wsp. [102] wykazując, że proliferacja mezangium nie jest istotnie związana z niekorzystnym rokowaniem. Podobne obserwacje w swojej pracy opublikowali Kaihan A i wsp. [105], opisując, że cechy E, S i T były istotnie związane z niekorzystnym rokowaniem, podczas gdy cecha M nie była związana z pogorszeniem czynności nerek. W naszej pracy nie analizowano zależności pomiędzy zmianami aktywnymi a przebiegiem klinicznym choroby, z uwagi na różny czas, który upłynął od wykonania biopsji do włączenia pacjentów do badania.

6.3 Ekspresja receptora CD89 na neutrofilach i monocytach

Jednym z biomarkerów aktywności choroby jest ekspresja receptora CD89, który może występować zarówno na komórkach krwi obwodowej, m.in. neutrofilach i monocytach, jak również w formie rozpuszczonej w osoczu. Wiąże się on z Gd-IgA1, powodując uwalnianie rozpuszczalnego sCD89, tworzenie się kompleksów sCD89-Gd-IgA1, a następnie ich odkładanie się w mezangium i stymulację reakcji zapalnej [24]. W badaniu oceniono ekspresję receptora CD89 na neutrofilach oraz monocytach krwi obwodowej. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w poziomie ekspresji CD89 na neutrofilach oraz monocytach pomiędzy grupą badaną a grupą kontrolną. W dostępnej literaturze dostępne są dwie publikacje oceniające ekspresję CD89 na komórkach [26,106]. W obu pracach, inaczej niż w naszej pracy, wykazano zmniejszoną ekspresję CD89 na monocytach krwi a także na neutrofilach. Dodatkowo zaobserwowano, że zmniejszona ekspresja CD89 na monocytach korelowała z bardziej zaawansowanymi zmianami histopatologicznymi w bioptatach nerek i wyjściową czynnością nerek, co według autorów pozwalało na identyfikację pacjentów o gorszym rokowaniu [26]. Różnice pomiędzy uzyskanymi wynikami a cytowanymi pracami mogą wynikać z faktu, że do naszego badania zakwalifikowano nie tylko pacjentów z chorobą rozpoznaną *de novo* (tak jak w porównywanych pracach), ale także chorych w trakcie leczenia immunosupresyjnego. Ponadto w pracy Esteve Cols i wsp. [26] ekspresja receptora CD89

została przeprowadzona na subpopulacji monocytów „nieklasycznych” CD14(low) CD16(+), których występowanie, zgodnie z dostępną literaturą, jest zwiększone u wszystkich badanych pacjentów z IgAN, mimo że całkowita liczba monocytów pozostaje niezmienną [107].

6.4 Stężenia biomarkerów w surowicy

Za potencjalny marker aktywności nefropatii IgA uważane jest również stężenie niedogalaktozylowanej IgA1. Do jej powstania prowadzi nieprawidłowy proces galaktozylacji w regionie zawiasowym (O-glikozylacji), któremu przypisuje się obecnie kluczową rolę w patogenezie IgAN [108]. W niniejszym badaniu nie wykazano istotnej statystycznie różnicy w stężeniu Gd-IgA1 pomiędzy grupą badaną a kontrolną. W dostępnych w literaturze pracach stężenia Gd-IgA1 były wyższe u pacjentów z nefropatią IgA w porównaniu z grupą kontrolną [16,17,109–111]. Różnice mogą wynikać z faktu, że w naszej pracy do grupy badanej kwalifikowano pacjentów na różnych etapach leczenia nefropatii IgA, zarówno z chorobą rozpoznaną *de novo*, jak i już w trakcie leczenia, które mogło stanowić przyczynę zmniejszenia stężenia Gd-IgA1 w surowicy.

W naszej pracy oceniono również stężenie rozpuszczalnego CD89 (sCD89) w surowicy, stwierdzając wyższe stężenie sCD89 u pacjentów z IgAN w porównaniu z grupą kontrolną. Uzyskane w prezentowanej analizie wyniki są zbliżone do opisywanych w publikacjach innych autorów. W jednej z prac analizowano grupę pacjentów pediatrycznych stwierdzając znacznie podwyższone stężenie sCD89 w surowicy w porównaniu z grupą kontrolną [111]. Haiting i wsp. [112] także obserwowali wyższe stężenie sCD89 związanych w kompleksach sCD89-IgA w surowicy chorych na nefropatię IgA, nie poddawanych wcześniej leczeniu immunosupresyjnym, w porównaniu z grupą kontrolną.

Vuong i wsp. [113] wykazali istotną statystycznie różnicę pomiędzy stężeniami kompleksów sCD89-IgA w surowicy chorych z progresją choroby w porównaniu z chorymi bez progresji. Pacjenci z IgAN, u których nie obserwowano progresji choroby, mieli stabilne, ale wysokie stężenie sCD89 w ciągu 5-15 lat obserwacji w przeciwieństwie do stabilnych, ale niskich stężeń sCD89 w grupie ze stwierdzaną progresją choroby. Berthelot i wsp. [114] ocenili stężenie sCD89-IgA u pacjentów po transplantacji nerki stwierdzając, że nawrót choroby w nerce przeszczepionej u tych chorych był związany z wyższymi stężeniami krążących kompleksów sCD89-IgA.

Z kolei Jhee i wsp. [115] nie wykazali związku pomiędzy stężeniem kompleksów sCD89-Gd-IgA1 a progresją przewlekłej choroby nerek w IgAN. W naszym badaniu odległe rokowanie dotyczące progresji przewlekłej choroby nerek nie zależało od stężenia sCD89, natomiast nie oceniano stężenia kompleksów sCD89 z rozróżnieniem na wolną cząsteczkę i związaną w kompleksach z GdIgA1.

6.5 Stężenia biomarkerów w moczu

Stężenie CD89 oceniono także w moczu. W grupie badanej stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenie CD89 w przeliczeniu na miligram wydalonej kreatyniny w porównaniu z grupą kontrolną. Dostępna jest tylko jedna praca oceniająca stężenie CD89 w moczu [27]. Moresco i wsp. [27] wykazali, że stężenie CD89 w moczu było istotnie niższe u pacjentów z aktywnym procesem chorobowym w porównaniu z pacjentami w całkowitej lub częściowej remisji. Grupa ta nie została jednak porównana do zdrowej grupy kontrolnej. Niższe stężenie receptora CD89 w moczu w grupie z aktywną chorobą zostało w cytowanej pracy uzasadnione faktem, że aktywny proces zapalny powodował „zużycie” CD89 w nerkach. W naszej pracy stwierdzono wysokie stężenia sCD89 w surowicy u pacjentów z nefropatią IgA. Ten fakt oraz istnienie aktywnego procesu zapalnego w nerce może naszym zdaniem być przyczyną przedostawania się dużych ilości CD89 do moczu.

Transferyna 1 (CD71, TfR) jest receptorem zlokalizowanym na komórkach mezangium, który wiąże kompleksy sCD89-Gd-IgA1, aktywując enzym transglutaminazę 2 (TG2) [116]. W naszym badaniu obserwowano wyższe stężenie CD71 u pacjentów z nefropatią IgA w porównaniu z grupą kontrolną. Obserwacje dotyczące receptora CD71 są zgodne z danymi dostępnymi w literaturze. Delanghe i wsp. [117] również wykazali, że stężenie CD71 w moczu było wyższe u pacjentów z nefropatią IgA niż u osób zdrowych. Udowodnili także, że stężenia CD71 były znacznie wyższe u pacjentów z aktywną IgAN w porównaniu z pacjentami, którzy uzyskali częściową lub całkowitą remisję oraz chorymi z innymi typami glomerulopatii.

Aktywacja enzymu transglutaminazy 2 (TG2) powoduje jego przemieszczenie do błony komórek mezangium, ich pobudzenie i produkcję cytokin zapalnych [31]. W naszym badaniu poddano analizie stężenie TG2 w moczu jako potencjalnego biomarkera aktywności choroby. Nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy w stężeniu TG2 pomiędzy grupą badaną a kontrolną. Do tej pory opublikowano tylko jedno badanie, w którym autorzy obserwowali

niższe stężenie TG2 u pacjentów z aktywnym procesem chorobowym w porównaniu z pacjentami w całkowitej lub częściowej remisji. Grupa ta nie została porównana do zdrowej grupy kontrolnej [27]. Różnice mogą wynikać ze stosunkowo nielicznej grupy badanej w naszej pracy oraz faktu prowadzenia leczenia immunosupresyjnego u niektórych chorych.

6.6 Zależność stężeń poszczególnych biomarkerów w moczu i surowicy

W przedstawionej pracy oceniono korelacje pomiędzy badanymi biomarkerami w grupach badanej oraz kontrolnej. Zaobserwowano silną dodatnią korelację pomiędzy natężeniem ekspresji CD89 na neutrofilach oraz na monocytach w grupie badanej, a także dodatnią, ale nieco słabszą w grupie kontrolnej. W literaturze nie ma dostępnych prac opisujących przedstawione zależności. Cambier i wsp. [111] przedstawili natomiast ujemną korelację pomiędzy ekspresją CD89 na monocytach a stężeniem sCD89 w surowicy. W naszej pracy nie zaobserwowano powyższej korelacji.

W naszym badaniu uwidoczniło się także istotne statystycznie korelacje pomiędzy trzema biomarkerami ocenianymi w moczu, tj. CD89, CD71 oraz TG2 w grupie badanej, a także w kontrolnej. W dostępnej literaturze podobne wyniki otrzymali Moresco i wsp. [27], stwierdzając jedynie istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy stężeniem CD89 oraz TG2 w moczu.

6.7 Wpływ terapii glikokortykosteroidami na ekspresję i/lub stężenia badanych biomarkerów

W przypadku 14 pacjentów (29,2%) w momencie włączenia do badania stwierdzono nieznacznie nasiloną neutrocytozę (średnio 8,3 tys/ μ l). Zaobserwowano, że w sposób istotny wiązała się ona z terapią glikokortykosteroidami. Przedstawione wyniki są zgodne z dostępną literaturą. Podobne spostrzeżenia w swoich pracach opisali Frenkel i wsp. [118,119].

W badaniu przeanalizowano wpływ glikokortykosteroidoterapii na ekspresję i/lub stężenie badanych biomarkerów. Zaobserwowano, że w grupie stosującej GKS stężenie Gd-IgA1 w surowicy krwi oraz stężenie CD89 w moczu były mniejsze w porównaniu z grupą, która nie otrzymała leczenia. Podobne wyniki u pacjentów po przeszczepieniu nerki otrzymali Kim i wsp. [120], obserwując istotne zmniejszenie stężenia Gd-IgA1 u pacjentów poddanych glikokortykosteroidoterapii. W literaturze nie są dostępne prace opisujące wpływ terapii GKS na stężenie CD89 w moczu.

6.8 Wpływ badanych biomarkerów na obraz kliniczny i przebieg IgAN

6.8.1 Wykładniki kliniczne aktywności choroby a ekspresja i/lub stężenia badanych biomarkerów

W naszym badaniu poddano ocenie ekspresję i/lub stężenie badanych biomarkerów w zależności od aktywności choroby.

W grupie badanej obserwowano istotne ujemne korelacje pomiędzy stężeniem albumin a stężeniami CD71 oraz TG2 w moczu. W badaniach dostępnych w literaturze nie oceniano korelacji pomiędzy stężeniem wyżej wymienionych biomarkerów a stężeniem albumin.

Równocześnie obserwowano istotne statystycznie ujemne korelacje pomiędzy stężeniem białka całkowitego a stężeniem sCD89 w surowicy krwi, a także stężeniami CD89 oraz CD71 w moczu. W dostępnej literaturze również te zależności nie były oceniane.

Ponadto stwierdzono istotne statystycznie dodatnie korelacje pomiędzy nasileniem białkomoczu a stężeniami CD89, CD71 oraz TG2 w moczu. W badaniach przeprowadzonych przez innych badaczy obserwowano istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy stężeniami CD89 i TG2 a nasileniem białkomoczu [27], jednakże w badaniu tym grupę kontrolną stanowili pacjenci w remisji choroby, a próbki moczu pobierane były w momencie postawienia rozpoznania – inaczej niż u nas – przed leczeniem. Obserwacje dotyczące stężenia CD71 i białkomoczu są zgodne z wynikami prac dostępnych w literaturze. Delanghe i wsp. [117] również obserwowali dodatnią korelację pomiędzy stężeniem CD71 w moczu a nasileniem białkomoczu.

W przeprowadzonym badaniu u pacjentów z nefropatią IgA, u których występowała erytrocyturia, obserwowano istotnie statystycznie wyższe stężenie Gd-IgA1 w surowicy krwi niż u pacjentów bez erytrocyturii. Podobne wnioski w swojej pracy przedstawili Suzuki i wsp. [121], którzy obserwowali dodatnią korelację pomiędzy stężeniem Gd-IgA1 a natężeniem krwinkomoczu.

6.8.2 Czynność nerek a ekspresja i/lub stężenia badanych biomarkerów

W grupie badanej obserwowano istotne statystycznie słabe ujemne korelacje pomiędzy wielkością przesączana kłębuszkowego (eGFR) a stężeniami Gd-IgA1 w surowicy krwi oraz CD71 w moczu. W dostępnej literaturze Kim i wsp. [110] również zaobserwowali słabą ujemną

korelację pomiędzy stężeniem Gd-IgA1 a współczynnikiem filtracji kłębuszkowej (eGFR). Natomiast w pracy Bagchi i wsp. [122] nie stwierdzano zależności pomiędzy stężeniem IgA1 a funkcją filtracyjną nerek.

6.8.3 Ocena histopatologiczna bioptatów nerek a ekspresja i/lub stężenia badanych biomarkerów u pacjentów z nefropatia IgA

W przeprowadzonej pracy nie stwierdzono zależności pomiędzy stopniem zaawansowania zmian nieodwracalnych opisanych w badaniu histopatologicznym bioptatów nerek a analizowanymi biomarkerami.

Kim i wsp. [110] w swojej pracy obserwowali istotną zależność pomiędzy stężeniem Gd-IgA1 a włóknieniem zrębu i zanikiem cewek. Podobnie Wada i wsp. stwierdzili istotną zależność pomiędzy stężeniem Gd-IgA1 a segmentalnym twardnieniem kłębuszków oraz włóknieniem zrębu i zanikiem cewek[123].

7 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 bioptatach nerek.
7. Dodatkowo w przeprowadzonym badaniu potwierdzono, że zmiany nieodwracalne stwierdzone w badaniu histopatologicznym bioptatów nerek mają niekorzystny wpływ na postęp przewlekłej choroby nerek.

8 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 bioptatu 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 moczu. Przeanalizowano zależności pomiędzy wszystkimi badanymi biomarkerami oraz zmianami histopatologicznymi stwierdzonymi w bioptatach 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 przepływowowej. 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 bioptatów 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/1,73m².

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 bioptatach nerek.
7. Dodatkowo w przeprowadzonym badaniu potwierdzono, że zmiany nieodwracalne stwierdzone w badaniu histopatologicznym bioptatów nerek mają niekorzystny wpływ na postęp przewlekłej choroby nerek.

9 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 assessment 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 ($r = -0.353$, $p = 0.046$) 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 m² 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.

10 Spis rycin

- Rycina 1. Przykładowa analiza próbki krwi z wykorzystaniem cytometrii przepływowej.
- Rycina 2. Przykładowa analiza referencyjnego zestawu Quantibrite™ PE Phycoerytin Fluorescence Quantitation Kit (Becton Dickinson).
- Rycina 3. Funkcja filtracyjna nerek w zależności od stopnia zaawansowania zmian o charakterze nieodwracalnym w badaniu histopatologicznym biopłatów nerek.
- Rycina 4. Porównanie częstości ubytku funkcji filtracyjnej nerek poniżej 30 ml/min/1,73m² u pacjentów różnym stopniem zaawansowania zmian nieodwracalnych w badaniu histopatologicznym ($p < 0,001$).

11 Spis tabel

- Tabela 1. Nefropatia IgA – zmodyfikowana Klasyfikacja Oksfordzka, skala MEST-C (2016 r.).
- Tabela 2. Częstość obserwowanych obrazów histopatologicznych w biopsjach nerek pacjentów włączonych do badania z podziałem na kategorie o różnym stopniu zaawansowania zmian o charakterze nieodwracalnym.
- Tabela 3. Zależność pomiędzy stanem klinicznym w okresie okołobiopsyjnym a nasileniem zmian nieodwracalnych w biopsji nerki.
- Tabela 4. Parametry laboratoryjne grupy badanej w chwili włączenia do badania.
- Tabela 5. Wyniki oznaczenia ekspresji receptora CD89 na neutrofilach oraz monocytach.
- Tabela 6. Wyniki oznaczenia stężenia Gd-IgA1 oraz sCD89 w surowicy krwi.
- Tabela 7. Wyniki oznaczenia stężenia sCD89, CD71 oraz TG2 w moczu.
- Tabela 8. Macierz korelacji pomiędzy biomarkerami w grupie badanej.
- Tabela 9. Macierz korelacji pomiędzy biomarkerami w grupie kontrolnej.
- Tabela 10. Zależność pomiędzy badanymi markerami a płcią pacjentów.
- Tabela 11. Zależność pomiędzy badanymi markerami a wiekiem pacjentów oraz okresem czasu od wykonania biopsji do przeprowadzenia badania.
- Tabela 12. Wpływ glikokortykosteroidoterapii (GKS) na badane biomarkery.
- Tabela 13. Macierz korelacji pomiędzy badanymi markerami a wykładnikami aktywności choroby.
- Tabela 14. Zależność badanych biomarkerów od obecności erytrocyturii.
- Tabela 15. Korelacje pomiędzy badanymi biomarkerami a wielkością przesączania kłębuszkowego (eGFR).
- Tabela 16. Zależność badanych biomarkerów od zmian nieodwracalnych stwierdzonych w badaniu histopatologicznym biopsji nerek.
- Tabela 17. Zależność czasu zachowania czynności nerek w zależności od stopnia zaawansowania zmian nieodwracalnych w badaniu histopatologicznym.

12 Bibliografia

1. Berger J; Hinglais N Les Ddpôts Intercapillaires d'IgA-IgG [Intercapillary Deposits of IgA-IgG]. *J Urol Nephrol (Paris)* **1968**, 74, 694–695.
2. Barratt, J.; Feehally, J. IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* 2005, 16, 2088–2097.
3. Donadio, J. V.; Grande, J.P. IgA Nephropathy. *N Engl J Med* **2002**, 347, 738–748, doi:10.1056/NEJMRA020109.
4. Rodrigues, J.C.; Haas, M.; Reich, H.N. IgA Nephropathy Epidemiology of IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* **2017**, 12, 677–686, doi:10.2215/CJN.07420716.
5. Suzuki, K.; Honda, K.; Tanabe, K.; Toma, H.; Nihei, H.; Yamaguchi, Y. Incidence of Latent Mesangial IgA Deposition in Renal Allograft Donors in Japan. *Kidney Int* **2003**, 63, 2286–2294, doi:10.1046/j.1523-1755.63.6s.2.x.
6. Schena, F.P.; Nistor, I. Epidemiology of IgA Nephropathy: A Global Perspective. *Semin Nephrol* **2018**, 38, 435–442, doi:10.1016/J.SEMNEPHROL.2018.05.013.
7. Berthoux, F.C.; Mohey, H.; Afiani, A. Natural History of Primary IgA Nephropathy. *Semin Nephrol* **2008**, 28, 4–9, doi:10.1016/j.semnephrol.2007.10.001.
8. Chauhan, A.; Van Kooten, C.; Jianhua, M.; Novak jannovak, J.; Knoppova, B.; Reily, C.; Maillard, N.; Rizk, D. V; Moldoveanu, Z.; Mestecky, J.; et al. The Origin and Activities of IgA1- Containing Immune Complexes in IgA Nephropathy. *Front. Immunol* **2016**, 7, 117, doi:10.3389/fimmu.2016.00117.
9. Mucha, K.; Bakun, M.; Jaźwiec, R.; Dadlez, M.; Florczak, M.; Bajor, M.; Gala, K.; Pączek, L. Complement Components, Proteolysis-Related, and Cell Communication-Related Proteins Detected in Urine Proteomics Are Associated with IgA Nephropathy. *Pol Arch Med Wewn* **2014**, 124, 380–386, doi:10.20452/pamw.2345.

10. Hsu, S.I.-H.; Ramirez, S.B.; Winn, M.P.; Bonventre, J. V; Owen, W.F. Evidence for Genetic Factors in the Development and Progression of IgA Nephropathy. *Kidney Int* **2000**, *57*, 1818–1835, doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00032.x.
11. Galla, J.H. Molecular Genetics in IgA Nephropathy. *Nephron* **2001**, *88*, 107–112, doi:10.1159/000045969.
12. Zhan, X.; Deng, F.; Wang, A.Y.; Chen, Q.; Du, Y.; Wang, Q.; Zhong, X.; Zhang, P.; Wang, W.; Chen, S.; et al. Hla-Dqb1 and Hla-Drb1 Expression Is Associated with Disease Severity in Igan. *Ann Palliat Med* **2021**, *10*, 9453–9466, doi:10.21037/apm-21-2065.
13. Sanchez-Rodriguez, E.; Southard, C.T.; Kiryluk, K. GWAS-Based Discoveries in IgA Nephropathy, Membranous Nephropathy, and Steroid-Sensitive Nephrotic Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* **2021**, *16*, 458, doi:10.2215/CJN.14031119.
14. Coppo, R. The Pathogenetic Potential of Environmental Antigens in IgA Nephropathy. *Am J Kidney Dis* **1988**, *12*, 420–424, doi:10.1016/S0272-6386(88)80038-6.
15. Tota, M.; Baron, V.; Musial, K.; Derrough, B.; Konieczny, A.; Krajewska, M.; Turkmen, K.; Kuszta, M. Clinical Medicine Secondary IgA Nephropathy and IgA-Associated Nephropathy: A Systematic Review of Case Reports. **2023**, doi:10.3390/jcm12072726.
16. Moldoveanu, Z.; Wyatt, R.J.; Lee, J.Y.; Tomana, M.; Julian, B.A.; Mestecky, J.; Huang, W.Q.; Anreddy, S.R.; Hall, S.; Hastings, M.C.; et al. Patients with IgA Nephropathy Have Increased Serum Galactose-Deficient IgA1 Levels. *Kidney Int* **2007**, *71*, 1148–1154, doi:10.1038/SJ.KI.5002185.
17. Camilla, R.; Suzuki, H.; Daprà, V.; Loiacono, E.; Peruzzi, L.; Amore, A.; Ghiggeri, G.M.; Mazzucco, G.; Scolari, F.; Gharavi, A.G.; et al. Oxidative Stress and Galactose-Deficient IgA1 as Markers of Progression in IgA Nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2011**, *6*, 1903–1911, doi:10.2215/CJN.11571210.
18. Maixnerova, D.; Ling, C.; Hall, S.; Reily, C.; Brown, R.; Neprasova, M.; Suchanek, M.; Honsova, E.; Zima, T.; Novak, J.; et al. Galactose-Deficient IgA1 and the Corresponding IgG Autoantibodies Predict IgA Nephropathy Progression. *PLoS One* **2019**, *14*, doi:10.1371/journal.pone.0212254.

19. Gharavi, A.G.; Moldoveanu, Z.; Wyatt, R.J.; Barker, C. V; Woodford, S.Y.; Lifton, R.P.; Mestecky, J.; Novak, J.; Julian, B.A. Aberrant IgA1 Glycosylation Is Inherited in Familial and Sporadic IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **2008**, *19*, 1008–1014, doi:10.1681/ASN.2007091052.
20. Moresco, R.N.; Speeckaert, M.M.; Delanghe, J.R. Diagnosis and Monitoring of IgA Nephropathy: The Role of Biomarkers as an Alternative to Renal Biopsy. *Autoimmun Rev* **2015**, *14*, 847–853, doi:10.1016/J.AUTREV.2015.05.009.
21. Suzuki, H.; Allegri, L.; Suzuki, Y.; Hall, S.; Moldoveanu, Z.; Wyatt, R.J.; Novak, J.; Julian, B.A. Galactose-Deficient IgA1 as a Candidate Urinary Polypeptide Marker of IgA Nephropathy? *Dis Markers* **2016**, *2016*, doi:10.1155/2016/7806438.
22. Floege, J.; Moura, I.C.; Daha, M.R. New Insights into the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Semin Immunopathol* **2014**, *36*, 431–442, doi:10.1007/s00281-013-0411-7.
23. Coppo, R. Biomarkers and Targeted New Therapies for IgA Nephropathy. *Pediatr Nephrol* **2017**, *32*, 725–731, doi:10.1007/S00467-016-3390-9.
24. Lechner, S.M.; Papista, C.; Chemouny, J.M.; Berthelot, L.; Monteiro, R.C. Role of IgA Receptors in the Pathogenesis of IgA Nephropathy. *Journal of Nephrology* **2015**, *29*:1, 5–11, doi:10.1007/S40620-015-0246-5.
25. Xu, L.; Li, B.; Huang, M.; Xie, K.; Li, D.; Li, Y.; Gu, H.; Fang, J. Critical Role of Kupffer Cell CD89 Expression in Experimental IgA Nephropathy. *PLoS One* **2016**, *11*, doi:10.1371/journal.pone.0159426.
26. Esteve Cols, C.; Graterol Torres, F.A.; Quirant Sánchez, B.; Marco Rusiñol, H.; Navarro Díaz, M.I.; Ara Del Rey, J.; Martínez Cáceres, E.M. Immunological Pattern in Iga Nephropathy. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21041389.
27. Moresco, R.N.; Speeckaert, M.M.; Zmonarski, S.C.; Krajewska, M.; Komuda-Leszek, E.; Perkowska-Ptasinska, A.; Gesualdo, L.; Rocchetti, M.T.; Delanghe, S.E.; Vanholder, R.; et al. Urinary Myeloid IgA Fc Alpha Receptor (CD89) and Transglutaminase-2 as New Biomarkers for Active IgA Nephropathy and Henoch-Schönlein Purpura Nephritis. *BBA Clin* **2016**, *5*, 79–84, doi:10.1016/J.BBACLI.2016.02.002.

28. Launay, P.; Grossetête, B.; Arcos-Fajardo, M.; Gaudin, E.; Torres, S.P.; Beaudoin, L.; Patey-Mariaud De Serre, N.; Lehuen, A.; Monteiro, R.C. Fc Receptor (CD89) Mediates the Development of Immunoglobulin A (IgA) Nephropathy (Berger's Disease): Evidence for Pathogenic Soluble Receptor-IgA Complexes in Patients and CD89 Transgenic Mice. *J. Exp. Med* **2000**, *191*.
29. Novak, J.; Vu, H.L.; Novak, L.; Julian, B.A.; Mestecky, J.; Tomana, M. Interactions of Human Mesangial Cells with IgA and IgA-Containing Immune Complexes. *Kidney Int* **2002**, *62*, 465–475, doi:10.1046/J.1523-1755.2002.00477.X.
30. Moura, I.C.; Centelles, M.N.; Arcos-Fajardo, M.; Malheiros, D.M.; Collawn, J.F.; Cooper, M.D.; Monteiro, R.C. Identification of the Transferrin Receptor as a Novel Immunoglobulin (Ig)A1 Receptor and Its Enhanced Expression on Mesangial Cells in IgA Nephropathy. *J. Exp. Med* **2001**, *194*, 417–425.
31. Berthelot, L.; Papista, C.; Maciel, T.T.; Biarnes-Pelicot, M.; Tissandie, E.; Wang, P.H.M.; Tamouza, H.; Jamin, A.; Bex-Coudrat, J.; Gestin, A.; et al. Transglutaminase Is Essential for IgA Nephropathy Development Acting through IgA Receptors. *Journal of Experimental Medicine* **2012**, *209*, 793–806, doi:10.1084/jem.20112005.
32. Roos, A.; Bouwman, L.H.; van Gijlswijk-Janssen, D.J.; Faber-Krol, M.C.; Stahl, G.L.; Daha, M.R. Human IgA Activates the Complement System Via the Mannan-Binding Lectin Pathway. *The Journal of Immunology* **2001**, *167*, 2861–2868, doi:10.4049/jimmunol.167.5.2861.
33. Maillard, N.; Wyatt, R.J.; Julian, B.A.; Kiryluk, K.; Gharavi, A.; Fremeaux-Bacchi, V.; Novak, J. Current Understanding of the Role of Complement in IgA Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* **2015**, *26*, 1503–1512.
34. Nangaku, M.; Shankland, S.J.; Couser, W.G. Cellular Response to Injury in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **2005**, *16*, 1195–1204, doi:10.1681/ASN.2004121098.
35. Qiu, W.; Zhou, J.; Zhu, G.; Zhao, D.; He, F.; Zhang, J.; Lu, Y.; Yu, T.; Liu, L.; Wang, Y. Sublytic C5b-9 Triggers Glomerular Mesangial Cell Apoptosis via XAF1 Gene

- Activation Mediated by P300-Dependent IRF-1 Acetylation. *Cell Death Dis* **2014**, *5*, doi:10.1038/cddis.2014.153.
36. Zhang, J.; Li, Y.; Shan, K.; Wang, L.; Qiu, W.; Lu, Y.; Zhao, D.; Zhu, G.; He, F.; Wang, Y. Sublytic C5b-9 Induces IL-6 and TGF-B1 Production by Glomerular Mesangial Cells in Rat Thy-1 Nephritis through P300-Mediated C/EBP β Acetylation. *FASEB J* **2014**, *28*, 1511–1525, doi:10.1096/FJ.13-242693.
 37. Onda, K.; Ohsawa, I.; Ohi, H.; Tamano, M.; Mano, S.; Wakabayashi, M.; Toki, A.; Horikoshi, S.; Fujita, T.; Tomino, Y. Excretion of Complement Proteins and Its Activation Marker C5b-9 in IgA Nephropathy in Relation to Renal Function. *BMC Nephrol* **2011**, *12*, doi:10.1186/1471-2369-12-64.
 38. Anders, H.J.; Andersen, K.; Stecher, B. The Intestinal Microbiota, a Leaky Gut, and Abnormal Immunity in Kidney Disease. *Kidney Int* **2013**, *83*, 1010–1016, doi:10.1038/ki.2012.440.
 39. Coppo, R. The Intestine-Renal Connection in IgA Nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2015**, *30*, 360–366, doi:10.1093/ndt/gfu343.
 40. Gutiérrez, E.; Zamora, I.; Ballarín, J.A.; Arce, Y.; Jiménez, S.; Quereda, C.; Olea, T.; Martínez-Ara, J.; Segarra, A.; Bernis, C.; et al. Long-Term Outcomes of IgA Nephropathy Presenting with Minimal or No Proteinuria. *J Am Soc Nephrol* **2012**, *23*, 1753–1760, doi:10.1681/ASN.2012010063.
 41. Szeto, C.-C.; Lai, F.M.-M.; To, K.-F.; Wong, T.Y.-H.; Chow, K.-M.; Choi, P.C.-L.; Lui, S.-F.; Li, P.K.-T. The Natural History of Immunoglobulin a Nephropathy among Patients with Hematuria and Minimal Proteinuria. *Am J Med* **2001**, *110*, 434–437, doi:10.1016/S0002-9343(01)00659-3.
 42. Shen, P.; He, L.; Huang, D. Clinical Course and Prognostic Factors of Clinically Early IgA Nephropathy. *Netherlands Journal of Medicine* **2008**, *66*, 242–247.
 43. D’Amico, G. Natural History of Idiopathic IgA Nephropathy and Factors Predictive of Disease Outcome. *Semin Nephrol* **2004**, *24*, 179–196, doi:10.1016/j.semnephrol.2004.01.001.

44. Barbour, S.J.; Reich, H.N. Risk Stratification of Patients With IgA Nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases* **2012**, *59*, 865–873, doi:10.1053/J.AJKD.2012.02.326.
45. Barbour, S.J.; Cattran, D.C.; Kim, S.J.; Levin, A.; Wald, R.; Hladunewich, M.A.; Reich, H.N. Individuals of Pacific Asian Origin with IgA Nephropathy Have an Increased Risk of Progression to End-Stage Renal Disease. *Kidney Int* **2013**, *84*, 1017–1024, doi:10.1038/ki.2013.210.
46. Khairwa, A. Indian Scenario of IGA Nephropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Afr Health Sci* **2021**, *21*, 159–165, doi:10.4314/ahs.v21i1.21.
47. Le, W.B.; Liang, S.S.; Chen, H.; Wang, S.F.; Zhang, W.Z.; Wang, X.; Wang, J.Q.; Zeng, C.H.; Liu, Z.H. Long-Term Outcome of IgA Nephropathy Patients with Recurrent Macroscopic Hematuria. *Am J Nephrol* **2014**, *40*, 43–50, doi:10.1159/000364954.
48. Herlitz, L.C.; Bomback, A.S.; Stokes, M.B.; Radhakrishnan, J.; D’agati, V.D.; Markowitz, G.S. IgA Nephropathy with Minimal Change Disease. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2014**, *9*, 1033–1039, doi:10.2215/CJN.11951113.
49. Cho, W.H.; Park, S.H.; Choi, S.K.; Jung, S.W.; Jeong, K.H.; Kim, Y.G.; Moon, J.Y.; Lim, S.J.; Sung, J.Y.; Jhee, J.H.; et al. Characterization of IgA Deposition in the Kidney of Patients with IgA Nephropathy and Minimal Change. *J Clin Med* **2020**, *9*, 1–11, doi:10.3390/JCM9082619.
50. Li, X.-W.; Liang, S.-S.; Le, W.-B.; Cheng, S.-Q.; Zeng, C.-H.; Wang, J.-Q.; Liu, Z.-H. Long-Term Outcome of IgA Nephropathy with Minimal Change Disease: A Comparison between Patients with and without Minimal Change Disease. *Journal of Nephrology* **2015**, *29*, 567–573, doi:10.1007/S40620-015-0242-9.
51. Lv, J.; Yang, Y.; Zhang, H.; Chen, W.; Pan, X.; Guo, Z.; Wang, C.; Li, S.; Zhang, J.; Zhang, J.; et al. Prediction of Outcomes in Crescentic IgA Nephropathy in a Multicenter Cohort Study. *Journal of the American Society of Nephrology* **2013**, *24*, 2118–2125, doi:10.1681/ASN.2012101017.
52. Roberts, I.S.D.; Cook, H.T.; Troyanov, S.; Alpers, C.E.; Amore, A.; Barratt, J.; Berthoux, F.; Bonsib, S.; Bruijn, J.A.; Cattran, D.C.; et al. The Oxford Classification of IgA

- Nephropathy: Pathology Definitions, Correlations, and Reproducibility. *Kidney Int* **2009**, *76*, 546–556, doi:10.1038/ki.2009.168.
53. Cattran, D.C.; Coppo, R.; Cook, H.T.; Feehally, J.; Roberts, I.S.D.; Troyanov, S.; Alpers, C.E.; Amore, A.; Barratt, J.; Berthoux, F.; et al. The Oxford Classification of IgA Nephropathy: Rationale, Clinicopathological Correlations, and Classification. *Kidney Int* **2009**, *76*, 534–545, doi:10.1038/KI.2009.243.
 54. Coppo, R.; Troyanov, S.; Bellur, S.; Cattran, D.; Cook, H.T.; Feehally, J.; Roberts, I.S.D.; Morando, L.; Camilla, R.; Tesar, V.; et al. Validation of the Oxford Classification of IgA Nephropathy in Cohorts with Different Presentations and Treatments. *Kidney Int* **2014**, *86*, 828–836, doi:10.1038/KI.2014.63.
 55. Trimarchi, H.; Barratt, J.; Cattran, D.C.; Cook, H.T.; Coppo, R.; Haas, M.; Liu, Z.H.; Roberts, I.S.D.; Yuzawa, Y.; Zhang, H.; et al. Oxford Classification of IgA Nephropathy 2016: An Update from the IgA Nephropathy Classification Working Group. *Kidney Int* **2017**, *91*, 1014–1021, doi:10.1016/j.kint.2017.02.003.
 56. Coppo, R.; Troyanov, S.; Camilla, R.; Hogg, R.J.; Cattran, D.C.; Cook, H.T.; Feehally, J.; Roberts, I.S.D.; Amore, A.; Alpers, C.E.; et al. The Oxford IgA Nephropathy Clinicopathological Classification Is Valid for Children as Well as Adults. *Kidney Int* **2010**, *77*, 921–927, doi:10.1038/KI.2010.43.
 57. Katafuchi, R.; Ninomiya, T.; Nagata, M.; Mitsuiki, K.; Hirakata, H. Validation Study of Oxford Classification of IgA Nephropathy: The Significance of Extracapillary Proliferation. *Clin J Am Soc Nephrol* **2011**, *6*, 2806–2813, doi:10.2215/CJN.02890311.
 58. Zeng, C.H.; Le, W.; Ni, Z.; Zhang, M.; Miao, L.; Luo, P.; Wang, R.; Lv, Z.; Chen, J.; Tian, J.; et al. A Multicenter Application and Evaluation of the Oxford Classification of IgA Nephropathy in Adult Chinese Patients. *Am J Kidney Dis* **2012**, *60*, 812–820, doi:10.1053/J.AJKD.2012.06.011.
 59. Nishiyama, A.; Konishi, Y.; Ohashi, N.; Morikawa, T.; Urushihara, M.; Maeda, I.; Hamada, M.; Kishida, M.; Hitomi, H.; Shirahashi, N.; et al. Urinary Angiotensinogen Reflects the Activity of Intrarenal Renin-Angiotensin System in Patients with IgA Nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* **2011**, *26*, 170–177, doi:10.1093/ndt/gfq371.

60. Floege, J.; Rauen, T.; Tang, S.C.W. Current Treatment of IgA Nephropathy. *Semin Immunopathol* **2021**, *43*, 717–728, doi:10.1007/s00281-021-00888-3.
61. Hayashi, K.; Nagahama, T.; Oka, K.; Epstein, M.; Saruta, T. Disparate Effects of Calcium Antagonists on Renal Microcirculation. *Hypertens Res* **1996**, *19*, 31–36, doi:10.1291/HYPRES.19.31.
62. Rovin, B.H.; Adler, S.G.; Barratt, J.; Bridoux, F.; Burdge, K.A.; Chan, T.M.; Cook, H.T.; Fervenza, F.C.; Gibson, K.L.; Glassock, R.J.; et al. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney Int* **2021**, *100*, S1–S276, doi:10.1016/j.kint.2021.05.021.
63. Reich, H.N.; Phan Troyanov, S.; Scholey, J.W.; Cattran, D.C.; Registry, T.G. Remission of Proteinuria Improves Prognosis in IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **2007**, *18*, 3177–3183, doi:10.1681/ASN.2007050526.
64. Ayoub, I.; Hebert, L.; Rovin, B.H. Intensive Supportive Care plus Immunosuppression in IgA Nephropathy. *N Engl J Med* **2016**, *374*, 991–992, doi:10.1056/NEJMc1600141.
65. Cheng, J.; Zhang, X.; Tian, J.; Li, Q.; Chen, J. Combination Therapy an ACE Inhibitor and an Angiotensin Receptor Blocker for IgA Nephropathy: A Meta-Analysis. *Int J Clin Pract* **2012**, *66*, 917–923, doi:10.1111/J.1742-1241.2012.02970.X.
66. Yusuf, S.; Teo, K.; Pogue, J.; Dyal, L.; Copland, I.; Schumacher, H.; Dagenais, G.; Sleight, P.; Anderson, C. Telmisartan, Ramipril, or Both in Patients at High Risk for Vascular Events. *N Engl J Med* **2008**, *358*, 1547–1559, doi:10.1056/NEJMOA0801317.
67. Dekkers, C.C.J.; Wheeler, D.C.; Sjöström, C.D.; Stefansson, B. V.; Cain, V.; Heerspink, H.J.L. Effects of the Sodium-Glucose Co-Transporter 2 Inhibitor Dapagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes and Stages 3b-4 Chronic Kidney Disease. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2018**, *33*, 2005–2011, doi:10.1093/ndt/gfx350.
68. Wheeler, D.C.; Stefansson, B. V.; Batiushin, M.; Bilchenko, O.; Cherney, D.Z.I.; Chertow, G.M.; Douthat, W.; Dwyer, J.P.; Escudero, E.; Pecoits-Filho, R.; et al. The Dapagliflozin and Prevention of Adverse Outcomes in Chronic Kidney Disease (DAPA-CKD) Trial: Baseline Characteristics. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2020**, *35*, 1700–1711, doi:10.1093/ndt/gfaa234.

69. Wheeler, D.C.; Toto, R.D.; Stefánsson, B. V.; Jongs, N.; Chertow, G.M.; Greene, T.; Hou, F.F.; McMurray, J.J.V.; Pecoits-Filho, R.; Correa-Rotter, R.; et al. A Pre-Specified Analysis of the DAPA-CKD Trial Demonstrates the Effects of Dapagliflozin on Major Adverse Kidney Events in Patients with IgA Nephropathy. *Kidney Int* **2021**, *100*, 215–224, doi:10.1016/j.kint.2021.03.033.
70. Konishi, Y.; Okada, N.; Okamura, M.; Morikawa, T.; Okumura, M.; Yoshioka, K.; Imanishi, M. Sodium Sensitivity of Blood Pressure Appearing before Hypertension and Related to Histological Damage in Immunoglobulin A Nephropathy. *Hypertension* **2001**, *38*, 81–85, doi:10.1161/01.HYP.38.1.81/FORMAT/EPUB.
71. Laverman, G.D.; Van Goor, H.; Henning, R.H.; De Jong, P.E.; De Zeeuw, D.; Navis, G. Renoprotective Effects of VPI versus ACEI in Normotensive Nephrotic Rats on Different Sodium Intakes. *Kidney Int* **2003**, *63*, 64–71, doi:10.1046/J.1523-1755.2003.00708.X.
72. Yamamoto, R.; Nagasawa, Y.; Shoji, T.; Iwatani, H.; Hamano, T.; Kawada, N.; Inoue, K.; Uehata, T.; Kaneko, T.; Okada, N.; et al. Cigarette Smoking and Progression of IgA Nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases* **2010**, *56*, 313–324, doi:10.1053/J.AJKD.2010.02.351.
73. Iseki, K.; Ikemiya, Y.; Kinjo, K.; Inoue, T.; Iseki, C.; Takishita, S. Body Mass Index and the Risk of Development of End-Stage Renal Disease in a Screened Cohort. *Kidney Int* **2004**, *65*, 1870–1876, doi:10.1111/J.1523-1755.2004.00582.X.
74. Ouyang, Y.; Xie, J.; Yang, M.; Zhang, X.; Ren, H.; Wang, W.; Chen, N. Underweight Is an Independent Risk Factor for Renal Function Deterioration in Patients with IgA Nephropathy. *PLoS One* **2016**, *11*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0162044.
75. Shimamoto, M.; Ohsawa, I.; Suzuki, H.; Hisada, A.; Nagamachi, S.; Honda, D.; Inoshita, H.; Shimizu, Y.; Horikoshi, S.; Tomino, Y. Impact of Body Mass Index on Progression of IgA Nephropathy Among Japanese Patients. *J Clin Lab Anal* **2015**, *29*, 353–360, doi:10.1002/jcla.21778.
76. Tanaka, M.; Yamada, S.; Iwasaki, Y.; Sugishita, T.; Yonemoto, S.; Tsukamoto, T.; Fukui, S.; Takasu, K.; Muso, E. Impact of Obesity on IgA Nephropathy: Comparative

- Ultrastructural Study between Obese and Non-Obese Patients. *Nephron Clin Pract* **2009**, *112*, c71–c78, doi:10.1159/000213084.
77. Kittiskulnam, P.; Kanjanabuch, T.; Tangmanjitjaroen, K.; Chanchaoenthana, W.; Praditpornsilpa, K.; Eiam-Ong, S. The Beneficial Effects of Weight Reduction in Overweight Patients With Chronic Proteinuric Immunoglobulin A Nephropathy: A Randomized Controlled Trial. *Journal of Renal Nutrition* **2014**, *24*, 200–207, doi:10.1053/J.JRN.2014.01.016.
 78. Pozzi, C.; Bolasco, P.G.; Fogazzi, G.; Andrulli, S.; Altieri, P.; Ponticelli, C.; Locatelli, F. Corticosteroids in IgA Nephropathy: A Randomised Controlled Trial. *The Lancet* **1999**, *353*, 883–887, doi:10.1016/S0140-6736(98)03563-6.
 79. Manno, C.; Torres, D.D.; Rossini, M.; Pesce, F.; Schena, F.P. Randomized Controlled Clinical Trial of Corticosteroids plus ACE-Inhibitors with Long-Term Follow-up in Proteinuric IgA Nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2009**, *24*, 3694–3701, doi:10.1093/NDT/GFP356.
 80. Lv, J.; Zhang, H.; Chen, Y.; Li, G.; Jiang, L.; Singh, A.K.; Wang, H. Combination Therapy of Prednisone and ACE Inhibitor Versus ACE-Inhibitor Therapy Alone in Patients With IgA Nephropathy: A Randomized Controlled Trial. *American Journal of Kidney Diseases* **2009**, *53*, 26–32, doi:10.1053/J.AJKD.2008.07.029.
 81. Pozzi, C.; Andrulli, S.; Del Vecchio, L.; Melis, P.; Fogazzi, G.B.; Altieri, P.; Ponticelli, C.; Locatelli, F. Corticosteroid Effectiveness in IgA Nephropathy: Long-Term Results of a Randomized, Controlled Trial. *J Am Soc Nephrol* **2004**, *15*, 157–163, doi:10.1097/01.ASN.0000103869.08096.4F.
 82. Pozzi, C.; Bolasco, P.G.; Fogazzi, G.; Andrulli, S.; Altieri, P.; Ponticelli, C.; Locatelli, F. Corticosteroids in IgA Nephropathy: A Randomised Controlled Trial. *Lancet* **1999**, *353*, 883–887, doi:10.1016/S0140-6736(98)03563-6.
 83. Durlík, M. Nefropatia IgA. *Nefrologia i Dializoterapia Polska* **2020**, 51–56.
 84. Rauen, T.; Fitzner, C.; Eitner, F.; Sommerer, C.; Zeier, M.; Otte, B.; Panzer, U.; Peters, H.; Benck, U.; Mertens, P.R.; et al. Effects of Two Immunosuppressive Treatment

- Protocols for IgA Nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **2018**, *29*, 317, doi:10.1681/ASN.2017060713.
85. Feehally, J. Immunosuppression in IgA Nephropathy: Guideline Medicine Versus Personalized Medicine. *Semin Nephrol* **2017**, *37*, 464–477, doi:10.1016/J.SEMNEPHROL.2017.05.019.
 86. Lv, J.; Wong, M.G.; Hladunewich, M.A.; Jha, V.; Hooi, L.S.; Monaghan, H.; Zhao, M.; Barbour, S.; Jardine, M.J.; Reich, H.N.; et al. Effect of Oral Methylprednisolone on Decline in Kidney Function or Kidney Failure in Patients With IgA Nephropathy: The TESTING Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association* **2022**, *327*, 1888–1898, doi:10.1001/JAMA.2022.5368.
 87. Sarcina, C.; Tinelli, C.; Ferrario, F.; Pani, A.; De Silvestri, A.; Scaini, P.; Del Vecchio, L.; Alberghini, E.; Buzzi, L.; Baragetti, I.; et al. Changes in Proteinuria and Side Effects of Corticosteroids Alone or in Combination with Azathioprine at Different Stages of IgA Nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2016**, *11*, 973–981, doi:10.2215/CJN.02300215.
 88. Chen, X.; Chen, P.; Cai, G.; Wu, J.; Cui, Y.; Zhang, Y.; Liu, S.; Tang, L. [A Randomized Control Trial of Mycophenolate Mofetil Treatment in Severe IgA Nephropathy]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* **2002**, *82*, 796–801.
 89. Tang, S.C.W.; Tang, A.W.C.; Wong, S.S.H.; Leung, J.C.K.; Ho, Y.W.; Lai, K.N. Long-Term Study of Mycophenolate Mofetil Treatment in IgA Nephropathy. *Kidney Int* **2010**, *77*, 543–549, doi:10.1038/KI.2009.499.
 90. Maes, B.D.; Oyen, R.; Claes, K.; Evenepoel, P.; Kuypers, D.; Vanwalleghem, J.; Van Damme, B.; Vanrenterghem, Y.F.C. Mycophenolate Mofetil in IgA Nephropathy: Results of a 3-Year Prospective Placebo-Controlled Randomized Study. *Kidney Int* **2004**, *65*, 1842–1849, doi:10.1111/J.1523-1755.2004.00588.X.
 91. Frisch, G.; Lin, J.; Rosenstock, J.; Markowitz, G.; D’Agati, V.; Radhakrishnan, J.; Preddie, D.; Crew, J.; Valeri, A.; Appel, G.B. Mycophenolate Mofetil (MMF) vs Placebo in Patients with Moderately Advanced IgA Nephropathy: A Double-Blind Randomized

- Controlled Trial. *Nephrology Dialysis Transplantation* **2005**, *20*, 2139–2145, doi:10.1093/NDT/GFH974.
92. Klinger, M.; Durlík, M.; Grenda, R.; Rutkowski, B.; Ciechanowski, K. Przewodnik Stosowania Mykofenolanu Mofetilu (MMF) w Leczeniu Kłębuszkowych Zapaleń Nerek The Guide of Mycophenolate Mofetil (MMF) Treatment of Glomerulonephritis. *Forum Nefrologiczne* **2013**, *6*, 197–202.
93. Lai, K.; Lai, F.M.M.; Li, P.K.T.; Vallance-Owen, J. Cyclosporin Treatment of IgA Nephropathy: A Short Term Controlled Trial. *Br Med J (Clin Res Ed)* **1987**, *295*, 1165–1168, doi:10.1136/BMJ.295.6607.1165.
94. Zhang, Y.; Luo, J.; Hu, B.; Ma, T. Efficacy and Safety of Tacrolimus Combined with Glucocorticoid Treatment for IgA Nephropathy: A Meta-Analysis. *Journal of International Medical Research* **2018**, *46*, 3236–3250, doi:10.1177/0300060518776566.
95. Lafayette, R.A.; Canetta, P.A.; Rovin, B.H.; Appel, G.B.; Novak, J.; Nath, K.A.; Sethi, S.; Tumlin, J.A.; Mehta, K.; Hogan, M.; et al. A Randomized, Controlled Trial of Rituximab in IgA Nephropathy with Proteinuria and Renal Dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology* **2017**, *28*, 1306–1313, doi:10.1681/ASN.2016060640.
96. Levey, A.S.; Bosch, J.P.; Lewis, J.B.; Greene, T.; Rogers, N.; Roth, D. A More Accurate Method to Estimate Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine: A New Prediction Equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* **1999**, *130*, 461–470, doi:10.7326/0003-4819-130-6-199903160-00002.
97. Conover, W.J. *Practical Nonparametric Statistics*,; 3rd ed.; John Wiley & Sons: New York, 1999.
98. Rodrigues, J.C.; Haas, M.; Reich, H.N. IgA Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol* **2017**, *12*, 677–686, doi:10.2215/CJN.07420716.
99. Lai, K.N.; Tang, S.C.W.; Schena, F.P.; Novak, J.; Tomino, Y.; Fogo, A.B.; Glassock, R.J. IgA Nephropathy. *Nat Rev Dis Primers* **2016**, *2*, doi:10.1038/NRDP.2016.1.

100. Berg, U.B.; Bohman, S.-O.; Widstam-Attorps, U. Renal Histological Changes in Relation to Renal Function and Urinary Protein Excretion in IgA Nephropathy. *Archives of Disease in Childhood* **1991**, *66*, 593–597, doi:10.1136/adc.66.5.593.
101. Widstam-Attorps, U.; Berg, U.; Bohman, S.O.; Lefvert, A.K. Proteinuria and Renal Function in Relation to Renal Morphology. A Clinicopathological Study of IgA Nephropathy at the Time of Kidney Biopsy. *Clin Nephrol* **1992**, *38*, 245–253.
102. Alamartine, E.; Sauron, C.; Laurent, B.; Sury, A.; Seffert, A.; Mariat, C. The Use of the Oxford Classification of IgA Nephropathy to Predict Renal Survival. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **2011**, *6*, 2384–2388, doi:10.2215/CJN.01170211.
103. Coppo, R.; D’Amico, G. Factors Predicting Progression of IgA Nephropathies. *J Nephrol* **2005**, *18*, 503–512.
104. D’Amico, G.; Imbasciati, E.; Di Belgioioso, G.B.; Bertoli, S.; Fogazzi, G.; Ferrario, F.; Fellin, G.; Ragni, A.; Colasanti, G.; Minetti, L.; et al. Idiopathic IgA Mesangial Nephropathy. Clinical and Histological Study of 374 Patients. *Medicine* **1985**, *64*, 49–60, doi:10.1097/00005792-198501000-00004.
105. Kaihan, A.B.; Yasuda, Y.; Imaizumi, T.; Inagaki, K.; Ozeki, T.; Hishida, M.; Katsuno, T.; Tsuboi, N.; Maruyama, S. Clinical Impact of Endocapillary Proliferation with Modified Cutoff Points in IgA Nephropathy Patients. *PLoS One* **2019**, *14*, doi:10.1371/journal.pone.0214414.
106. Grossetête, B.; Launay, P.; Lehuen, A.; Jungers, P.; Bach, J.F.; Monteiro, R.C. Down-Regulation of Fc α Receptors on Blood Cells of IgA Nephropathy Patients: Evidence for a Negative Regulatory Role of Serum IgA. *Kidney Int* **1998**, *53*, 1321–1335, doi:10.1046/J.1523-1755.1998.00885.X.
107. Cox, S.N.; Serino, G.; Sallustio, F.; Blasi, A.; Rossini, M.; Pesce, F.; Schena, F.P. Original Articles Altered Monocyte Expression and Expansion of Non-Classical Monocyte Subset in IgA Nephropathy Patients. *Nephrol Dial Transplant* **2015**, *30*, 1122–1132, doi:10.1093/ndt/gfv017.
108. Suzuki, H. Biomarkers for IgA Nephropathy on the Basis of Multi-Hit Pathogenesis. *Clin Exp Nephrol* **1234**, *23*, 26–31, doi:10.1007/s10157-018-1582-2.

109. Yanagawa, H.; Suzuki, H.; Suzuki, Y.; Kiryluk, K.; Gharavi, A.G.; Matsuoka, K.; Makita, Y.; Julian, B.A.; Novak, J.; Tomino, Y. A Panel of Serum Biomarkers Differentiates IgA Nephropathy from Other Renal Diseases. *PLoS One* **2014**, *9*, doi:10.1371/journal.pone.0098081.
110. Kim, J.S.; Hwang, H.S.; Lee, S.H.; Kim, Y.G.; Moon, J.Y.; Kong, J.Y.; Jeong, K.H. Clinical Relevance of Serum Galactose Deficient Iga1 in Patients with Iga Nephropathy. *J Clin Med* **2020**, *9*, 1–11, doi:10.3390/jcm9113549.
111. Cambier, A.; Gleeson, P.J.; Abbad, L.; Canesi, F.; da Silva, J.; Bex-Coudrat, J.; Deschênes, G.; Boyer, O.; Rabant, M.; Ulinski, T.; et al. Soluble CD89 Is a Critical Factor for Mesangial Proliferation in Childhood IgA Nephropathy. *Kidney Int* **2022**, *101*, 274–287, doi:10.1016/J.KINT.2021.09.023.
112. Wu, H.; Wang, X.; Yang, Z.; Zhao, Q.; Wen, Y.; Li, X.; Zhang, W.; Gao, R. Serum Soluble CD89-IgA Complexes Are Elevated in IgA Nephropathy without Immunosuppressant History. *Dis Markers* **2020**, *2020*, doi:10.1155/2020/8393075.
113. Vuong, M.T.; Hahn-Zoric, M.; Lundberg, S.; Gunnarsson, I.; Van Kooten, C.; Wramner, L.; Seddighzadeh, M.; Fernström, A.; Hanson, L.Å.; Do, L.T.; et al. Association of Soluble CD89 Levels with Disease Progression but Not Susceptibility in IgA Nephropathy. *Kidney Int* **2010**, *78*, 1281–1287, doi:10.1038/ki.2010.314.
114. Berthelot, L.; Robert, T.; Vuiblet, V.; Tabary, T.; Braconnier, A.; Dramé, M.; Toupance, O.; Rieu, P.; Monteiro, R.C.; Touré, F. Recurrent IgA Nephropathy Is Predicted by Altered Glycosylated IgA, Autoantibodies and Soluble CD89 Complexes. *Kidney Int* **2015**, *88*, 815–822, doi:10.1038/ki.2015.158.
115. Jhee, J.H.; Kang, H.Y.; Wu, M.; Nam, B.Y.; Chang, T.I.; Jung, S.Y.; Park, S.; Kim, H.; Yun, H.R.; Kee, Y.K.; et al. Circulating CD89-IgA Complex Does Not Predict Deterioration of Kidney Function in Korean Patients with IgA Nephropathy. *Clin Chem Lab Med* **2017**, *56*, 75–85, doi:10.1515/CCLM-2017-0090/DOWNLOADASSET/SUPPL/CCLM-2017-0090_SUPPL.DOCX.
116. Monteiro, R.C. Pathogenic Role of IgA Receptors in IgA Nephropathy. *IgA Nephropathy Today* **2007**, *157*, 64–69, doi:10.1159/000102306.

117. Delanghe, S.E.; Speeckaert, M.M.; Segers, H.; Desmet, K.; Vande Walle, J.; Laecke, S. Van; Vanholder, R.; Delanghe, J.R. Soluble Transferrin Receptor in Urine, a New Biomarker for IgA Nephropathy and Henoch-Schönlein Purpura Nephritis. *Clin Biochem* **2013**, *46*, 591–597, doi:10.1016/J.CLINBIOCHEM.2013.01.017.
118. Frenkel, A.; Kachko, E.; Cohen, K.; Novack, V.; Maimon, N. Estimations of a Degree of Steroid Induced Leukocytosis in Patients with Acute Infections. *Am J Emerg Med* **2018**, *36*, 749–753, doi:10.1016/J.AJEM.2017.10.003.
119. Frenkel, A.; Kachko, E.; Novack, V.; Klein, M.; Brotfain, E.; Koyfman, L.; Maimon, N. The Association of Glucocorticosteroid Treatment with WBC Count in Patients with COPD Exacerbation. *J Clin Med* **2019**, *8*, doi:10.3390/jcm8101697.
120. Kim, M.J.; Schaub, S.; Molyneux, K.; Koller, M.T.; Stampf, S.; Barratt, J. Effect of Immunosuppressive Drugs on the Changes of Serum Galactose-Deficient IgA1 in Patients with IgA Nephropathy. *PLoS One* **2016**, *11*, 1–11, doi:10.1371/journal.pone.0166830.
121. Suzuki, Y.; Matsuzaki, K.; Suzuki, H.; Okazaki, K.; Yanagawa, H.; Ieiri, N.; Sato, M.; Sato, T.; Taguma, Y.; Matsuoka, J.; et al. Serum Levels of Galactose-Deficient Immunoglobulin (Ig) A1 and Related Immune Complex Are Associated with Disease Activity of IgA Nephropathy. *Clin Exp Nephrol* **2014**, *18*, 770–777, doi:10.1007/s10157-013-0921-6.
122. Bagchi, S.; Lingaiah, R.; Mani, K.; Barwad, A.; Singh, G.; Balooni, V.; Bhowmik, D.; Agarwal, S.K. Significance of Serum Galactose Deficient IgA1 as a Potential Biomarker for IgA Nephropathy: A Case Control Study. *PLoS One* **2019**, *14*, doi:10.1371/journal.pone.0214256.
123. Wada, Y.; Matsumoto, K.; Suzuki, T.; Saito, T.; Kanazawa, N.; Tachibana, S.; Iseri, K.; Sugiyama, M.; Iyoda, M.; Shibata, T. Clinical Significance of Serum and Mesangial Galactose-Deficient IgA1 in Patients with IgA Nephropathy. *PLoS One* **2018**, *13*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0206865.