

Dagna Rukasz

Rozprawa doktorska

Rola przeciwciał anty-PLA2R w glomerulopatiach

Streszczenie

Wstęp

Glomerulopatia błoniasta (MN) stanowi jedną z najczęstszych przyczyn zespołu nerczycowego u dorosłych. Rokowanie odległe zależne jest od uzyskania remisji.

Choroba występuje w postaci pierwotnej oraz w postaci wtórnej, pojawiając się w przebiegu różnych chorób ogólnoustrojowych – między innymi nowotworów, wirusowego zapalenia wątroby i chorób autoimmunologicznych.

W postaci pierwotnej kluczowe znaczenie w patogenezie odgrywa antygen PLA2R – receptor dla fosfolipazy A2 zlokalizowany na powierzchni podocyta. W 2009 r. w surowicy chorych z rozpoznaniem pierwotnej MN zidentyfikowano autoprzeciwciała przeciwko temu receptorowi (anty-PLA2R).

Przeciwciała anty-PLA2R występują głównie w podklasie IgG4 immunoglobulin. Z uwagi na dużą swoistość (>90%) oraz czułość (70-80%) ich oznaczenie znajduje zastosowanie w diagnostyce i monitorowaniu terapii pierwotnej MN. Obecnie dostępne testy wykrywające przeciwciała anty-PLA2R oparte są na metodzie immunofluorescencji pośredniej (IFA) lub teście immunoenzymatycznym (ELISA).

W złogach immunologicznych wzdłuż błony podstawnej w badaniu histopatologicznym biopunktatu nerki stwierdza się obecność antygenu PLA2R oraz IgG4.

U niektórych pacjentów z postacią pierwotną glomerulopatii błoniastej (5-10%), u których nie stwierdza się obecności przeciwciał anty-PLA2R w surowicy, wykazano obecność przeciwciał klasy IgG4 skierowanych przeciwko innemu antygenowi błonowemu podocytów – trombospondynie-1 z domeną 7A (THSD7A).

Cel

Celem badania było określenie wartości oznaczeń przeciwciał anti-PLA2R w surowicy jako markerów pierwotnego błoniastego kłębuszkowego zapalenia nerek w materiale Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej we Wrocławiu, porównanie wyników oznaczeń wykonywanych metodą immunofluorescencji pośredniej i testem ELISA oraz ocena zależności oznaczeń przeciwciał anti-PLA2R w surowicy krwi i aktywności choroby. Zaplanowano również ocenę występowania złogów antygeny PLA2R i IgG4 w biopsji nerek pacjentów z rozpoznaniem glomerulopatii błoniastej i zależności pomiędzy natężeniem reakcji immunohistochemicznej nerkowych złogów PLA2R i IgG4 a aktywnością błoniastego zapalenia nerek. Dodatkowo postanowiono sprawdzić przydatność diagnostyczną oznaczeń przeciwciał anti-THSD7A w surowicy.

Material i metody

Badanie zostało przeprowadzone u pacjentów Kliniki Nefrologii i Medycyny Transplantacyjnej we Wrocławiu. Analizy wykonano u 50 pacjentów z rozpoznaniem pierwotnej MN (grupa badana), 15 pacjentów z rozpoznaniem wtórnej MN, 138 pacjentów z innymi pierwotnymi kłębuszkowymi zapaleniami nerek, 21 pacjentów z rozpoznaniem toczniowego zapalenia nerek (klasa II, III, IV) oraz u 20 zdrowych ochotników. Do badania obecności przeciwciał anti-PLA2R w surowicy wykorzystano dwa dostępne komercyjnie testy diagnostyczne – test immunofluorescencji pośredniej (IFA, ocena półilościowa) oraz test ELISA (ocena ilościowa). U każdego uczestnika badania pobierano surowicę celem oznaczenia obecności przeciwciał anti-PLA2R. U osób z rozpoznaniem glomerulopatii błoniastej pierwotnej i wtórnej oraz wszystkich pozostałych, u których uzyskano wynik dodatni lub niespecyficzną reakcję immunofluorescencji, oznaczenia obecności przeciwciał wykonywano podczas każdej wizyty w Klinice. U badanych z rozpoznaniem glomerulopatii błoniastej pierwotnej oznaczano standardowe parametry laboratoryjne określające aktywność kliniczną kłębuszkowego zapalenia nerek (stężenie w surowicy białka całkowitego, albumin, nasilenie białkomoczu) podczas każdej wizyty. Po 24 miesiącach od dnia włączenia do badania w grupie badanej określano ubytek funkcji filtracyjnej nerek (wyrażony obniżeniem eGFR) oraz nasilenie białkomoczu.

Oznaczenia obecności antygeny PLA2R i IgG4 w kłębuszkowych złogach immunologicznych wykonywano metodą immunohistochemiczną przy użyciu dostępnych

komercyjnie testów diagnostycznych. Materiał z archiwalnych biopsji nerek był dostępny u 32 osób z rozpoznaniem pierwotnej MN.

Oznaczenia obecności przeciwciał anti-THSD7A wykonywano przy użyciu testu immunofluorescencji pośredniej (ocena półilościowa) jednorazowo u wszystkich uczestników badania z rozpoznaniem glomerulopatii błoniastej pierwotnej i wtórnej.

Wyniki

W grupie glomerulopatii błoniastej pierwotnej obecność przeciwciał anti-PLA2R stwierdzono u 64% pacjentów. W grupie kontrolnej oraz u pacjentów z innymi typami kłębuszkowych zapaleń nerek obecność przeciwciał wykazano u 6% pacjentów. W grupie zdrowych uczestników obecności przeciwciał nie stwierdzono. Czułość i swoistość obu metod wynosiła odpowiednio 64% i 94% dla testu IFA oraz 56% i 93% dla testu ELISA. Wykazano wysoką zgodność wyników testów IFA oraz ELISA dla oznaczenia przeciwciał anti-PLA2R w surowicy ($r=0,90$, $p<0,001$).

W grupie glomerulopatii błoniastej pierwotnej wykazano, że w dniu włączenia do badania u pacjentów, w których surowicy obecne były przeciwciała anti-PLA2R, stężenia białka całkowitego (średnio $4,93\pm 0,76$ vs $5,60\pm 1,06$, $p=0,020$) i albumin w surowicy (średnio $2,68\pm 0,63$ vs $3,29\pm 1,04$, $p=0,015$) były niższe, a białkomocz większy (mediana $3,6$ [IQR $2,1-6,3$] vs $1,5$ [$0,5-3,0$], $p=0,033$) w porównaniu do pacjentów bez przeciwciał w surowicy.

Stwierdzono, że natężenie reakcji immunofluorescencji pośredniej (test IFA) dla przeciwciał anti-PLA2R korelowało dodatnio z nasileniem białkomoczu ($r=0,39$, $p<0,001$), a ujemnie ze stężeniem białka całkowitego ($r=-0,39$, $p<0,001$) oraz albumin ($r=-0,51$, $p<0,001$) w surowicy.

Wykazano dodatnią korelację pomiędzy stężeniem przeciwciał anty-PLA2R w surowicy oznaczanych testem ELISA a natężeniem białkomoczu ($r=0,42$, $p<0,001$) oraz ujemną korelację ze stężeniem białka całkowitego ($r=-0,37$, $p<0,001$) i albumin w surowicy ($r=-0,55$, $p<0,001$). Występowanie aktywnego osadu moczu obserwowano tym częściej, im wyższe było stężenie przeciwciał w surowicy ($p<0,001$).

Po 24 miesiącach obserwacji nie obserwowano różnic w zachowaniu funkcji filtracyjnej nerek pomiędzy pacjentami z obecnymi i nieobecnymi przeciwciałami anty-PLA2R w surowicy. W grupie pacjentów z obecnymi w surowicy przeciwciałami anty-PLA2R po 24 miesiącach częściej stwierdzano obecność białkomoczu w porównaniu do grupy z nieobecnymi przeciwciałami ($p=0,017$).

Przebadano 32 archiwalne biopaty nerek pacjentów z rozpoznaniem pierwotnej MN oraz 8 pacjentów z rozpoznaniem wtórnej MN. Badaniem immunohistochemicznym nie stwierdzono różnic w częstości występowania antygenów PLA2R oraz IgG4 w kłębuszkowych złogach immunologicznych pomiędzy pierwotną a wtórną postacią choroby. Natężenie reakcji immunohistochemicznej dla kłębuszkowych złogów antygeny PLA2R i IgG4 nie korelowało z wykładnikami aktywności pierwotnej MN (białkomocz, stężenie białka całkowitego i albumin w surowicy). W grupie pierwotnej MN wykazano związek pomiędzy nasileniem reakcji immunohistochemicznej dla złogów IgG4 w kłębuszku nerkowym a stężeniem przeciwciał anty-PLA2R w surowicy oznaczanym testem ELISA ($p=0,034$).

W żadnej z badanych próbek surowicy nie stwierdzono obecności przeciwciał anty-THSD7A.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych w materiale własnym badań sformułowano następujące wnioski :

- 1.** wyniki oznaczeń przeciwciał anty-PLA2R w surowicy testami immunofluorescencji pośredniej i ELISA w grupie pierwotnej glomerulopatii błoniastej wykazują znaczną zgodność interpretacji;
- 2.** czułość i swoistość obu testów dla oznaczenia przeciwciał anty-PLA2R w procesie rozpoznawania pierwotnej glomerulopatii błoniastej są wysokie;
- 3.** natężenie przeciwciał anty-PLA2R uzyskane w teście IFA oraz stężenia przeciwciał (test ELISA) korelują z wykładnikami aktywności choroby w pierwotnej glomerulopatii błoniastej;
- 4.** po 24 miesiącach obserwacji białkomocz występuje częściej w grupie pierwotnej z obecnymi w surowicy przeciwciałami anty-PLA2R;
- 5.** po 24 miesiącach obserwacji nie stwierdza się różnicy w ubytku funkcji filtracyjnej nerek w zależności od obecności przeciwciał anty-PLAR w surowicy krwi;
- 6.** obecność złogów IgG4 oraz antygenu PLA2R w kłębuszkowych złogach immunologicznych nie różnicuje pierwotnej i wtórnej glomerulopatii błoniastej w badanej grupie;
- 7.** natężenie reakcji immunohistochemicznej kłębuszkowych złogów IgG4 i PLA2R w badanej grupie nie koreluje z wykładnikami aktywności choroby;
- 8.** w badanej grupie nie stwierdzono dodatnich wyników oznaczeń anty-THSD7A.

Abstract

Introduction

Membranous glomerulonephritis (MN) is a frequent cause of nephrotic syndrome in adults. The disease occurs as primary glomerulonephritis (iMN) or secondary (sMN) to other systemic diseases – neoplasms, viral hepatitis and autoimmune diseases.

Phospholipase A2 receptor (PLA2R), which is expressed by podocytes, plays the crucial role in pathogenesis of iMN. Autoantibodies (Abs) against PLA2R antigen (anti-PLA2R), mainly IgG4 subclass, were identified in sera of patients with iMN diagnosis. The specificity and sensitivity of anti-PLA2R Abs is high (>90% and 70-80%, respectively), therefore, they are applied to diagnose and monitor the treatment of iMN. Currently, two commercially available assays detecting anti-PLA2R Abs are used – an indirect immunofluorescence test (IFA) or immunoenzymatic assay (ELISA).

Glomerular immune deposits observed in histopathological examinations of iMN kidney biopsies contain PLA2R antigen and IgG4.

In 5-10% of iMN patients who do not present serum anti-PLA2R Abs, antibodies against thrombospondin type-1 domain-containing 7A (anti-THSD7A) are found.

Aim

The study was conducted to determine the value of serum anti-PLA2R Abs as biomarker of primary membranous glomerulonephritis in pts from Clinic of Nephrology and Transplantation Medicine Wrocław, to compare the results of IFA and ELISA and to assess association between anti-PLA2R antibodies and disease activity expressed by proteinuria, serum albumin and protein.

Additionally, the aim was to analyze the presence of PLA2R and IgG4 in immune deposits in kidney biopsies from patients with membranous nephropathy. The intensity of immunohistochemistry staining for PLA2R antigen and IgG4 was compared to disease activity.

Eventually, the usefulness of serum anti-THSD7A antibodies in diagnosis of primary MN was verified.

Material and methods

The study was performed in patients (pts) treated at the Nephrology and Transplantation Medicine Department of Wrocław Medical University, Poland. The study included 50 pts with iMN, 15 pts with sMN, 138 pts with other primary glomerulonephritides, 21 pts with lupus nephritis class II, III, IV, and 20 healthy volunteers. Two commercially available tests were used to determine the presence of serum anti-PLA2R Abs: IFA (semi-quantitative) and ELISA (quantitative). Single serum sample was collected from every study participant. Participants who were diagnosed with membranous nephropathy and others who were positive for anti-PLA2R antibodies had their samples taken during consecutive visits in the clinic. Standard clinical data related to disease activity (including serum albumin and protein, serum creatinine, total cholesterol and proteinuria) were collected at the time of serum sampling. The patients were followed up for at least 24 months.

Archive renal biopsies were available for 32 iMN pts. The glomerular staining for antigen PLA2R and IgG4 was performed with immunohistochemistry with commercial antibodies.

The presence of anti-THSD7A antibodies was tested in sera collected from patient with iMN, sMN and healthy volunteers.

Results

64% of pts with primary membranous glomerulonephritis and 6% of pts with other glomerulonephritides were positive for serum anti-PLA2R Abs. The group of healthy volunteers was anti-PLA2R Abs negative. Sensitivity and specificity of the assays were 64% and 94% for IFA, and 56% and 93% for ELISA, respectively. The results obtained with both methods were highly consistent ($r=0.90$, $p<0.001$).

At the recruitment to the study, anti-PLA2R positive iMN pts had significantly lower serum total protein (mean 4.93 ± 0.76 vs 5.60 ± 1.06 , $p=0.020$) and serum albumin (mean 2.68 ± 0.63 vs 3.29 ± 1.04 , $p=0.015$), accompanied with higher proteinuria (median 3.6 [IQR $2.1-6.3$] vs 1.5 [$0.5-3.0$], $p=0.033$), compared to anti-PLA2R negative iMN pts. In the anti-PLA2R positive iMN pts group, the intensity of the fluorescence in IFA positively correlated with daily proteinuria ($r=0.39$, $p<0.001$) and negatively with serum protein ($r=-0.39$, $p<0.001$) and serum albumin ($r=-0.51$, $p<0.001$). Anti-PLA2R Abs concentration (ELISA) was also positively correlated with daily proteinuria ($r=0.42$, $p<0.001$), while negatively with serum protein ($r=-0.37$, $p<0.001$) and serum albumin ($r=-0.55$, $p<0.001$). Active urinary sediments were significantly more frequent in pts with higher anti-PLA2R concentrations ($p<0.001$). After 24 months of observation, no difference in kidney function loss between anti-PLA2R positive and negative iMN pts was observed. After 24 months of observation, proteinuria was detected more often in anti-PLA2R positive iMN pts ($p=0.017$).

32 archive iMN and 8 sMN kidney biopsies were examined. There was no difference in percentage of positive glomerular staining for PLA2R antigen and IgG4 between the groups. There was no correlation between iMN activity (serum albumin and protein, and proteinuria) and intensity of immunohistochemical staining for glomerular PLA2R antigen and IgG4. In iMN pts, the intensity of immunohistochemical staining for IgG4 was correlated positively with serum anti-PLA2R concentration (ELISA, $p=0.034$).

None of the examined serum samples was positive for anti-THSD7A antibodies.

Conclusions

Based on the study results the following conclusions were drawn:

1. the results of anti-PLA2R antibodies obtained with both assays are highly consistent;
2. the sensitivity and specificity of both IFA and ELISA assays in the diagnosis of iMN is high;
3. the IFA intensity for anti-PLA2R, and antibodies concentration (ELISA) correlate with iMN activity;
4. after 24-month observation pts with serum anti-PLA2R antibodies presented persistent proteinuria more often than pts with no anti-PLA2R antibodies;
5. after 24-month observation there was no difference in kidney function loss between iMN pts with and without serum anti-PLA2R antibodies;
6. the presence of glomerular staining for PLA2R antigen and IgG4 in kidney biopsy do not differentiate iMN and sMN;
7. the intensity of immunohistochemical staining for glomerular PLA2R antigen and IgG4 does not correlate with iMN activity (serum albumin and protein, and proteinuria);
8. the tested sera from iMN and sMN pts do not demonstrate the presence of anti-THSD7A antibodies.