

lek. Aleksandra Jadwiga Starzyńska-Kubicka

OCENA CZYNNIKÓW PROGNOSTYCZNYCH NEFROPATII BŁONIASTEJ

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

Promotor: Prof. dr hab. n. med. Agnieszka Perkowska-Ptasińska

Katedra i Zakład Patomorfologii
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2023 r.

Streszczenie

Wstęp

Nefropatia błoniasta (MN) jest jedną z najczęstszych, obok ogniskowego segmentalnego twardnienia kłębuszków, przyczyn białkomoczu nerczycowego u osób dorosłych. Występuje na całym świecie, u przedstawicieli wszystkich ras i grup wiekowych, szczytem zachorowań osiągając u osób w przedziale 55 a 64 rż. Istotą MN jest przebudowa błony podstawnej kapilar kłębuszkowych (GBM) wywołana obecnością złogów kompleksów immunologicznych na jej zewnętrznym obrysie. Podstawę rozpoznania stanowi badanie histopatologiczne kory nerki. Materiał do badania uzyskuje się najczęściej techniką biopsji gruboigłowej. Podstawą rozpoznania jest wykazanie technikami immunomorfologicznymi obecności złogów IgG i lekkich łańcuchów wzdłuż okonturowania kapilar kłębuszkowych. Badanie ultrastrukturalne (w mikroskopii elektronowej), umożliwia precyzyjne określenie lokalizacji i struktury złogów. Obraz w mikroskopii świetlnej jest pomocny w określeniu okresu zaawansowania zmian kłębuszkowych, pozwala ponadto na wykrycie wtórnego twardnienia kłębuszków i zmian śródmiąższowo-cewkowych.

Etiopatogeneza MN jest zróżnicowana, a niekiedy także złożona. Przez dekady dominował pogląd, iż w większości przypadków (70-80%), MN jest przejawem miejscowej reakcji autoimmunologicznej (tzw. pierwotna MN). W pozostałych 20-30% MN stanowić miała wyłącznie emanację systemowej choroby autoimmunologicznej, rozwijać się wtórnie do infekcji, chorób nowotworowych lub w przebiegu reakcji toksyczności leków (tzw. wtórna MN). Coraz częściej w MN dokumentowane jest współwystępowanie w złogach immunologicznych antygenów pozanerkowych z tymi występującymi lokalnie, w podocytach. Wskazuje to, iż tradycyjny podział na pierwotną i wtórną MN powinien być zarzucony, a rozpoznanie winno zawierać informacje o antygenach zidentyfikowanych w błonowych złogach kompleksów immunologicznych.

W 2009 roku odkryto, iż u około 75% pacjentów z MN zewnątrzłonowe kompleksy immunologiczne zawierają glikoproteinę, receptor dla fosfolipazy A₂ (PLA₂R, ang. *phospholipase A₂ receptor*), a we krwi chorych stwierdza się skierowane przeciwko temu białku przeciwciała (anty-PLA₂R). W fizjologii, PLA₂R występuje w cytoplazmie podocytów,

W przebiegu MN prawdopodobnie dochodzi do przesunięcia antygeny występującego naturalnie w podocytach do przestrzeni podnabłonkowej, gdzie formują się kompleksy immunologiczne. Dzięki opracowaniu diagnostycznych, komercyjnie dostępnych przeciwciał, możliwe stało się rutynowe oznaczanie w biopsjach nerek z MN obecności PLA₂R w złogach kłębuszkowych. Jednocześnie dostępne stały się testy umożliwiające wykrywanie i monitorowanie obecności przeciwciał anti-PLA₂R we krwi pacjentów. W ostatnich 10 latach, dzięki zastosowaniu laserowej mikrodyssekcji i spektrometrii mas, w kompleksach zewnątrzłonowych u chorych z MN zidentyfikowano kolejne antygeny: białko 7A zawierające domenę trombospondyny typu 1 (THSD7A - *thrombospondin type 1 domain containing protein 7A*), semaforinę typu 3B (SEMA3B - *semaphorin 3B*), egzostozynę 1 i 2 (EXT1/EXT2 - *exostosin 1 and 2*), cząsteczkę adhezyjną komórek nerwowych 1 (NCAM1- *neural cell adhesion molecule 1*), neuronalne białko 1 podobne do naskórkowego czynnika wzrostu (NELL1 - *neural epidermal growth factor-like 1 protein*), protokadherynę 7 (PCDH7 - *protocadherin 7*), proteaza serynową HTRA 1 (*high-temperature requirement A serine peptidase 1*) i netrynę G1 (NTNG1- *netrin-G1*).

Tradycyjnie, rokowanie u chorych z MN opisuje reguła trzech jednych trzecich: około 30% pacjentów uzyskuje samoistną remisję, u 30% utrzymuje się przewlekłe białkomocz, a u reszty czynność nerek stopniowo się pogarsza, aż do stadium SNN. Przez lata podejmowano próby identyfikacji czynników determinujących przebieg choroby, tak by możliwe było ograniczenie stosowania terapii immunosupresyjnej do pacjentów obciążonych istotnym ryzykiem postępującej utraty czynności nerek. Jak dotąd, jedynym pewnym czynnikiem rokowniczym u chorych z MN pozostaje białkomocz – doskonale rokowanie mają ci, u których (samoistnie, lub pod wpływem terapii) dochodzi do całkowitego ustąpienia białkomoczu. W przypadku MN związanego z obecnością antygeny PLA₂R w złogach kłębuszkowych pomocne w ocenie skuteczności terapii i rokowania jest monitorowanie krążących przeciwciał anti-PLA₂R – ich utrzymywanie się we krwi pacjentów jest niekorzystne rokowniczo. Niektórzy autorzy wskazują ponadto, iż niekorzystny wpływ na rokowanie wywiera także współistnienie z glomerulopatią błoniastą dwóch rodzajów zmian mikroskopowych: ogniskowego segmentalnego twardnienia kłębuszków oraz włóknienia zrębu powiązanego z zanikiem cewek.

W nerce przeszczepionej MN jest rzadkim zjawiskiem (około 1-5% przeszczepów). Pojawia się jako wyraz nawrotu choroby, która doprowadziła do schyłkowej niewydolności nerek własnych biorcy lub jako proces rozwijający się *de novo* u osób, które straciły czynność własnych nerek z innych przyczyn. Część badaczy postuluje, że MN rozwijająca się *de novo* po transplantacji ma związek z odrzucaniem zależnym od przeciwciał.

Założenia i cele pracy

Ze względu na złożoną etiopatogenezę MN, dotychczasowe poglądy dotyczące czynników prognostycznych w MN wymagają weryfikacji i pogłębienia, szczególnie w zakresie parametrów immunomorfologicznych. Porównanie zmiennych opisujących MN z nerkach własnych i przeszczepionych, a także analiza wybranych cech MN na tle innych patologii kłębuszka mogą przyczynić się do lepszego zrozumienia patogenezы MN i wskazać nowe ścieżki diagnostyczno-prognostyczne. Za cele tej pracy obrano: (1) porównanie obrazu klinicznego, morfologicznego i immunomorfologicznego MN w nerce własnej i przeszczepionej oraz (2) na tle innych patologii, (3) określenie związku między wybranymi parametrami u pacjentów z MN, (4) analizę wpływu FSGS na obraz kliniczny, histopatologiczny i immunomorfologiczny MN i wreszcie (5) ocenę wartości prognostycznej wybranych parametrów klinicznych, histopatologicznych i immunomorfologicznych w przebiegu MN.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły bloczki parafinowe zawierające fragmenty tkanki nerkowej pobrane metodą biopsji gruboigłowej w latach 1999-2023. Przedmiotem analizy były także wybrane dane kliniczne ze skierowań oraz informacje uzyskane w dalszej obserwacji z ośrodków sprawujących opiekę nefrologiczną lub transplantacyjną nad pacjentami, od których pochodziły badane bioptaty. Do badania zakwalifikowano łącznie 201 przypadków, które podzielono na cztery grupy: 87 przypadków MN w nerce własnej (grupa W), 54 przypadki innych patologii kłębuszka w nerce własnej (grupa K), 32 przypadki MN w nerce przeszczepionej (grupa P) oraz 28 przypadków patologii innej niż MN w nerce przeszczepionej (grupa KP). Wśród pacjentów objętych badaniem były 84 kobiety oraz 117

mężczyzn, z medianą wieku wynoszącą 52 lata. W dalszej obserwacji po biopsji (FU – follow up) pod opieką w tym samym ośrodku nefrologicznym/transplantacyjnym pozostały 73 osoby z grupy W, 30 osób z grupy K, 12 osób z grupy P oraz jednej osoby z grupy KP. W grupie W, Średni czas obserwacji wyniósł 63 miesiące (SD ± 40) w grupie W, 49 miesięcy (SD ± 24) w grupie K, 102 miesiące (SD ± 58) w grupie P oraz 12 miesięcy u pacjenta z grupy KP.

Analizowane parametry podzielono na 4 grupy: kliniczne, laboratoryjne, histopatologiczne oraz immunomorfologiczne. Za istotne z perspektywy realizacji celów badania uznano informacje kliniczne dotyczące występowania u analizowanych chorych schorzeń infekcyjnych, nowotworowych i autoimmunologicznych. W badaniu uwzględniono także fakt przewlekłego przyjmowania przez niektórych pacjentów leków immunosupresyjnych. Wśród parametrów laboratoryjnych analizą objęto: wielkość białkomoczu dobowego, występowanie cech zespołu nerczycowego, stężenie kreatyniny we krwi, szacunkową wielkość filtracji kłębuszkowej oraz stadium PChN. eGFR wyliczono według wzoru CKD-EPI.

Część parametrów histopatologicznych oraz immunomorfologicznych pozyskano z raportów histopatologicznych (występowanie FSGS, IFTA, okres zaawansowania MN wg Ehrenreicha i Churga oraz obecność IgG, C3, C1q, C4d w błonowych złogach kłębuszkowych). Pozostałe oceniono na podstawie dostępnych preparatów mikroskopowych (odsetek kłębuszków stwardniałych/niestwardniałych), a także wykonano dodatkowe barwienia metodą IHC (PLA₂R, IgG4, WT1, CD68). W badaniu nie analizowano uzyskanej intensywności reakcji barwnej w badaniach IHC a jedynie obecność złogów (ocena w skali 0/1). W przypadku PLA₂R odniesiono się do obecności reakcji barwnej w każdej z 2 lokalizacji kłębuszkowych: błonowej i podocytarnej. W przypadku C3 i C1q wyszczególniono dwie lokalizacje: wzdłuż okonturowania kapilar oraz w mezangium. W przypadku C4d, poza lokalizacją kłębuszkową, oceniano także obecność złogów w kapilarach okołocewkowych. Liczba komórek CD68(+) we wszystkich widocznych w preparacie kłębuszkach była podstawą do wyliczenia kłębuszkowego współczynnika makrofagalnego (KWM). Pełna nazwa i skrót w nawiasie, który określał średnią liczbę makrofagów przypadających na 1 kłębuszek. Analogicznie, liczba komórek WT1 stanowiła podstawę wyliczenia kłębuszkowego

współczynnika WT1, określającego średnią liczbę nieuszkodzonych podocytów przypadających na 1 kłębuszek. Do celów statystycznych w części parametrów ciągłych (białkomocz, KWM) wprowadzono dodatkowo podział na kategorie.

Analizy statystyczne przeprowadzono za pomocą testu t Studenta lub t Welcha dla zmiennych z rozkładem normalnym, bądź Mann-Whitney U dla zmiennych z rozkładem innym niż normalny, testu Levene'a, testu Chi-kwadrat lub testu Fishera, analizy korelacji Spearmana, analizy przeżyć dla punktu końcowego zdefiniowanego jako wystąpienie SNN, testu log-rank, testu Wilcozona oraz testu ANOVA. Dodatkowo obliczono ryzyko względne wystąpienia schyłkowej niewydolności nerek w obserwacji pięcioletniej. Zmianę w eGFR podsumowano za pomocą średniej różnicy z 95% przedziałem ufności. Braki danych usuwano parami, tj. nie stosowano imputacji. W testowaniu hipotez, za istotne statystycznie uznawano dwustronne wartości współczynnika $p < 0,05$.

Wyniki

Grupa pacjentów z MN w nerkach własnych nie różniła się od pacjentów z innymi chorobami nerek (K) pod względem parametrów demograficznych i klinicznych. Pacjenci z grupy W charakteryzowali się istotnie wyższym białkomoczem ($p < 0,001$), z towarzyszącymi bardziej nasilonymi elementami zespołu nerczycowego ($p < 0,001$) oraz istotnie lepszą czynnością filtracyjną nerek ($p < 0,001$). W grupie W rzadziej występował krwimocz mikro- i/lb makroskopowy ($p = 0,018$) oraz przewlekłe zmiany o charakterze FSGS ($p < 0,001$), IFTA ($p < 0,001$) i twardnienie kłębuszków ($p < 0,001$). Badania immunohistochemiczne wykazały istotnie częstsze występowanie PLA₂R ($p < 0,001$), IgG ($p < 0,001$) oraz IgG4 ($p = 0,001$) w kłębuszkach pacjentów z grupy W. Współczynniki KWM oraz KWWT1 były istotnie niższe ($p < 0,001$ i $p = 0,005$) w grupie W. W bioptatach nerek własnych z MN istotnie częściej występowały złogi C1q wzdłuż okonturowania kapilar ($p = 0,002$). Pozostałe parametry immunomorfologiczne nie różniły się pomiędzy grupami. Pod koniec okresu obserwacji nie zanotowano różnic pomiędzy grupami pod względem białkomoczu oraz czynności nerek.

Pacjenci z MN w nerce przeszczepionej (P) istotnie rzadziej przyjmowali GKS niż pacjenci z inną patologią przeszczepu (KP) ($p = 0,012$). W grupie P pacjenci byli istotnie młodsi (39,5 vs 51 lat; $p = 0,017$). Pod względem pozostałych parametrów demograficznych i

klinicznych nie zanotowano istotnych statystycznie różnic między grupami. Pacjenci z grupy charakteryzowali się wyższym dobowym białkomoczem ($p=0,036$) oraz lepszą funkcją nerek ($p<0,001$). Porównywane grupy nie różniły się istotnie pod względem żadnego z ocenianych parametrów morfologicznych. Wykazano odwrotną korelację między czasem od przeszczepienia do chwili wykonania biopsji a odsetkiem niestwardniałych kłębuszków ($p<0,001$). W grupie P stwierdzono istotnie niższe wartości KWM ($p<0,001$) i KWWT1 ($p=0,005$). Pacjenci z MN w graficie charakteryzowali się istotnie częstszym występowaniem złogów IgG ($p<0,001$), IgG4 ($p<0,001$), C4d ($p<0,001$) i C3 ($p=0,012$) wzdłuż okonturowania kapilar kłębuszkowych..

Chorzy z MN po przeszczepieniu nerki (P) byli istotnie młodsi ($p=0,034$) o tych z MN w nerkach własnych (W) oraz częściej chorowali na cukrzycę ($p<0,001$) i NT ($p=0,041$). Odsetek pacjentów przyjmujących przed biopsją nerki GKS ($p<0,001$) lub NSI ($p<0,001$) był istotnie wyższy w grupie W. W badaniach laboratoryjnych pacjenci z grupy P mieli istotnie gorszą funkcję nerek ($p=0,002$) oraz istotnie wyższy białkomocz ($p=0,003$). Wyraźnie zaznaczyła się różnica między grupami W i P w rozległości IFTA ($p=0,022$) oraz odsetka niestwardniałych kłębuszków ($0,006$). Porównywane grupy nie różniły się natomiast istotnie pod względem częstości występowania FSGS ($p=0,096$). W porównaniu z grupą W, w grupie P istotnie rzadziej występowały złogi PLA₂R ($p<0,001$) czy IgG4 ($p=0,007$). U pacjentów po transplantacji również rzadziej wykrywano złogi C1q w mezangium ($p=0,039$) oraz C3 wzdłuż okonturowania kapilar ($p=0,049$). W grupie W niższa była wartość KWWT1 ($p=0,040$). Pod koniec FU funkcja nerek u pacjentów po transplantacji nadal była istotnie gorsza ($p=0,004$).

U pacjentów z grupy W z białkomoczem nerczycowym (BN) istotnie częściej występowało C3 ($p=0,028$) i C1q ($p=0,033$) wzdłuż okonturowania kapilar kłębuszkowych, a także wyższy był KWM ($p=0,016$). Występowanie C3 w lokalizacji kapilarnej ponad 3 krotnie zwiększało ryzyko BN (OR:3,64), podczas gdy wartość KWM ≥ 1 zwiększał to ryzyko ponad 4 krotnie (OR: 4,269). Zaobserwowano, że w momencie biopsji w kolejnych kategoriach nasilenia białkomoczu ($<3,5$ g/24h, 3,5-8,0 g/24h oraz >8 g/24h), mediana eGFR była coraz niższa ($p=0,012$). Pod koniec FU zaobserwowano u pacjentów z MN w nerkach natywnych istotny statystycznie spadek białkomoczu ($p<0,001$) oraz pogorszenie eGFR ($p<0,001$). Osiągnięcie CR wiązało się z istotnie lepszym rokowaniem ($p=0,047$).

Współwystępowanie FSGS z MN wiązało się z gorszą funkcją nerek w momencie biopsji ($p=0,001$), wyższym odsetkiem kłębuszków stwardniałych globalnie ($p<0,001$) oraz większą rozległością IFTA ($p=0,043$). Pod względem pozostałych parametrów laboratoryjnych oraz immunomorfologicznych pacjenci z FSGS nie różnili się od pacjentów bez tego powikłania. Pod koniec FU nie zaobserwowano różnic w białkomoczu i kreatyninemia w zależności od występowania FSGS.

Wśród pacjentów cierpiących na MN w nerkach natywnych z obecnością IgG4 w złogach zauważono wyższą częstość występowania cukrzycy ($p=0,028$) oraz NT ($p=0,030$) oraz istotnie rzadsze stosowanie GKS ($p=0,001$). Parametry laboratoryjne oraz histopatologiczne u pacjentów MN-IgG4(+) nie różniły się od parametrów w podgrupie MN-IgG4(-). Jedyną istotną statystycznie różnicą między tymi podgrupami to wyższa częstość występowania PLA₂R ($p=0,003$) u pacjentów z IgG4 w złogach kłębuszkowych. Zauważono również trend w kierunku częstszego uzyskiwania całkowitej remisji białkomoczu u pacjentów z podgrupy MN-IgG4(-) ($p=0,060$).

Ze względu na zbyt małą liczebność pacjentów z MN w nerce przeszczepionej, nie udało się przeprowadzić oceny czynników prognostycznych wewnątrz tej grupy.

Wnioski

Obrazy kliniczne, histopatologiczne oraz immunomorfologiczne MN w nerce własnej oraz MN w nerce przeszczepionej znacznie się różnią, co może wynikać z odmiennej etiopatogenezy MN powstającej *de novo* po transplantacji oraz wpływu samej procedury transplantacyjnej. U pacjentów z MN w nerkach własnych, wyższy białkomocz, FSGS oraz IFTA wiążą się z gorszą funkcją nerek i stanowią negatywne czynniki prognostyczne. Z kolei uzyskanie remisji białkomoczu u tych pacjentów związane jest z lepszym rokowaniem i stanowi najważniejszy cel terapeutyczny. Liczba makrofagów przypadająca na jeden kłębuszek nerkowy jest skorelowana ze stopniem nasilenia białkomoczu u pacjentów z MN w nerce własnej. Wyraźna reakcja barwna w kierunku PLA₂R występuje zarówno w MN jak i w innych chorobach kłębuszka. Dla MN charakterystyczna jest lokalizacja wzdłuż okonturowania kapilar, podczas gdy w innych glomerulopatiach PLA₂R może występować w podocytach.