

STRESZCZENIE

Pierwotne kłębuszkowe zapalenia nerek są częstą przyczyną schyłkowej niewydolności nerek i drugim, po nefropatii cukrzycowej, powodem podejmowania leczenia nerkozastępczego w Polsce. Etiopatogeneza glomerulopatii pierwotnych jest przedmiotem intensywnych badań. W ostatnich latach dzięki osiągnięciom biologii molekularnej i genetyki poszerzyły się możliwości badań nad nowymi cząstkami, które mogłyby wejść do panelu wskaźników typu i aktywności glomerulopatii. W kręgu zainteresowań znajduje się obecnie wiele cząstek, w tym enzymy - metaloproteinazy MMP-2 i MMP-9, ich inhibitory TIMP-2 i TIMP-1 a także białka CD80 i suPAR- rozpuszczalny receptor urokinazowego aktywatora plazminogenu.

MMP-2 i MMP-9 oraz ich inhibitory TIMP-2 i TIMP-1 odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu równowagi między procesami syntezy i degradacji macierzy pozakomórkowej kłębuszka nerkowego. Nadmierny rozplam mezangium wynika z zaburzenia równowagi pomiędzy aktywnością metaloproteinaz i ich inhibitorów tkankowych, co doprowadza do szkliwienia kłębuszków nerkowych i włóknienia śródmiąższu. MMP-9 przypisywana jest szczególnie rola w przybytku macierzy pozakomórkowej, natomiast znaczenie MMP-2 w patogenezie glomerulopatii polega na uszkodzeniu błony podstawnej kłębuszka z uwagi na duże powinowactwo do jej składowych. Inhibitory metaloproteinaz mają zdolność hamowania ich działania, przy czym TIMP-2 wykazuje szczególne powinowactwo do MMP-2 a TIMP-1 do MMP-9.

SuPAR jest białkiem powstałym wskutek degradacji receptora uPAR w miejscu zakotwiczenia do błony podstawnej podocyta. U zdrowych ludzi cząstka ta występuje w niewielkim stężeniu w osoczu i bierze udział w przyleganiu i migracji komórek. SuPAR jest potencjalnym kandydatem na osoczowy czynnik zwiększający przepuszczalność błony filtracyjnej kłębuszka nerkowego w glomerulopatii FSGS. Osocze pacjentów z nawrotem zespołu nerczycowego indukuje rozwój białkomoczu u szczurów oraz podwyższa wskaźnik osoczowej przepuszczalności dla albumin w ludzkich kłębuszkach nerkowych. U niektórych chorych z wysokimi stężeniami suPAR dochodzi do nawrotu FSGS w przeszczepionej nerce, czemu można zapobiec usuwając białko przy pomocy zabiegu plazmaferezy lub immunoabsorpcji. Podwyższone stężenie suPAR obserwowano u pacjentów z chorobami infekcyjnymi, co wskazuje na konieczność oceny tego wskaźnika w kontekście stężeń markerów zapalnych.

CD80 jest przezbłonowym białkiem obecnym na powierzchni wielu komórek, między innymi na limfocytach B i komórkach prezentujących antygen (*ang. antigen presenting cells*;

APC). Podocyty są zdolne do nabywania właściwości komórek APC pod wpływem stymulacji fragmentami bakteryjnymi, wirusami i limfokinami. Nadmierna aktywacja i utrzymywanie się ekspresji CD80 na podocytach może leżeć u podłoża białkomoczu w nefropatii zmian minimalnych („hipoteza dwóch uderzeń”).

W pracy analizowane były stężenia MMP-2, MMP-9, ich inhibitorów TIMP-2 i TIMP-1 a także białek CD80 i suPAR w grupach nefropatii o wspólnym mechanizmie patogenetycznym, a także w poszczególnych typach KZN. Określano zależność stężeń badanych cząstek od aktywności choroby oraz stopnia ubytku funkcji filtracyjnej nerek.

Badaniem objęto 120 pacjentów w wieku od 1 do 86 lat (średnia wieku $39,4 \pm 19,1$ lat) z rozpoznaniem glomerulopatii pierwotnej. U 100 chorych rozpoznanie kłębuszkowego zapalenia nerek potwierdzono badaniem histopatologicznym, u 20 biopsja nerki nie była wykonywana z powodu przeciwwskazań lub braku zgody pacjenta. Do grupy kontrolnej zakwalifikowano 29 zdrowych ochotników (średnia wieku $41,4 \pm 10,7$ lat). Pobrano łącznie 183 próbki krwi i 183 próbki moczu u 149 osób.

W pracy zastosowano dwa podziały grupy badanej. Pierwszy oparto na rozpoznaniach histopatologicznych kłębuszkowych zapaleń nerek. Grupę podocytopatii, ze względu na wspólny mechanizm patogenetyczny uszkodzenia podocyta, utworzyły - FSGS, nefropatia zmian minimalnych oraz błoniaste kłębuszkowe zapalenie nerek. Liczebność grupy wynosiła 62 osoby. Cechą wspólną drugiej grupy, liczącej 38 pacjentów, był przybytek macierzy mezangium pozakomórkowego. Zaliczono do niej postaci błoniasto-rozplemowe (mezangialno-włośniczkowe) oraz mezangialne rozplemowe KZN, zarówno IgA jak i non-IgA. Odrębną, trzecią grupę, stanowiło 20 pacjentów z rozpoznaniem kłębuszkowego zapalenia nerek na podstawie cech klinicznych.

Drugi z podziałów opierał się na wyodrębnieniu grupy chorych wykazujących cechy klinicznej aktywności choroby oraz grupy bez cech aktywności. Kryteria stanowiły wielkość białkomoczu dobowego wyliczanego za pomocą współczynnika Ginsberga oraz obecność minimum sześciu erytrocytów wyługowanych i przynajmniej jednego wałeczka patologicznego (tj. ziarnistego, woskowego, z komórek nabłonka lub erytrocytarnego) w osadzie moczu. Na podstawie powyższych kryteriów 57 pacjentów zaklasyfikowano do grupy aktywnej i w tej grupie uzyskano łącznie 79 pobrań krwi i moczu. W grupie nieaktywnej było 63 chorych, u których wykonano 75 pobrań.

Za pomocą standardowych testów diagnostycznych oznaczono kliniczne wskaźniki aktywności choroby, takie jak morfologia, funkcja filtracyjna nerek, stężenie białka całkowitego, albumin, lipidów, wapnia i fosforu w surowicy, stężenie białka i kreatyniny w

moczu oraz obecność aktywnego osadu moczu. Pomiary stężenia MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, CD80 i suPAR wykonano w surowicy i moczu osób grupy badanej i kontrolnej przy pomocy komercyjnych testów immunoenzymatycznych ELISA, zgodnie z instrukcjami producentów. Testy opierały się na metodzie „sandwich” ELISA, czyli teście podwójnego wiązania, w którym antygen zostaje związany pomiędzy dwiema "warstwami" przeciwciał, a następnie zidentyfikowany dzięki reakcji barwnej. Natężenie tej reakcji badano przy pomocy spektrofotometru przy długości fali 450 nm.

Najwyższe stężenia MMP-2, TIMP-2 i TIMP-1 w surowicy i moczu obserwowano w grupie aktywnej choroby, w porównaniu do grupy nieaktywnej (MMP-2 surowica: $p=0,001$; MMP-2 moczu: $p=0,001$; TIMP-2 surowica: $p=0,001$; TIMP-2 moczu: $p=0,02$; TIMP-1 surowica: $p=0,001$; TIMP-1 moczu: $p=0,001$). Wykazano istotne zależności pomiędzy stężeniem MMP-2 i TIMP-2 w surowicy i moczu a wykładnikami zespołu nerczycowego - dodatnie ze stężeniem cholesterolu całkowitego i trójglicerydów oraz z białkomoczem dobowym i ujemne ze stężeniami białka całkowitego i albumin. Ponadto stwierdzono istotne korelacje stężeń MMP-2 i TIMP-2 z wykładnikami przewlekłej choroby nerek - dodatnie ze stężeniem kreatyniny i fosforu oraz ujemne z eGFR i stężeniem wapnia.

Wykazano istotnie wyższe stężenia cząstki suPAR w surowicy i moczu w grupie aktywnej w porównaniu z grupą nieaktywną (suPAR surowica: $p=0,001$; suPAR moczu: $p=0,023$). Ponadto, po uwzględnieniu grup rozpoznanych histopatologicznych, najwyższe stężenie suPAR w surowicy stwierdzono w grupie aktywnych podocytopatii, istotnie wyższe w porównaniu z grupą podocytopatii nieaktywnej oraz grupą mezangialną aktywną i nieaktywną (suPAR surowica: $p=0,002$, $p=0,03$ i $p=0,04$). W surowicy i moczu stwierdzono istotne zależności między stężeniem suPAR a wskaźnikami aktywności zespołu nerczycowego - ujemne ze stężeniem białka całkowitego i albumin oraz dodatnie ze stężeniem cholesterolu całkowitego, trójglicerydów i białkomoczem dobowym. Zaobserwowano silne korelacje pomiędzy stężeniem suPAR a wykładnikami przewlekłej choroby nerek w surowicy - dodatnie ze stężeniem kreatyniny i fosforu a ujemne z eGFR i stężeniem wapnia.

W surowicy stwierdzono istotnie wyższe stężenia cząstki CD80 w grupie nieaktywnej w porównaniu z grupą aktywną (CD80 surowica: $p=0,014$), natomiast w moczu wykazano wyższe stężenia CD80 w grupie aktywnej w porównaniu z nieaktywną (CD80 moczu: $p=0,001$). Ponadto zaobserwowano statystycznie istotne korelacje pomiędzy stężeniem CD80 a wskaźnikami aktywności nefropatii - w surowicy wykazano dodatnie korelacje ze stężeniem

białka całkowitego i albumin i ujemne ze stężeniem cholesterolu całkowitego i trójglicerydów oraz białkomoczem dobowym, w moczu stwierdzono odwrotne zależności niż w surowicy.

Na podstawie wyników badania oraz przeprowadzonej analizy statystycznej sformułowano następujące wnioski:

1. Stężenia MMP-2 i TIMP-2 mogą być uznane jako potencjalne wskaźniki aktywności glomerulopatii.
2. Stężenia MMP-2 i TIMP-2 ulegają zwiększeniu wraz z narastaniem zaawansowania przewlekłej choroby nerek.
3. Najwyższe stężenia suPAR w aktywnej fazie glomerulopatii, w patogenezie których podstawową rolę odgrywa pierwotne uszkodzenie podocyta, wskazuje na jego rolę jako wskaźnika w ocenie aktywności choroby.
4. Stężenie suPAR w surowicy odzwierciedla aktualny stopień zaawansowania PChN.
5. Stężenia CD80 w surowicy i moczu mogą być wskaźnikiem aktywności glomerulopatii.
6. Stężenia metaloproteinaz, ich inhibitorów, a także stężenia suPAR i CD80 nie różnicują typu kłębuszkowego zapalenia nerek.