
**RELATIONSHIP BETWEEN MEMBRANOUS NEPHROPATHY AND THE
ANTIBODY AGAINST THE RECEPTOR OF PHOSPHOLIPASE A2**

Yovko Ronchev

Clinical laboratory, University Hospital "Kastella" Plovdiv, Faculty of Medicine, Medical University-
Plovdiv, yovkoronchev@abv.bg

Dora Terzieva

Department of clinical laboratory, Faculty of Pharmacy, Medical University-Plovdiv,
Republic of Bulgaria

Summary: Membranous nephropathy is one of the most common causes of the nephrotic syndrome in adults. It can occur with involvement of renal glomeruli (glomerulitis) and/or interstitium (nephritis). In the majority of cases, membranous nephropathy is a primary form of the disease in which the etiology of the disease is not yet fully elucidated. Other cases are associated with autoimmune, infectious or malignant diseases, drug/toxin-induced conditions, etc., and are referred to as secondary membranous nephropathy. For secondary forms of the disease, the diagnosis is based on data from specific analyzes.

An important feature of membranous nephropathy is the deposition of immune complexes in the submucosal space of the glomerular basement membrane. This results in thickening of the glomerular basement membrane, which is well visible in light microscopy. The structure of immune complexes is complicated and includes antibodies of the IgG class, widely unknown antigens and a membrane attack complex composed of C5b-9 complement components. Subepithelial immune deposits and complement activation are responsible for the functional damage of the glomerular capillary shaft. Due to the formation of the immune deposits, the permeability of the capillary loops is altered, thus leading to proteinuria and frequently to a nephrotic syndrome. This article summarizes the accumulated experimental data that contributed to the identification of an antigen responsible for the development of membranous nephropathy. Using immunoprecipitation techniques, he was identified as glycoprotein M, later called megalin. It belongs to the LDL receptor family and is expressed in a number of epithelial cells, including those of the renal glomeruli, proximal tubules and the like. At present, there are no definite data to confirm the role of megalin in the pathogenesis of membranous nephropathy.

Current clinical studies indicate the significance of circulating autoantibodies directed against the subtype phospholipase A2 receptor in the pathogenesis of primary membrane nephropathy. In situ, autoantibodies are involved in the formation of immune complexes that are believed to increase the permeability of the glomerular protein filter. There is evidence that the concentration of these autoantibodies correlates with the degree of proteinuria in affected patients. Therefore, the determination of circulating antibodies to phospholipase A2 receptor 1 would be useful to elucidate the etiopathogenesis of primary membranous nephropathy. Further research into pathogenic mechanisms and other disease markers can pave the way for improved patient care.

Keywords: membranous nephropathy, megalin, phospholipase A2 receptor, antibodies, nephrotic syndrome

**ВЗАИМОВРЪЗКА МЕЖДУ МЕМБРАНОЗНАТА НЕФРОПАТИЯ И АНТИТЕЛАТА СРЕЩУ
РЕЦЕПТОРА НА ФОСФОЛИПАЗА A2**

Йовко Рончев

Клинична лаборатория, УМБАЛ „Каспела“ Пловдив, Медицински факултет, Медицински
университет-Пловдив, yovkoronchev@abv.bg

Дора Терзиева

Катедра Клинична лаборатория, Фармацевтичен факултет, Медицински университет-Пловдив,
Република България

Резюме: Мембранозната нефропатия е една от най-честите причини за нефротичен синдром при възрастни лица. Тя може да протече със засягане на бъбречните гломерули (гломерулити) и/или на интерстициума (нефрит). При по-голямата част от случаите с мембранозна нефропатия се касае за първична форма на болестта, при която етиологията на заболяването все още не е докрай изяснена. Останалите случаи се асоциират с автоимунни, инфекциозни или злокачествени заболявания, лекарствено/токсин-индуцирани състояния и др., и се означават като вторична мембранозна нефропатия. При вторичните форми на болестта диагнозата се поставя въз основа на данните от специфични анализи. Важна характеристика на мембранозната нефропатия е отлагането на имунни комплекси в субепителното пространство на гломерулната базална мембрана. Това има за резултат задебеляване на базалната мембрана, което се вижда добре на светлинна микроскопия. Структурата на имунните

комплекси е сложна и включва антитела от клас IgG, недостатъчно изученни антигени и мембрано атакуващ комплекс, изграден от C5b – 9 компоненти на комплемента. Субепителните имунни депозити и комплементната активация са отговорни за функционалните увреди на гломерулния капилярен вал. Нарушава се капилярния пермебилитет, което води до протеинурия и често до нефротичен синдром.

В статията са обобщени натрупаните експериментални данни, които са допринесли за идентифицирането на антиген, отговорен за развитието на мембранозната нефропатия. С помощта на имунопреципитационни техники той бил определен като гликопротеин M, наречен по-късно мегалин. Той принадлежи към LDL рецепторната фамилия и се експресира в редица епителни клетки, включително тези на бъбречните гломерули, проксималните тубули и др. Към настоящия момент липсват категорични данни, които да потвърждават ролята на мегалина в патогенезата на мембранозната нефропатия.

Специално място е отделено на съвременните клинични проучвания, които показват, че в патогенезата на първичната мембранозна нефропатия значение имат циркулиращи автоантитела, насочени срещу подоцитния рецептор 1 на фосфолипаза A2. *In situ*, автоантителата участват в образуването на имунните комплекси, за които се допуска, че повишават пропускливостта на гломерулния филтър за белтъците. Има данни, че концентрацията на тези автоантитела корелира със степента на протеинурията при засегнатите пациенти. За това определянето на циркулиращи антитела срещу рецептор 1 на фосфолипаза A2 би било полезно с оглед изясняване етиопатогенезата на първичната мембранозна нефропатия.

Ключови думи: мембранозна нефропатия, мегалин, рецептор на фосфолипаза A2, антитела, нефротичен синдром

ВЪВЕДЕНИЕ

Мембранозната нефропатия (МН) е една от най-честите причини за нефрозен синдром при възрастни лица [1, 2, 3]. Тя може да протече със засягане на бъбречните гломерули (гломерулит) и/или на интерстициума (нефрит) [4]. Смята се, че в около 60-80% от случаите се касае за първична форма (идиопатична мембранозна нефропатия, ИМН), при която етиологията на заболяването все още не е изяснена [5]. Останалите 20-30% от случаите се асоциират с различни автоимунни, инфекциозни или злокачествени заболявания, лекарствено/токсин-индуцирани състояния и др. и се означават като вторична мембранозна нефропатия. При вторичните форми на болеста диагнозата се поставя въз основа на данните от специфични анализи.

Важна характеристика на МН е отлагането на имунни комплекси в субепителното пространство на гломерулната базална мембрана [4]. Това има за резултат задебеляване на базалната мембрана, което се вижда добре на светлинна микроскопия [5]. Структурата на имунните комплекси е сложна и включва антитела от клас IgG, недостатъчно изученни антигени и мембрано атакуващ комплекс, изграден от C5b-9 компоненти на комплемента. С напредването на процеса се засяга и гломерулната капилярна стена. Субепителните имунни депозити и комплементната активация са отговорни за функционалните увреди на филтрационната бариера на гломерула.

ИЗЛОЖЕНИЕ

За пръв път понятието „мембранозен гломерулонефрит“ е използвано в научната литература през 1946 год. от E. Bell [4]. Тогава заболяването не е било обособено като самостоятелна нозологична единица, а е причислявано към група бъбречни заболявания, наречени болест на Bright's Тип II, която включва още мембранопродиферативен гломерулонефрит, болест на минималните изменения и фокална/сегментна гломерулосклероза. Като самостоятелно заболяване МН е описана през 1957 год. от D. Jones [6]. С помощта на специална оцветителна техника (periodic acid-Schiff-silver methenamine) приложена върху бъбречен материал от пациенти с нефротичен гломерулонефрит (n=20), е установено уплътняване на базално мембранните структури на гломерулната стена. По това време Mellors и сътр. [7] установяват, че уплътнението е предизвикано от субепително разположени електронно-плътни отлагания, които съдържат IgG. Тези важни характеристики на отлаганията се приемат и до сега като отличителен хистологичен белег на МН.

Данните от редица експериментални проучвания, проведени в следващите години са допринесли за идентифицирането на антиген, отговорен за развитието на МН. През 1959 г. W. Neumann и сътр. [8] имунизират плъхове с екстракт от бъбречна тъкан (активен нефрит на Neumann) и допускат, че субепителните отлагания са циркулиращи имунни комплекси изградени от антигени и кореспондиращите им антитела, прикрепени към гломерулите. Две десетилетия по-късно Van Damme и сътр. [9] и Courser и сътр. [10] независимо един от друг изказват хипотезата за ролята на *in situ* образуваните имунни комплекси в патогенезата на МН. Според тази хипотеза, при свързването на антигена с антитялото се формират имунни комплекси, които вероятно се отлагат в гломерулите. Антигенът, отговорен за нефрита на Neumann бил идентифициран през 1980 г. [11, 12]. С помощта на

имунопреципитационни техники той бил определен като гликопротеин М (gp330). gp330 вече е изолиран в чист вид (гелна или афинитетна хроматография), което дава възможност да бъде прилаган като имуноген. По-късно Assman и сътр. [13, 14] описват в бъбреци на плъх два вероятни антигена – gp330 и антиген с мол. маса 90 kd. Засилените проучванията върху структурата на gp330 показали, че той е мултилиганден епителиален ендоцитен рецептор и главен таргетен антиген при нефрита на Neumann, който бил наречен мегалин [15, 16]. Мегалинът принадлежи към семейството на LDL рецепторната фамилия [17]. Експресира се в обвитите с кларитин вдлъбнатини по повърхността на редица епителни клетки, включително тези на бъбречните гломерули, проксималните тубули и др. Локализира се в ямките по четковидната граница на проксималните тубули, както и в основата и страните на подоцитните крачета [18,19,20]. Има данни, че в ендоплазматичния ретикулум мегалинът се свързва с протеин наречен рецептор асоцииран протеин (RAP), което подпомага прегъването на мегалиновата молекула и транспорта ѝ до клетъчната повърхност [21]. Двойката мегалин-RAP се означава като антигенен комплекс на нефрита на Neumann. Yamazaki и сътр. [17] описват четири предполагаеми лиганд свързващи домена в дългата екстрацелуларна част на мегалина. Смята се, че домените съдържат епитопи, които могат да свържат патогенни автоантитела и така да участват в патогенезата на заболяването. Допуска се, че клиничната изява на заболяването се предизвиква от специфичен епитоп в първия лиганд-свързващ домен на мегалина, който е с молекулно тегло 60 kDa [15,16,17]. Според Shah и сътр. [22] мегалинът е комплексен имунологичен таргет с четири лиганд-свързващи домена, идентифицирани с имуоблот техника, а идентичността на полипептидните вериги е потвърдена с мас/мас спектрометрия.

Към настоящия момент липсват категорични данни, които потвърждават участието на мегалина в патогенезата на МН при хора. Вероятно роля в патогенезата на МН имат трансмембрано свързани протеини, експресирани по повърхността на подоцитите [23]. В продължение на много години търсенето на прицелен антиген при МН е било неуспешно, тъй като е било невъзможно да се идентифицират антиподоцитни антитела в кръвта, подоцитен антиген в имунни отлагания или специфична реактивност в елуати от бъбреци на пациенти с МН [2]. Ниските титри на търсените антитела и нуждата от високо чувствителни методи за откриването им е причина за това. Смята се, че два мембранни протеина, неутралната ендопептидаза и рецептора на М-тип фосфолипаза А2, разположени върху базалната повърхност на подоцитите, играят роля на антигени при ИМН [5]. Принос за изясняване патогенезата на ИМН има проучването на Beck и сътр. [24], според което 70-80% от пациентите с ИМН имат циркулиращи автоантитела, насочени срещу подоцитния рецептор 1 на фосфолипаза А2 (PLA2R1), а концентрацията на автоантителата корелира със степента на протеинурията. *In situ*, тези автоантитела участват в образуването на имунните комплекси, за които се допуска, че повишават пропускливостта на гломерулния филтър за белтъците [5]. В тази връзка определянето на циркулиращи антитела срещу рецептор 1 на фосфолипаза А2 е важно с оглед изясняване етиологията на ИМН [24]. При останалите около 15% от пациентите с ИМН не са намерени антитела срещу PLA2R, а в 3-5% от тях са установени антитела срещу други антигени [3, 25].

Според Salant [26] в патогенезата на ИМН вероятно значение имат три фактора: наличие на HLA-DQA1 алели, важни за податливостта към автоимунни заболявания; полиморфизъм на PLA2R, който става таргет за автоантителата или синтез на хипоалактозилиран IgG4 анти-PLA2R1, свързан с активацията на комплемента. Вече се знае, че рецепторът на фосфолипаза А2 е трансмембранен гликопротеин с мол. маса около 180kD, който принадлежи към маноза рецепторната фамилия [5]. Изграден е от голям гликозилиран екстрацелуларен участък с десет домена, единичен трансмембранен участък и къса цитоплазматична опашка. Според някои проучвания, за развитието на ИМН значение има полиморфизъм в някои от домените на екстрацелуларния участък [5]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данните от редица клинични проучвания подкрепят значението на циркулиращите автоантитела, насочени срещу подоцитния рецептор 1 на фосфолипаза А2 в етиопатогенезата на първичната мембранозна нефропатия. Намерената корелация между степента на протеинурията при засегнатите пациенти и концентрацията на тези автоантитела показва клиничната нужда от количественото им определяне.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Beck L., R. Bonegio, G. Lambeau, D. Beck, D. Powell, T. Cummins, J. Klein and D. Salant, M-Type Phospholipase A2 Receptor as Target Antigen in Idiopathic Membranous Nephropathy, *N Engl J Med*, vol. 361, pp: 11-21, 2009
- [2] Ronco P., H. Debiec, Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges, *Nat Rev Nephrol*, vol 8, pp: 203–13, 2012

- [3] Courser W., Primary membranous nephropathy, *American Society of Nephrology* vol. 12, pp: 983-997, 2017
- [4] Schlumberger W., N. Hornig, S. Lange, Ch. Probst, L. Komorowski, K. Fechner, C. Dähnrich, W. Stöcker, Differential diagnosis of membranous nephropathy with autoantibodies to phospholipase A2 receptor 1, *Autoimmunity Reviews*, vol. 13, pp: 108–113, 2014
- [5] Kao L., V. Lam, M. Waldman, R. Glassock, and Q. Zhu, Identification of the Immunodominant Epitope Region in Phospholipase A2 Receptor-Mediating Autoantibody Binding in Idiopathic Membranous Nephropathy, *J Am Soc Nephrol*, vol. 26, pp: 291–301, 2015
- [6] Jones D., Nephrotic Glomerulonephritis, *American Journal Pathology*, vol. 33, №2, pp: 313-329, 1956
- [7] Mellors RC, L. Ortega, H. Holman, Role of gamma globulins in pathogenesis of renal lesions in systemic lupus erythematosus and chronic membranous glomerulonephritis with an observation on the lupus erythematosus cell reaction, *J Exp Med*, vol. 106, pp: 191–202, 1957
- [8] Heymann W, D. Hackel, S. Harwood, S. Wilson, J. Hunter, Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and rat kidney suspensions, *Proc Soc Exp Biol Med*, vol. 100, pp: 660–4, 1959
- [9] Van Damme B. J., J. Fleuren, W. Bakker, L. Vernier, J. Hoedemaeker, Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens. V. Fixed glomerular antigens in the pathogenesis of heterologous immune complex glomerulonephritis, *Lab. Invest.* vol. 38, pp: 502–510, 1978
- [10] Couser G., R. Steinmuller, M. Stilmant, J. Salant, M. Lowenstein, Experimental glomerulonephritis in the isolated perfused rat kidney, *J. Clin. Invest.*, vol. 62, pp: 1275–1287, 1978
- [11] Kerjaschki D., G. Farquhar, The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol. 79, pp: 5557–5561, 1982
- [12] Kerjaschki, D., G. Farquhar, Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats, *J. Exp. Med.*, vol. 157, pp: 667–686, 1983
- [13] Assmann J., M. Tangelder, P. Lange, M. Tadema, A. Koene, Membranous glomerulonephritis in the mouse, *Kidney Int.*, vol. 24, pp: 303–312, 1983
- [14] Assmann J., Comparison of antigenic targets involved in antibody-mediated membranous glomerulonephritis in the mouse and rat, *Am. J. Pathol.*, vol. 121, pp: 112–122, 1985
- [15] Saito A., Mapping rat megalin: the second cluster of ligand binding repeats contains a 46-amino acid pathogenic epitope involved in the formation of immune deposits in Heymann nephritis, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol. 93, pp: 8601–8605, 1996
- [16] Raychowdhury R., G. Zheng, D. Brown, T. McCluskey, Induction of Heymann nephritis with a gp330/megalin fusion protein, *Am. J. Pathol.*, vol. 148, pp: 1613–1623, 1996
- [17] Yamazaki H., R. Ullrich, M. Exner, A. Saito, R. Orlando, D. Kerjaschki, M. Farquhar, All four putative ligand-binding domains in megalin contain pathogenic epitopes capable of inducing passive Heymann nephritis, *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 9, pp: 1638–1644, 1998
- [18] Kerjaschki D. and M. Farquhar, Immunocytochemical localization of the Heymann nephritis antigen (GP330) in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats, *J. Exp. Med.*, vol. 157, pp: 667–686, 1983
- [19] Kerjaschki D., A. Miettinen, M. G. Farquhar, Initial events in the formation of immune deposits in passive Heymann nephritis. gp330-anti-gp330 immune complexes form in epithelial coated pits and rapidly become attached to the glomerular basement membrane, *J Exp Med*, vol. 166, pp: 109–28, 1987
- [20] Chatelet F., E. Brianti, P. Ronco, J. Roland, P. Verroust, Ultrastructural localization by monoclonal antibodies of brush border antigens expressed by glomeruli I. Renal distribution, *Am J Pathol*, vol. 122, pp: 500–511, 1986
- [21] D. Biemesderfer D., G. Dekan, P. S. Aronson, M. G. Farquhar, Biosynthesis of the gp330/44-kDa Heymann nephritis antigenic complex: assembly takes place in the ER, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 264.6.F1011, 1993
- [22] Shah P., A. Tramontano, P. Makker, Intramolecular epitope spreading in Heymann nephritis, *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 18, pp: 3060–3066, 2007
- [23] Kerjaschki D., Pathomechanisms and molecular basis of membranous glomerulopathy, *Lancet*, vol. 364, pp: 1194–1196, 2004
- [24] Ponticelli C. and R. J. Glassock, Glomerular diseases: Membranous nephropathy – a modern view, *Clin J Am Soc Nephrol*, vol. 9, pp: 609-616, 2014
- [25] Bell E. T., *Renal diseases*, Philadelphia: Lea & Febiger, pp: 434, 1946
- [26] Salant DJ., Genetic variants in membranous nephropathy: Perhaps a perfect storm rather than a straightforward conformeropathy?, *J Am Soc Nephrol*, vol. 24, pp: 525-528, 2013