Role of Annexin V as a Prognostic Factor in Pediatric Patients with Nephrotic Syndrome

Thesis

Submitted for the partial fulfillment of
Master Degree ***in Pediatrics***

By

Amany Farouk Hashem
M.B.,B.Ch.; 2004

Under supervision of

Prof. Dr. Magid Ashraf Abdel-Fattah Ibrahim
Professor of Pediatrics
Faculty of Medicine - Ain Shams University

Dr. Faisal Youssef Mohamed Youssef
Lecturer of Pediatrics
Faculty of Medicine - Ain Shams University

Dr. Rania Salah El-Din Kamel Shahin
Lecturer of Clinical and Chemical Pathology
Faculty of Medicine - Ain Shams University

Faculty of Medicine
Ain Shams University
2011

دور الأنكسين الخامس كعامل تكهني في الأطفال المرضى الذين يعانون من متلازمة الأوذيما الكلوية

توطئة للحصول على درجة الماجستير **في طب الأطفال**

مقدمة من

الطبيبة/أماني فاروق هاشم

بكالوريوس الطب والجراحة ٢٠٠٤

تحت إشراف

أ.د/ماجد أشرف عبد الفتاح إبراهيم

أستاذ طب الأطفال

كلية الطب – جامعة عين شمس

د/فيصل يوسف محمد يوسف

مدرس طب الأطفال

كلية الطب – جامعة عين شمس

د/رانيا صلاح الدين كامل شاهين

مدرس الباثولوجيا الإكلينيكية والكيميائية

كلية الطب – جامعة عين شمس

كليـــــــة الطب

جامعة عين شمس

٢٠١١

الملخص العربي

لقد تمَّ تصميمُ هذهالدراسةِ لتحديدِ دور الأنكسين الخامس كأداةِتشخيصٍ ومتابعةٍ وذلك عن طريقِ قياسِ تركيزه في الدم والبول في الأطفال المرضى بمتلازمة الأوذيما الكلوية سواءً كانوا سُتجيبينَ للعلاج بالكورتيزون أو غير مستجيبينَ .

وقدأجريتُ هذهالدِّراسَةَ في عيادةِ طبِّ الكُلَى بمستشفىالأطفالِ ، جامعة عين شمس علي (٣٦) ستة وثلاثين طفلا، (٢٤) أربعة وعشرون منهم من المرضى بالأوذيما الكلوية والمتابعين بعيادةِ كُلى الأطفال، و(١٢) اثنا عشر طفلامماثلينَ في العُمْرِ والجِنْسِ منالأطفالِ الأصِحَّاءِ كمجموعةٍ ضابطةٍ .

وتمَّ تصنِيفُ الأطفال إلي ثلاث مجموعات:

المجموعةُ الأولى: تضمَّنَت اثنا عَشَرَ طفلاً من الصُابينَ بالأوذيما الكُلَوِيَّةِ والمستجيبينَ للعِلاجِ بالكورتيزون،وَهُمْ في حالة انتكاس، ثم وَهُمْ في حالةِخمولٍ للمرضِ .

المجموعةُ الثانية: تضمَّنَت اثنا عشر طفلاً من الصُابينَ بالأوذيما الكُلَوِيَّةِ وغير المستجيبينَ للعلاجِ بالكورتيزون.

المجموعةُ الضابطة: تضمَّنت اثنا عشر طفلاً مماثلينَ في العمر والجنس من الأطفالِ الأصِحَّاءِ .

وقد تمَّ تقييمُ كُلِّ الأطفالِ موضوع الرسالةِ تقييمًا إكلينيكيًا من خلال أخذ تاريخ مرضي مُفصَّل لِكُلِّ مريضٍ مع التركيزِ على (مُدَّة المرض ، السَّبَب في الأوذيما الكُلَويَّة، الاستجابة للعلاج بالكورتيزن، العلاجات الأخرى غير الكورتيزن)، بالإضافةِ إلى عملِ فحصٍ إكلينيكيٍّ لِكُلِّ مريضٍ مع التركيز على: مظاهر الأوذيما الكُلَويَّة (تَوَرُّم جفون العَين ، تَوَرُّم بالساقين، استسقاء) وعمل الفحوصات المعملية التي شملت الفحوص المعتادة للأوذيما الكُلَويَّة، وهي: نسبة البروتينات بالدم، ألبيومين بالدم، نسبة التخلص من الكرياتنين بالبول، كيرياتنين بالدم، الكوليستيرول بالدم، نسبة البولينا بالدم والبروتينات الموجودة في البول المجمع على مدار ٢٤ ساعة.

كما تمَّ قياسُ نسبةِ الأنكسين الخامس بالدم والبول المُجمع خِلال ٢٤ ساعة عن طريق (الأليزا) لِكُلِّ الأطفالِ موضوع الرسالة.

وقد أوضحتْ الدِّرَاسَةُ أنَّ المُستَوَى الكُلي للبروتيناتِ في الدَّم في مرضى الأوذيما الكُلَويَّة المستجيبينَ للعلاجِ بالكورتيزون وَهُمْ في حالة انتكاس مرضي، ومجموعة المرضى غير المستجيبينَ للعلاج بالكورتيزون ومستوى الألبيومين في الدم في نفس المجموعتين كان أقل لدرجة كبيرة وذو دلالة احصائية منه في مرضي الأوذيما الكُلَويَّة المستجيبينَ للعلاج بالكورتيزون وَهُمْ في حالةِ خمولِ المرض والمجموعة الضابطة.

كما أظهرتْ أنهُ لا يُوجَدُ اختلافٌ ذو دلالةٍ إحصائيَّةٍ بين المجموعات فيما يخص نسبة البولينا بالدم, ونسبة الكرياتينين بالدم, ونسبة التَخَلُّص من الكرياتينين.

وقد تبيَّنَ مِنْ خِلالِ الدِّراسَةِ أنَّ مُستَوَى الكوليستيرول في الدم في مرضى الأوذيما الكُلويَّةالمستجيبينَ للعلاج بالكورتيزونوَهُمْ في حالةِ انتكاس مرضى ومجموعة المرضى غير المستجيبين للعلاج بالكورتيزون كان أعلى لدرجة كبيرة وذو دلالة احصائية عنه في مرضي الأوذيما الكلوية المستجيبين للعلاج بالكورتيزون وهم فيحالة خمول للمرض والمجموعة الضابطة.

وأوضَحَت الدِّراسَةُ أيْضًا أنَّ مُستوى البرُوتينات في البَوْلِ المُجَمَّع في ٢٤ساعة في مرضى الأوذيما الكُلويَّة المُستَجيبينَ لِلعِلاج بالكورتيزون وهم في حالة انتكاسمرضي ومجموعة المرضى غير المُتجيبينَ للعلاج بالكورتيزون كان أعلى لدرجة كبيرة وذو دلالة احصائية عنه في مرضى الأوذيما الكُلويَّة المُتجيبينَ لِلعِلاج بالكورتيزون وهم فيحالة خمول للمرض والمجموعة الضابطة.

كما تبيَّنَ من الدراسةِ أنَّ مستوى الأنكسين الخامس في كمية البول المُجمَّعَة في ٢٤ ساعة في مرضى الأوذيما الكُلويَّة من غير المُتجيبينَ لِلعِلاج بالكورتيزون (المجموعة الثانية) (٦.٦٧±٠.٩٠ نانوجرام/مليلتر) أعلى منه بكثير وذو دلالة إحصائية عن باقي المجموعات.

وكذلكَ مستوى الأنكسين الخامس في كمية البول المجمعة في ٢٤ ساعة في مرضى الأوذيما الكُلويَّة المُتجيبينَ للعلاج بالكورتيزون وفي حالة انتكاس مرضي (المجموعة الأولي في حالة انتكاس مرضى) (٤.٩٧±١.٤٨نانوجرام/مليلتر) كان أعلى منه بكثير وذو دلالة إحصائية عن مرضى الأوذيما الكُلويَّة المستجيبين للعلاج بالكورتيزون وفي حالة خمول للمرض

(٢.٠٧±٠.٩٧نانوجرام/مليلتر) وعنه في المجموعة الضابطة (٢.٠٣±٠.٣٦نانوجرام/مليلتر).

وكذلك أظهرت الدراسةُ أن مُسْتَوَى الأنكسين الخامس في الدم كان عاليًا وذا دلالةٍ إحصائيةٍ في كل المَجْمُوعَاتِ مُقَارَنَةً بِالمَجْمُوعَةِ الضَابِطَةِ وَلَكِنْ بِدُون اختلافٍ ذي دلالة إحصائية فيمستواهُ بين مجموعات المرضى بالأوذيما الكُلْوِيَّة سواء من المُستجيبينَ للعلاج بالكورتيزون أو من غير المُستجيبينَ للعلاج بالكورتيزون.

وقد تبيَّنَ مِنْ خِلالِ الدِرَاسَةِ بأن هناك علاقة طردية بينمستوى البروتين في البول المُجَمَّع في ٢٤ ساعة وبينمستوى الأنكسين الخامس في البول المُجَمَّع في ٢٤ ساعة في كل المجموعات، بينما توجد علاقة عكسية بينمستوى الأنكسين الخامس في البول المُجَمَّع في ٢٤ ساعةوبينَ نِسْبَةَ البروتينات بالدم ونِسْبَة الألبيومين بِالدم.

كما كشَفَت الدراسةُ أنَّهُ لا تُوجَدُ عَلاقةٌبينَ مُسْتَوَى الأنكسين الخامس في البول المجمع في ٢٤ ساعةومستوى الأنكسين الخامس في الدم.

وأوضحت الدِرَاسَةُ بأنَّهُ لا تُوجَدُ علاقةٌ بينمستوى الأنكسين الخامس في البول المُجَمَّع في ٢٤ ساعة ونِسْبَة الكرياتينين في الدم ونِسْبَة البولينا بالدم ونِسْبَة التَخَلُّص من الكرياتينين.

وقدوَجَدَت الدِرَاسَةُ أن هناك نُقْطَةً قَاطِعَةً للأنكسين الخامس بقيمة ٥.٠٩ نانوجرام/ملليلتر وهذا يعني أنَّهُ يُمَثِلُ قِيمَةً فَاصِلَةً مُمْتَازَةً بينَ مجموعة

List of Abbreviations

ACEIs	:	Angiotensin converting enzyme inhibitors
AnxA5	:	Annexin A5
ANOVA	:	Analysis of variance
ARBs	:	Angiotensin II receptor blockers
AUC	:	Area under curve
BMI	:	Body mass index
CGN	:	Crescentic glomerulonephritis
CI	:	Confidence interval
CPH	:	Cyclophosphamide
CsA	:	Cyclosporine A
FITC	:	Fluorescein isothiocynate
FN	:	False Negative
FSGS	:	Focal segmental glomerulosclerosis
GFR	:	Glomerular filtration rate
GN	:	Glomerulonephritis
HDL	:	High density lipoproteins
INS	:	Idiopathic nephrotic syndrome
LDH	:	Lactate dehydrogenase

List of Abbreviations (Cont.)

MCNS	:	Minimal change nephrotic syndrome
MMF	:	Mycophenolate mofetil
MPGN	:	Membranoproliferative glomerulonephritis
NPV	:	Negative predictive value
NS	:	Nephrotic syndrome
PPV	:	Positive predictive value
PS	:	Phosphatidylserine
SDNS	:	Steroid dependant nephrotic syndrome
SRNS	:	Steroid resistant nephrotic syndrome
SSNS	:	Steroid-sensitive nephrotic syndrome
VAC-α	:	Vascular anticoagulant protein alpha
β–NAG	:	N-acetyl-β –D-glucosaminidase

List of Tables

Table	*Title*	*Page*
1	Important definitions of nephrotic syndrome	5
2	Renal histopathology of 100 patients of NS	10
3	Lipid profile in blood in nephrotic syndrome	17
4	Indications for alternative therapy	23
5	Comparison between the three groups as regards mean age, weight, height, BMI and blood pressure	47
6	Comparison between the three groups as regards sex distribution	47
7	Comparison between parameters in remission and in relapse	48
8	Comparison between the three groups as regards serum total protein, serum albumin, serum creatinine, BUN and serum cholesterol	49
9	Comparison between the three groups as regards 24-h urine proteins and creatinine clearance	51
10	Comparison between the three groups as regards serum annexin V and 24-h urinary annexin V	52
11	Correlation between 24h urine annexin V and serum annexin V with other parameters	54

List of Figures

Figure	*Title*	*Page*
1	Management of patients with nephrotic syndrome	22
2	Superimposed crystal structures of annexin A1 and annexin A5 in ribbon diagram form	29
3	Nephron localizations of relevant annexins	32
4	Comparison between all studied groups as regards serum annexin V	53
5	Comparison between all studied groups as regards 24-h urinary annexin V	53
6	Scatter diagram showing the positive correlation between 24-h urine annexin V and 24-h urine proteins	55
7	Scatter diagram showing the positive correlation between 24-h urine annexin V and cholesterol.	56
8	Scatter diagram showing the negative correlation between 24-h urine annexin V and total proteins	57
9	Scatter diagram showing the negative correlation between 24-h urine annexin V and serum albumin	58
10	Receiver Operating Characteristic (ROC) curve to define the best cutoff to 24-h urinary annexin to detect cases (steroid resistance)	59

List of contents

List of Abbreviations i

List of Tables iii

List of Figures iv

Introduction and Aim of the work 1

Review of Literature 4

Subjects and Methods 37

Results 47

Discussion 61

Conclusion 66

Recommendations 67

Summary 68

References 72

Arabic Summary ..... --

المرضى غير المُستجيبين للعلاج بالكورتيزون والمستجيبين للعلاج بالكورتيزون بحساسيةٍ تساوي ٩١.٧%وَدِقةٍ تُساوي ٨٣.٣%.

أخيرًا، نَعْتَقِدُ أنَّ مُستوى الأنكسين الخامس في البَولِ المُجَمَّع في ٢٤ ساعة يُمكنُ استِخْدَامُهُ كعَاملٍ تَكهُّني في الأطفال المرضى بالأوذيما الكُلويَّة غيرِ المُستجيبين للعلاج بالكورتيزون، كما يُمْكِنُ استخدامُهُ كعاملٍ دَالٍ على التَحَسُّنِ في الأطفالِ المرضى بالأوذيما الكُلويَّة.

Acknowledgement

First and foremost, thanks to God who; gave me the ability to complete this work.

I would like to express my sincere and deep gratitude, to ***Prof. Dr. Magid Ashraf Abdel-Fattah Ibrahim*** *Professor of Pediatrics Faculty of Medicine - Ain Shams University for his help, cooperation, and valuable suggestions. It is a great honor to work under his guidance and supervision.*

Also, I am very grateful to ***Dr. Faisal Youssef Mohamed Youssef*** *Lecturer of Pediatrics Faculty of Medicine - Ain Shams University, for his valuable help and keen interest in the progress and accomplishment of this work.*

And I would like to express my thanks and appreciation to ***Dr. Rania Salah El-Din Kamel Shahin*** *Lecturer of Clinical and Chemical Pathology, Faculty of Medicine - Ain Shams University for her supervision, continuous guidance, cooperation and helpful instructions.*

Amany Farouk Hashem

Introduction

Nephrotic syndrome is a primarily pediatric disorder characterized by heavy proteinuria (>40mg/m²/hr), hypolabuminemia (<2.5gm/dl), edema and hyperlipidemia ***(Vogt and Avner, 2007)***, most commonly caused by one of two idiopathic diseases; minimal-change nephrotic syndrome and focal segmental glomerulosclerosis, other causes are rare in children ***(Eddy and Symons, 2003).*** It may occur at any age but commonly between 1.5 and 8 years ***(Morcela and Kaskel, 2003)***.

Annexin V is a member of a family of Ca^{2+}-binding proteins, annexins I-XIII, and has a molecular weight of 32-35 kD and an isoelectric point of 4.8-5.0 ***(Matsuda et al., 2000).*** Immunohistological studies showed that annexin V is present in many human tissues. In kidneys, it exists mostly in the endothelium and parietal epithelium of glomeruli, macula densa, and cortical tubular epithelium. Intensive annexin V was observed in cells that fulfill a barrier function between tissues and body fluids such as placental villi and endothelial cells ***(Heerde et al., 2004).***

Annexin V has been reported to possess such biological functions as anticoagulant activity, inhibition of phospholipase

A_2, regulation of membrane transport, proliferation, and signal transduction ***(Liemann et al., 1996).***

Annexin V in the presence of calcium binds with phosphatidylserine, which composes the inner layer of the cell membrane and possesses calcium-ion channel activity ***(Matsuda et al., 2000)***.

It is reported that annexin V concentration and various urinary enzymes such as LDH have been shown to increase significantly during relapse of nephrotic syndrome ***(Matsuda et al., 2000).*** Although the activity of these enzymes can be measured to monitor renal diseases, the rapid inactivation of them is considered to be a serious problem, so measuring the urinary annexin V concentration may be a promising indicator of acute renal impairement ***(Chavan and Hase, 2005).***