

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**BİRİNCİL MEMBRANÖZ
GLOMERÜLONEFRİTTE C4d VARLIĞININ VE
YOĞUNLUĞUNUN BÖBREK HASARLANMA
DERECESİ VE BÖBREK SAĞKALIMI İLE
BİRLİKTELİĞİ**

Dr. ESRA GÖKÇE

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2015

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

**BİRİNCİL MEMBRANÖZ
GLOMERÜLONEFRİTTE C4d VARLIĞININ VE
YOĞUNLUĞUNUN BÖBREK HASARLANMA
DERECESİ VE BÖBREK SAĞKALIMI İLE
BİRLİKTELİĞİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. ESRA GÖKÇE

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: PROF. DR. CANER ÇAVDAR

(Bu araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Talep No: 2014/ 80)

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
TABLO LİSTESİ	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iii
RESİM LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	v
ÖZET	1
ABSTRACT	5
GİRİŞ VE AMAÇ	9
GENEL BİLGİLER	10
2.1 Tanım ve Evreleme	10
2.2 Patogenez ve Tanıdaki Gelişmeler	11
2.3 C4d ve Membranöz Nefropati	14
2.4 Epidemiyoloji, Klinik Özellikler ve Hastalık Seyri	17
2.5 Tedavi Yaklaşımı	19
2.6 Sonuç	20
GEREÇ VE YÖNTEMLER	21
3.1 Hastalar	21
3.2 C4d Boyaması ve Histopatolojik İncelemeler	25
3.3 İstatistiksel Analiz	25
BULGULAR	26
4.1 Demografik Veriler	26
4.2 Klinik Veriler	26
4.3 Histopatolojik Veriler	28
4.4 Glomerüler Bazal Membranda C4d Boyanması	29
4.4.1 C4d Boyanma Derecesinin Histopatolojik Bulgularla Birlikteliği	32
4.4.2 C4d Boyanma Derecesinin Demografik, Klinik Veriler ve Laboratuvar İzlem Verileri ile Birlikteliği	35
4.4.3 Hastaların Segmental ve Global Paternde C4d Boyanma Özelliğine Göre Değerlendirilmesi	37
4.4.4 C4d Boyanması Negatif Olan İki Hastanın Sonuçları	40
TARTIŞMA	41
SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	48

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini her an aynı şevkle paylaştan, tezin oluşturulduğu süreçte çalışmanın planlanmasında, yürütülmesinde, analiz edilmesinde ve sonuçlandırılmasında sonsuz sabrıyla ve teşvik ediciliği ile desteğini sürdüren, birlikte çalışmaktan onur duyduğum tez danışmanı hocam sayın Prof. Dr. Caner Çavdar'a;

Projenin başından itibaren istekle ve ivedilikle çalışarak, yöntemde ve analizde bilgi ve tecrübelerini esirgemeyerek projenin daha güçlü sonuçlara ulaşmasına katkıda bulunan değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Sülen Sarıoğlu'na ve sayın Doç. Dr. Mehtat Ünlü'ye;

Uzmanlık eğitimim boyunca nesnel ve bilimsel anlatım tarzından hastaya yaklaşıma kadar pek çok ve önemli konuda bilgi ve deneyimlerini aktaran, bilimsel çalışma yöntemleri çerçevesinde ve nitelikli sonuçlar elde edilmesi açısından projeye son dokunuşu ile önemli katkılarda bulunan sayın hocam Prof. Dr. Taner Çamsarı'ya;

Tezin ürün verebilmesi açısından sabırla bizi dinleyerek, istatistik aşamasında değerli çabaları ile önemli katkılarda bulunan sayın hocam Prof. Dr. Hülya Ellidokuz'a;

Projenin zaman akışına uygun şekilde derlendiği son aşamalarda imdadıma yetişen ve klinikte kendisinden her an aynı enerji ile sorunların üstesinden gelmeyi öğrendiğim sayın hocam Uzm. Dr. Serkan Yıldız'a;

Birlikte çalışmaktan büyük keyif duyduğum, iş akışında değerli bilgi ve deneyimlerini aktarırken önceliklerini her zaman benden, öğrencilerinden yana kullanmış olan hocalarım sayın Prof. Dr. Ali Çelik'e ve sayın Prof. Dr. Aykut Sifil'e;

Uzmanlık eğitimimde katkıları büyük olan başta Ana Bilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Fatoş Önen olmak üzere tüm kıymetli İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi hocalarıma;

Projenin son aşamalarında yardıma koşan ve bilimsel çalışmada metodoloji konusunda değerli tecrübelerini benimle paylaştan sevgili abim Uzm. Dr. Gökmen Sevindik'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte güzel zamanlar geçirdiğim ve unutulmayacak anılar biriktirdiğim sevgili çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Rukiye Arıkan'a ve Dr. Aslıgül Dünya Erdal'a,

Tıp eğitimim boyunca en önemli ve gerekli anlarda yanımda olan ve her türlü imkanı önüme seren sevgili annem, babam ve canım kardeşlerim Gülşah Gökçe ve Emre Gökçe'ye;

En içten ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Esra Gökçe

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Membranöz Nefropati'nin Histopatolojik Evreleri (Ehrenreich ve Churg 1968)

Tablo 2. Birincil ve İkincil Membranöz Nefropati'de Ayırteıcı Histopatolojik Özellikler

Tablo 3. Membranöz Nefropatide Kötü Böbrek Sağkalımı ile İlişkili Etkenler

Tablo 4. Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri

Tablo 5. Araştırmadan Dışlama Kriterleri

Tablo 6. Araştırmada Değerlendirilen Demografik ve Klinik Veriler

Tablo 7. Araştırmada Değerlendirilen Histopatolojik Veriler

Tablo 8. Araştırmaya Dahil Edilen Birincil Membranöz Nefropati Hastalarının Biyopsi Zamanındaki Profili

Tablo 9. C4d Boyanma Derecesinin Işık Mikroskopi Bulguları ile Birlikteliği

Tablo 10. C4d Boyanma Derecesinin Direkt İmmünfloresan Bulguları ile Birlikteliği

Tablo 11. C4d Boyanma Derecesine Göre Demografik Verilerin ve İzlemdeki Klinik ve Laboratuar Verilerin Değerlendirilmesi

Tablo 12. C4d Boyanma Paterni ile C4d Boyanma Yoğunluğu Arasındaki İlişki

Tablo 13. C4d Boyanma Yoğunluğunun Segmental/Global Paternde Boyanma Çarpan Skoru ile birlikteliği

Tablo 14. Segmental ve Global Paternde C4d Boyanmasına Göre İzlemdeki Klinik Laboratuar Verilerin Değerlendirilmesi

SEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kompleman Sisteminin Şematik Gösterimi

Şekil 2. Kompleman Sisteminde C4d Molekülünün Rolü

Şekil 3. Glomerüler C4d Boyanması Açısından Genel Hasta Profili

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Glomerülde Segmental Paternde C4d Boyanması

Resim 2. Glomerülde Global Paternde C4d Boyanması

Resim 3. Glomerülde Negatif C4d Boyanması

KISALTMALAR

MN	:	Membranöz Nefropati
SDBY	:	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
IM	:	Işık Mikroskopi
İF	:	İmmünfloresan
IgG	:	İmmünglobulin G
Ig	:	İmmünglobulin
EM	:	Elektron Mikroskopi
GBM	:	Glomerüler Bazal Membran
PLA2R	:	Fosfolipaz A2 Reseptörü
MBL	:	Mannoz-Bağlayıcı Lektin
ACE	:	Anjiotensin Dönüştürücü Enzim
ARB	:	Anjiotensin Reseptör Blokeri
ACTH:	:	Adrenokortikotropin Hormonu
ELISA	:	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
DEÜTFH	:	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi
KDIGO	:	Kidney Disease Improvement Global Outcome
AIDS	:	Acquired Immune Deficiency Syndrome
SPSS	:	Statistical Package for The Social Sciences

ÖZET

Birincil Membranöz Glomerülonefritte C4d Varlığının ve Yoğunluğunun Böbrek Hasarlanma Derecesi ve Böbrek Sağkalımı ile Birlikteliği

Araş. Gör. Dr. Esra Gökçe

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Yazışma adresi: esra_gokce@hotmail.com

Amaç ve hipotez: Bu çalışmanın amacı birincil membranöz glomerülonefritli hastalarda glomerüler C4d boyanmasının demografik, klinik ve histopatolojik bulgularla ve renal sağkalım ile birlikteliğini değerlendirmektir. Glomerüler C4d pozitif boyanan birincil membranöz nefropatili hastalarda komplemanın lektin yolunun aktive olduğu düşünülmektedir; böylelikle bu hastalarda böbrek hasarlanma derecesinin ciddi ve böbrek sağkalım oranının düşük olması beklenmektedir.

Yöntem: 2005 Eylül ile 2014 Eylül tarihleri arasında başvuran ve biyopsi ile membranöz glomerülonefrit tanısı elde edilen 50 hastadan, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (DEÜTF) Nefroloji Bilim Dalı tarafından değerlendirilerek birincil membranöz nefropati tanısı almış 18 yaş ve üzeri olan 20 hasta bu araştırmaya dahil edilmiştir. Hastalar bölüme davet edilerek birebir klinik görüşme ortamında, biyopsi örneklerinin ve dosya-arşiv bilgilerinin kullanımı açısından kendilerinden gönüllü aydınlatılmış onam formu ile onay alınmıştır. DEÜTF arşivinde yer alan hasta dosyaları retrospektif olarak incelenmiştir. Hastaların tamamında biyopsiler Nefroloji Bilim Dalı tarafından elde edilmiş ve tanı ve çalışma sırasında biyopsi örneklerinin değerlendirilmeleri DEÜTF Patoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir. Patoloji Ana Bilim Dalı tarafından saklanmış böbrek dokuları C4d kiti (Cell Marque R C4d/SP91 monoklonal antikoru) ile yeniden boyanarak değerlendirilmiştir. Glomerüler C4d boyanması immünohistokimyasal yöntemle gerçekleştirilmiştir. Glomerüler C4d boyanma dereceleri negatif (glomerüler bazal membranın %25'inden azının boyanması), hafif (ince granüler), orta (kalın granüler) ve şiddetli (kaba depozitlenmeler) dereceler olarak belirlenmiştir. Buna göre hastalar ilk olarak negatif ve hafif derecede boyananlar ile orta ve şiddetli derecede boyananlar olarak iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplar demografik veriler (yaş, cinsiyet, takip süresi) ile klinik ve laboratuvar izlem verileri (biyopsi sırasında ve takibin 3. ayında, 6. ayında ve sonunda proteinüri miktarı; serum kreatinin düzeyi; serum albumin düzeyi; MDRD formülüne göre kreatinin klerensi; tanı

sırasında hipertansiyon varlığı; sadece konservatif tedavi veya bağışıklık baskılayıcı tedavi başlanma durumu; izlemde serum kreatinin düzeyinde iki katına çıkma ve glomerüler filtrasyon hızında yarıya düşme süreleri ve renal replasman tedavisi varlığı) ve ayrıca histopatolojik veriler (ışık mikroskopisinde glomerüler bazal membran bulguları, global ve segmental sklerotik glomerül yüzdeleri, interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi varlığı, arteriol ve arter çeperlerinde kalınlaşma ve mezangial hipersellüarite varlığı; immünfloresan incelemede IgG, IgA, IgM, Ig kappa ve lambda, kompleman C1q ve C3 birikimi) açısından karşılaştırıldı. Daha sonra C4d boyanma paternine göre ise hastalar segmental (bir glomerülün %50'den azında C4d boyanması) paternde boyananlar ve global (bir glomerülün tamamına yakınında C4d boyanması) paternde boyananlar olarak gruplandırıldı. Bu gruplar da aynı demografik, klinik, ve histopatolojik veriler açısından karşılaştırıldılar. İstatistiksel analizde SPSS 15.0 programı kullanıldı ve p değerinin 0,05'ten küçük saptanması durumunda bulgular istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi. Sayısal veri analizi için ki-kare testi ve Fisher kesin testi, ölçümle belirlenen değişken analizi için Mann-Whitney U testi ve korelasyon analizi kullanıldı. Glomerüler C4d boyanmasının renal sağkalım üzerine olan etkisini değerlendirmek için Kaplan-Meier ve Cox oransal risk analizlerinin kullanılması planlandı.

Bulgular: Membranöz glomerülonefrit tanılı biyopsi elde edilmiş 50 hastadan 23'ünde klinik olarak birincil membranöz glomerülonefrit tanısı ve ikincil nedenlerin eklenmediği düzenli takip kaydedilmiştir. Bu hastalardan 3'ü yetersiz biyopsi örneği eldesi nedeniyle çalışmadan dışlanmıştır. Geriye kalan 34 ile 72 yaş arasındaki 20 hastanın %55'inin erkek (n=11 ve yaş ortalaması 48.83 yıl) ve %45'inin kadın olduğu (n=9, yaş ortalaması 51.33 yıl) görülmüştür. Glomerüler C4d boyanması hastaların %90'ında (n=18) pozitif ve %10'unda (n=2) negatif olarak belirlenmiştir. Ortalama 43.7 ay (en kısa 6; en uzun 130 ay) süren izlemde, serum kreatinin düzeyi iki katına çıkmadığından veya GFR'de %50'den fazla azalma görülmediğinden ve renal replasman ihtiyacı gelişmediğinden renal sağkalım analizi yapılamamıştır. C4d negatif ve hafif derecede boyananlar ile orta ve şiddetli derecede boyanan gruplar karşılaştırıldığında; C4d birikim derecesinin şiddeti ile demografik ve klinik veriler arasında istatistiksel anlamlı birliktelik bulunmamıştır. Histopatolojik verilerden ise segmental skleroz yüzdesinin (p=0.017); immünglobulin A birikiminin (p=0.044) ve kappa ile lambda proteinlerinin (sırasıyla p=0.029, p=0.049) negatif-hafif derecede C4d boyanan grup ile anlamlı birlikteliği saptanmıştır. Negatif ve hafif derecede C4d boyanan grupta bu bulguları global skleroz yüzdesi ve IgG birikimi de istatistiksel düzeye ulaşmamakla birlikte

eşlik etmektedir. C4d orta-şiddetli derecede boyanan grupta; daha ileri evrelerde bazal membran kalınlığı ile daha fazla sayıda hastada arter duvar kalınlaşması ve interstisyel enflamasyon istatistiksel anlamlılığa ulaşmamakla birlikte dikkat çekicidir. Hastalar segmental ve global paternde iki grup olarak değerlendirildiğinde 6 hastanın segmental ve 12 hastanın ise global boyandığı belirlenmiştir. Global paternde boyanma, orta ve şiddetli derecelerde C4d boyanması ile anlamlı olarak birlikte bulundu ($p=0.001$). Bunun üzerine segmental/global paternde boyanma çarpan skoruna göre segmental ve global paterndeki gruplardan global patern grubu C4d boyanma derecelerinde orta-ağır derecede C4d boyanması ile istatistiksel anlamlı olarak birlikte saptanmıştır ($p<0.01$). Segmental ve global paternde boyanan gruplar klinik ve demografik açısından karşılaştırıldığında, proteinürinin hafif, orta ve ağır dereceler olarak sınıflandırıldığı analizde 3. aydaki proteinüri düzeyi global paternde boyanan grupta daha yüksek bulunmuştur ($p=0,027$).

Sonuçlar ve Tartışma: C4d birikimi immünhistokimyasal yöntemle geriye dönük olarak gösterilebilmektedir. Ancak prognostik bir risk faktörü olup olmadığı gösterilememiştir. Çalışmamızda C4d'nin hem boyanma derecesi olarak hem de boyanma paterni olarak geleneksel risk faktörleri ile korelasyon göstermediği bulunmuştur. Histopatolojik bulgulardan segmental skleroz yüzdesinin C4d'nin negatif ve hafif derecede boyandığı grupta istatistiki anlamlılığa yüksek saptanması ve global skleroz yüzdesinin de istatistiksel anlamlılığa ulaşmadan aynı grupta daha yüksek ortalamada bulunması dikkat çekicidir. Bu bulgu, sklerozun komplemana bağlı hasardan farklı bir mekanizma ile de oluşabilen bağımsız bir risk faktörü olmasına bağlanmıştır. C4d negatif ve hafif derecede boyananlarda IgA'nın ve kappa ile lambdanın anlamlı birlikteliği; birincil membranöz nefropati dışında enfeksiyon gibi ikincil nedenlere bağlanmıştır. İstatistiksel anlama ulaşma da interstisyel enflamasyon varlığı ile bazal membranda ve arterlerde kalınlaşma gibi histopatolojik bulgularla C4d boyanmasında şiddetli derecelerin birlikteliği dikkati çektiğinden; C4d'nin histopatolojik risk faktörlerinden vasküler duvar kalınlaşması ile birlikteliğini aydınlatmada daha fazla sayıda hastaya ihtiyaç olduğu düşünülmüştür. C4d'nin global paterninin şiddetli derecelerde C4d boyanması ile birliktelik göstermesi yetişkin membranöz nefropatisinde global paternde immün birikimin daha yaygın olmasına bağlı olarak düşünülmüştür. C4d'nin burada, aktif ve şiddetli hastalık ataklarının zamanla çözünmeden ortamda kalan bir işareti olduğu akla gelmektedir. Çalışmamız yetişkin birincil membranöz nefropatisinde C4d'nin prognoz üzerinde etkisi olup olmadığını kapsamlı şekilde ele alan ilk çalışmadır. C4d komplemanın klasik ve lektin yollarında açığa çıkan bir yan üründür. Lektin yolunun belirteci olarak C4d ile

bulguların negatif korelasyonu düşünöldüğünde, farklı bir mekanizma olarak alternatif yolun da hastalıkta aktifleşebileceği akla gelmektedir. C4d'nin lektin yolu üzerinden prognoz ve sağkalım üzerine etkisi olup olmadığının araştırılmasında, patolojik biyopsilerde membran fosfolipaz A2 reseptörünün ve alternatif yol bileşenlerinden faktör-B'nin değeriendirildiği ve ayrıca daha fazla sayıda hastanın dahil edildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar kelimeler: C4d, membranöz glomerölonefrit, renal hasarlanma

ABSTRACT

Association of The Presence and Quantity of C4d with The Severity of The Kidney Injury and The Kidney Longevity In Patients with Primary Membranous Glomerulonephritis

Object and hypothesis: The aim of this study is to evaluate the correlation between the glomerular C4d staining and demographic, clinic, histopathologic findings and kidney longevity of patients with idiopathic membranous glomerulonephritis. Lectin pathway of the complement system is thought to be activated in patients with C4d positive glomerular staining, thus, in those patients severe renal injury and decreased renal survival rate is expected.

Methodology: Of the 50 patients who applied to Dokuz Eylül University School of Medicine (DEUTF) Department of Nephrology between September 2007 and September 2014 and on whom performed biopsy that diagnosed as membranous nephropathy by DEUTF Department of Pathology and evaluated as idiopathic membranous nephropathy by (DEUTF) Department of Nephrology , 23 patients are included. After the 23 patients with age of 18 and older and which were followed properly as primary (idiopathic) membranous glomerulonephritis by DEUTF Department of Nephrology choosen, they were invited to the department and discussed face to face, written informed volunteer consent was obtained for staining with C4d on previus kidney biopsy material and for the usage of history of disease data. Patients' files in the archive of hospital of DEUTF researched retrospectively. In all of cases, biopsy specimens were obtained by Department of Nephrology, and evaluated both at the time of biopsy and reassessment for C4d staining by Department of Pathology. Kidney tissue specimens in the Department of Pathology archival were analysed for glomerular C4d staining with C4d kit (Cell Marque R; C4d SP91 monoclonal antibody). Glomerular C4d staining was performed via immunohistochemistry method. Glomerular C4d staining degrees are determined as negative (staining less than %25 in one glomerulus), mild degree (fine granular staining), intermediate degree (thichened granular) and severe degree (coarse deposits). According to these degrees of C4d, at first patients grouped as negative and mild degree stained and intermediate-severe stained. Those groups were compared according to their demographical (age, sex, follow up period) , clinical and laboratory follow up variables (proteinuria of 24 hours, serum creatinine level, creatinine clarence in terms of MDRD

formula, serum albumine level at initial, in term of 3th month, in term of 6th month and last visit; existance of hypertension, conservative treatment and/or immunosuppressive treatment, doubling time of serume creatinine level, %50 decrease in glomerular filtration range and existance of renal replacement) and also histopathologic (glomerular basal membrane properties, percentages of global and segmental sclerotic glomerulus, interstitial fibrosis and tubular atrophy, thickening in arteries and arteriols, existance of mesangial hypercellularity and interstitial inflammation at light microscopy; examination of IgG, C3, Ig kappa and lambda stainings at immonofluorescence microscopy) findings. After determining the groups according to C4d staining degrees; groups which based on C4d staining pattern was composed as segmental pattern group (C4d staining less than %50 of a glomerulus) and global pattern group (C4d staining in almost full of glomerulus) were composed. Segmental and global staining pattern groups were also compared according to the same demographic, clinical, laboratory follow up variables and histopathologic variables. For statistical analysis SPSS 15.0 was used; findings were evaluated as statistically significant if p value is to be found less than 0.05. For categorical data analysis Chi-square and Fisher's exact test; for analysis of variance Mann-Whitney U and correlation analyses tests are used. Kaplan-Meier and Cox proportional hazard analyses were planned to be performed to evaluate the effect of glomerular C4d staining on renal survival.

Results: Of the patients who were between ages of 34 and 72, %60 were (n=12, mean 48.83 years) male and %40 were (n=8, mean 51.75 years) female. Of 20 patients, %90 were identified as glomerular C4d-positive (n=18), and %10 (n=2) as negative. During mean follow up of 43.7 months (minimum 6; maximum 130 months), as neither any of the patients needed renal replacement therapy, nor creatinine levels increased two-fold and GFR decreased half during the periods; we could not perform renal survival analysis. When we compared the negative-mild degreed C4d staining group with the intermediate-severe degreed C4d staining group; we did not find correlation between severity of C4d staining degrees and between demografical, clinical findings statistically. Among histopathological variables, percentage of segmental sclerosis, deposits of immunoglobulin A, kappa and lambda staining degrees were associated with negative and mild degreed C4d staining group (p=0.017, p=0.029, p=0.049 respectively).in the same group, global glomerulosclerosis was also dominant according to intermediate-severe degreed C4d staining group, but was not statistically significant. Mean value of IgG staining degrees accompanied to global sclerosis dominancy in the same group as we compared to the intermediate-severe C4d staining group. However, yet not statistically

significant; further thickening in basal membranes and arteries and interstitial inflammation in more patients attracted notice. When we evaluated groups based on C4d staining of pattern; we determined 6 biopsies that C4d stained in segmental pattern and 12 biopsies that C4d stained as global. Staining in global pattern was statistically associated with further degrees (intermediate and severe) of C4d staining ($p=0.001$). After this finding, groups based on global and segmental pattern compared to groups based on C4d staining degrees in the name of segmental/global pattern factor scoring. Group with the global pattern showed statistically significant correlation with the further degrees of C4d staining in the extent of segmental/global pattern factor scoring too ($p<0.01$). Also about the clinical and laboratory follow up variables, in the groups based on C4d staining pattern it was found that group of global C4d staining was associated with higher levels of proteinuria according to segmental groups when the findings analysed via proteinuria classification ($p=0.027$).

Conclusions:. C4d staining can be confirmed usually by the immunohistochemically methods retrospectively. But it could not be shown statistically if C4d is a marker of poor prognosis in idiopathic membranous nephropathy. In our study we found that both C4d staining degree and pattern was not correlated with traditional prognostic factors and renal survival markers. Among histopathologic findings, the significant finding of the segmental sclerosis percentage which correlated with the C4d negative and mild degree staining statistically; and accompanied global sclerosis of glomeruli correlated with the same group without statistical meaning was remarkable. This finding is considered to focal glomerulosclerosis was a independent worse renal outcome predictor that affected by many factors and could exist from variable pathologies. The association between negative-mild degree C4d staining and IgA, kappa and lambda is considered to be associated with secondary factors like post-infectious situation except primary membranous nephropathy. Yet it is not significant statistically; there were some other histopathological findings like interstitial inflammation, also thickening of basale membrane and arteries correlated with further degree C4d staining, new studies should be performed with more patients to evaluate the correlation between thickening in arteries and degrees of C4d staining. The finding in which C4d with global pattern was highly correlated with further degrees of C4d is found to be concerned with the prevalence of global pattern of immune deposits in primary membranous nephropathy in adults. Here, C4d is considered to be a stigmat of the previous or ongoing exacerbations or relapses in illness. Our study is the first report involving if C4d is effective on prognosis of idiopathic membranous glomerulonephritis in adults extensively. C4d is a split product of classical and

lectin pathway of complement, so with our negatively correlated findings of C4d with prognostic factors; it comes to mind that alternative pathway is also affective on pathogenesis as a different mechanism. To research that if C4d is efficient on prognosis and renal survival in idiopathic membranous nephropathy; it is suggested that more investigations which membrane phospholipase A2 antibody and factor-B the component of alternative pathway are concluded should be performed with more patient series and longer follow-up periods.

***Keywords:* C4d, membranous nephropathy, renal injury**

1. GİRİŞ VE AMAC

Membranöz glomerülonefrit, yaygın adı ile membranöz nefropati (MN) yetişkinlerde nefrotik sendromun en sık nedenlerinden biridir ¹. Beyaz ırkta diğerlerine göre daha sık nefrotik sendrom sebebidir ve son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) ilerleme riski daha fazladır ^{2,3}. Yetişkinlerde olguların %75'i birincil ve %25'i ikincil olarak saptanmaktadır ⁴. İkincil nedenler arasında lupus nefriti, özellikle ileri yaşta maligniteler, Hepatit B gibi çeşitli enfeksiyonlar, ilaç toksisitesi, nadiren de sarkoidoz gibi diğer otoimmün hastalıklar yer alır ^{5,6}. Genellikle diğer glomerülopatilere göre daha sinsi başlayabilirse de, vakaların %80'i nefrotik sendrom semptomları, %20'si de nefrotik olmayan proteinüri ile başvurmaktadır. Hastalığın doğal seyri konusunda önceki yıllarda kendiliğinden sönmelerin daha yaygın olduğu düşünülürken; tedavisiz 5 yıllık izlemler 10-15 yıla çıkarıldığında alevlenmelerin görülebildiği ve tüm olguların üçte birinin SDBY'ye ilerlediği gözlemlenmiştir ⁷⁻¹¹.

Hastalıkta SDBY'ye ilerleme riski söz konusu olduğunda bağışıklık baskılayıcı ilaç tedavileri gündeme gelir ^{10,12}. Başlangıçta proteinürinin 4 g/gün'den az ve kısa sürmüş olması, hipertansiyonun olmaması, kadın cinsiyet, genç yaş iyi; erkek cinsiyet, hipertansiyon varlığı, ileri yaş ve tanı anında yüksek serum kreatinin değeri, 8 g/gün'den fazla proteinüri ve biyopside ileri histopatolojik bulgular ise kötü prognostik kriterler olarak görülmektedir ^{3,13-17}. MN'in SDBY'ne ilerlemesini öngörmede hiçbir risk faktörü tek başına yeterli kriter değildir ve alevlenme riskini de göstermemektedir.

Kompleman sisteminde klasik ve lektin yollarında kullanılan C4 proteininin yan ürünü olan C4d'nin MN biyopsilerinde immünfloresan çalışmada pozitif boyandığı; klasik yolun başlatıcısı C1q'nun ise birincil MN'de neredeyse hiç boyanmadığı uzun süredir bilinmektedir ¹⁸⁻¹⁹. Literatürde birincil MN'de C4d'yi içeren çalışmalar tanısal yeterliliğe odaklanan histopatoloji çalışmalarıdır ve C4d'nin prognoz öngördürücülüğünü değerlendirmemektedirler ¹⁹⁻²¹. Araştırmamızın amacı; merkezimizde tanı alan ve takip edilen birincil MN hastalarında glomerüler C4d varlığını hastaların klinik demografik ve histopatolojik verileriyle birlikte incelemek, C4d'nin prognoz üzerine öngördürücülüğünü değerlendirmektir. Çalışmamız, yetişkin birincil MN hastalarında C4d'nin prognoz üzerine etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Tanım ve Evreleme

Membranöz nefropati (MN) etyolojide ve patofizyolojide kaydedilen tüm gelişmelere rağmen tanısı böbrek biyopsisi ile konulan bir hastalıktır. MN adlandırması pek çok ayrı etyolojinin paylaştığı histolojik bir kalıptır. Bu kalıp 1950’lerde ilk olarak Jones, Mellors ve Ortega tarafından tanımlandığında, **ışık mikroskopisinde (IM)** Jones-gümüşleme boyası ile gösterilebilen immün depozitlerin etrafında bazal membranla ilişkili ‘spike’ oluşumlarını; **immünfloresan çalışmada (İF)** periferik kapiller yumaktaki immünglobulin G (IgG)’den zengin ve çoğu zaman C3 komplemanı da kapsayan ince-granüler tarzda immün birikimleri; **elektron mikroskopide (EM)** subepitelyal immün depozitleri içermiştir ²². MN’nin patolojik tanısında vazgeçilmez olan, glomerüler bazal membranın (GBM) dış yüzeyi ile podosit arasında başlayan subepitelyal immün kompleks ve IgG birikimidir. Bu yüzden tanıda elektron mikroskopisi ve immünfloresan çalışma çok önemlidir. 1968’de Ehrenreich ve Churg elektron mikroskopisinde subepitelyal immün depozitlerin yerleşimine göre MN’nin evrelerini de tanımlamışlardır ²³ (Tablo 1).

Tablo 1. Membranöz Nefropati’nin Histopatolojik Evreleri (Ehrenreich ve Churg 1968)

	Elektron Mikroskopi (EM)	Işık Mikroskopisi (IM)
1. evre	Subepitelyal immün depozitler vardır, GBM normaldir	GBM normaldir (depozitler Malory trichrome boyası ile görülebilir) .
2. evre	GBM dış yüzeyinde ve immün depozitlerin arasında ‘ spike ’ (bazal membran benzeri materyal) oluşumları gözlenir.	‘Spike’ oluşumları periodik asit-silver metenamin (Jones) boyasıyla IM’de gösterilebilir.
3. evre	Bazal membran benzeri materyal ‘kubbe’ görünümünde, GBM’ı kapsayan düzensiz kalınlaşma	Bazal membran benzeri materyal ‘kubbe’ görünümünde, GBM’ı da kapsayan düzensiz kalınlaşma
4. evre	İmmün depozitler elektron-lusenttir, reabsorbedir; ‘köpük’ veya ‘İsviçre peyniri’ görüntüsü gözlenir.	GBM’da aşırı düzensiz kalınlaşma depozitlerin çözünmesine eşlik eder.

2.2 Patogenez ve Tanıdaki Gelişmeler

Birincil MN humoral immünitinin ön planda olduğu, organa özgü otoimmün bir hastalıktır. GBM'in podositlerindeki intrinsik hedef antijenlere karşı gelişen antikorlarla hastalığın ortaya çıktığı bilinmektedir. Günümüzde bulunan en yaygın hedef antijen 2009'da Beck ve arkadaşlarının tanımladığı 'membran tipi fosfolipaz A2 reseptörü (PLA2R)'dür ²⁴. Bu yüzden birincil MN otoimmün bir podositopati olarak değerlendirilmektedir. İkincil MN'lerde ise tablo genellikle immün komplekslerin dışarıdan gelerek GBM'de çökmesi ile oluşur. Her iki MN sürecinde de immün komplekslere karşı gelişen antikorlar ve antikorların etkinleştirdiği kompleman etkinliği ile GBM dış yüzeyinde mikromimari bozulur, podositlerin ayaklı çıkıntılarında kayıplar olur ve proteinüri belirginleşir^{25,26}. Komplemanın uzun süre aktif olması normalde eritrosit gibi çekirdeksiz hücrelerde membran delinmesi ve ölüm ile sonuçlanırken; MN'de podositlerde ve pedisel mikromimarisinde ölümcül seviyenin altında ancak tamiri mümkün olmayan değişikliklerle sonuçlanır ²⁷. Bu değişiklikler GBM dış yüzeyinde hasarlı membranın başlıklanma ve gömülmesini, ve immün birikimlerin oluşumunu kapsar; sonuçta GBM kalınlaşır. Birincil MN'de sıklıkla IgG dışında immünglobulin (Ig) görülmez, mezangial ve/veya endokapiller proliferasyon gibi hücresele çoğalma bulguları saptanmaz ²⁸. Birincil MN'yi ikincil gruptan ayırmak tedavi ve izlem açısından büyük önem taşır, bu yüzden tanısal biyopsinin doğru okunması önem arz eder (Tablo 2).

Tablo 2. Birincil ve İkincil Membranöz Nefropati'de Ayırıcı Histopatolojik Özellikler

Birincil	İkincil
İmmünfloresan Mikroskopi	
IgG4> IgG, IgG3	IgG1, IgG3> IgG4
IgA ve IgM görülmez	IgA ve IgM görülebilir
C1q zayıf veya negatiftir	C1q pozitifdir
PLA2R pozitif ve IgG ile eş-yerleşimli	PLA2R negatif
Mezangial Ig boyanması yoktur	Mezangial Ig boyanma pozitif olabilir
Elektron Mikroskopi	
Sadece subepitelyal depozitler ± nadir mezangial depozit	Subepitelyal ± mezangial ± subendotelyal depozitler

Birincil MN’de başlatıcı etken bilinmediğinden, hastalığın patogenezi uzun yıllar boyunca Heymann’ın deneysel nefrit modeli üzerinden açıklanmıştır. 1959’daki ilk çalışmada Lewis sıçanları, böbreklerinin tübül hücrelerini içeren bir homojenatla aktif immünize edilmişlerdir²⁹. Deneysel nefrit modeli oluşturulduktan sonra hastalık biyopsi serileri ile incelenmiş ve ortaya çıkan nefropatinin insan MN’sindeki IM, İF ve EM triadı ile benzer histopatolojik özellikler gösterdiği görülmüştür. Önceleri dolaşan immün kompleks hastalığı olduğu zannedilse de; insanın tübül hücrelerini içeren antijenik bileşim sıçanlara enjekte edildiğinde, deney hayvanlarının serumlarındaki ve glomerüllerindeki immün komplekslerin farklı olduğu gözlenmiştir. İn situimmün birikim oluşumunun görülmesi ile de otoimmün bir işleyişin varlığı anlaşılmıştır. Devam eden araştırmalarda heterolog antikorlarla da Heymann nefriti oluşturulmuştur; böylelikle hastalık sürecinde hücrel immünitenin başlıca bileşen olmadığı kanıtlanmıştır³⁰. Uzun yıllar insan biyopsi bulguları ile benzer şekilde, sıçan GBM’ında subepitelyal immün depozitlerle aynı yerleşimde IgG ve kompleman birikimi gösterilebilmiştir³¹. Deneysel nefrit modelinde 1980’lerde, subepitelyal immün komplekslerdeki hedef antijen ‘Megalin’ isminde, LDL reseptör ailesinden transmembran bir protein olarak açıklandı^{32,33}. Ancak Heymann nefritinde iki önemli nokta insan MN’sinden farklı özelliktedir ve insandaki patogenezi açıklamada yetersiz kalmıştır. Birincisi, deneysel modelde incelenen IgG alt tipleri komplemanı klasik yoldan aktive edebilen IgG1, IgG2 ve IgG3’ü içermektedir ve klasik kompleman yolu aktivasyonunda kullanılan C1q’nun da pozitif boyanması bu duruma eşlik etmektedir. Oysaki aynı yıllarda insan birincil MN’sinde, İF ile IgG4’ün diğer IgG alt tiplerinden daha baskın boyandığını, C1q’nun eser miktarda saptandığını gösteren çalışmalar yayımlanmıştır³⁴. İkincisi, deneysel modelde açıklanan antijenik hedef molekül ‘megalin’ insanda immün birikim oluşumunda neden olarak değil, sonuç bulgularından biri olarak gözlemlenmiştir.

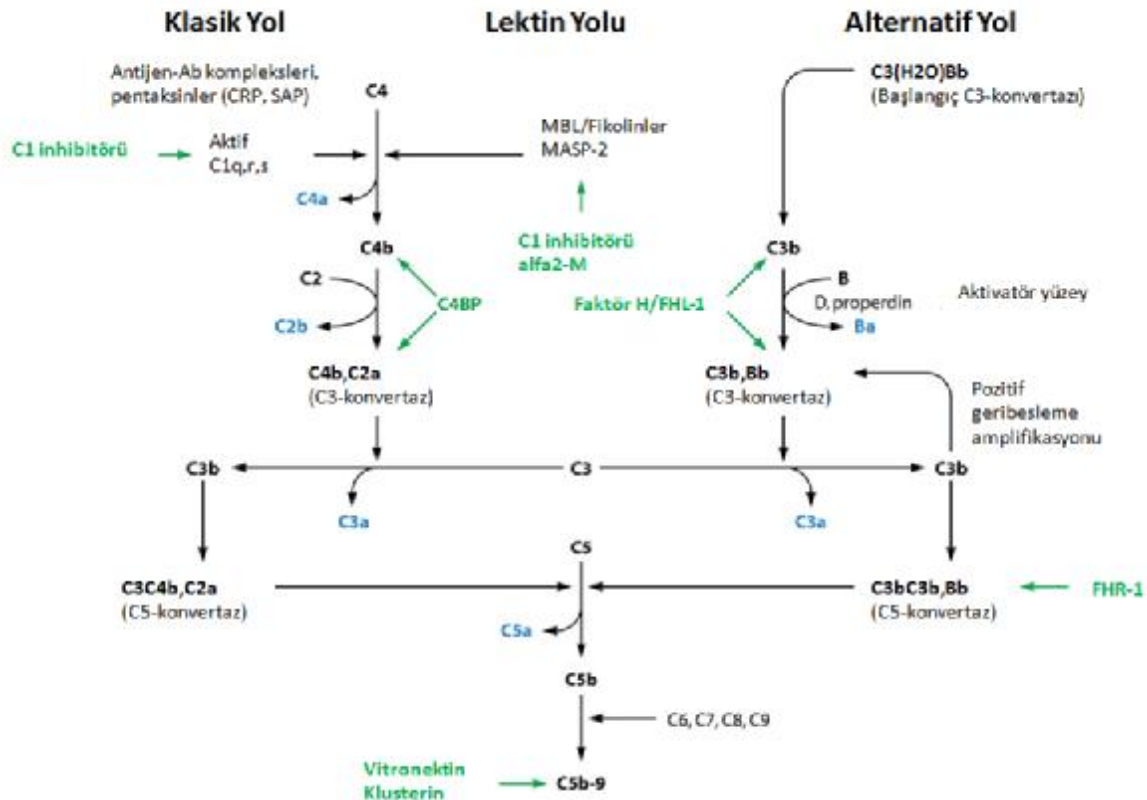
İnsan birincil MN etiopatogenezine tekrar yoğunlaşıldığında, 2001’de Debiec ve arkadaşları nötral endopeptidaz defektli anneden doğan MN’li bir yenidoğan vakası yayımladılar³⁵. Podosite özgü bu enzimden defektli olan anne, enzim aktivitesi normal olan fetüse karşı antikor geliştirmiştir ve transplasental yoldan hastalık oluşturmuştur. Bu vaka özgün antijen arayışlarını hızlandırmıştır. 2009’da Beck ve Bonegio birincil MN’li ve diğer otoimmün glomerülonefrit’li olgulardan ve normal kontrollerden elde ettiği serumlarla, normal insan glomerülünden elde edilen protein özlerine karşı Western blotlama yöntemi ile immün reaksiyon oluşturmuşlardır²⁴. Reaktif protein bantlarını Mass Spektrometri yöntemi ile analiz ederek özgün antikor ile birlikte hedef antijenin yerini ve kimliğini belirlemişlerdir.

Bu çalışmada 37 birincil MN'nin 26'sında (%70) hedef antijen, GBM dış yüzeyindeki podosite özgü 'membran fosfolipaz A2' reseptörü (PLA2R) olarak tanımlanmıştır. Tanımlanan hedef antijen mannoz reseptörü ailesinin bir üyesidir ³⁶. Beck ve arkadaşlarının çalışmasında anti-PLA2R antikorlarının geneli IgG4 alt tipinde saptanmış olup eser miktarda diğer IgG alt grup aktivitesi ölçülmüştür. Çalışmanın benzerleri başka ülkelerde de uygulanmıştır ve serum anti-PLA2R büyük oranda nicel değerlerle ölçülebilmektedir ³⁷⁻³⁹. Hastalık aktivitesi ile korelasyon gösterdiğinden son bir kaç yılda, hastalık izleminde hatta nakil olmuş birincil MN'li olgularda söz konusu antikorların kullanılabileceğini gösteren çalışmalar artmıştır ⁴⁰⁻⁴². Ancak anti-PLA2R antikorlarının klinikte kullanılmasında standardizasyona yönelik farklı ırklardan daha geniş sayıda olguya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

2.3 C4d ve Membranöz Nefropati

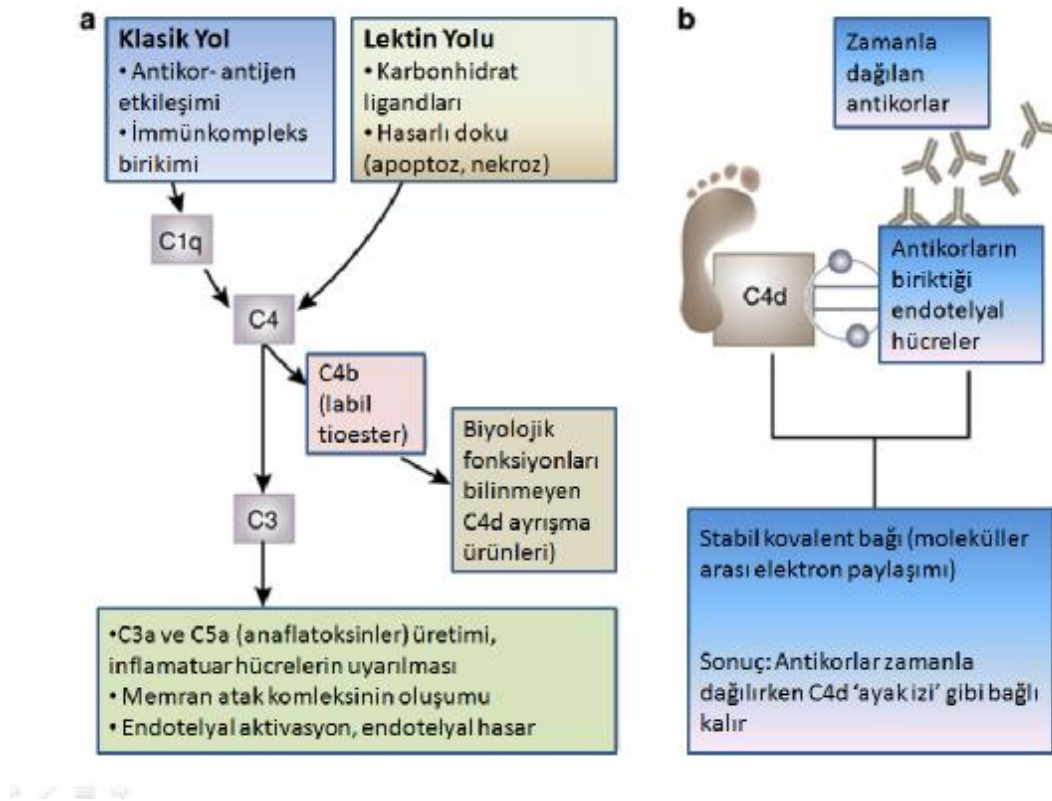
Kompleman sistemi glomerülonefritlerin çoğunda aktive olmaktadır. Kompleman ürünleri, doğal immün sistemin bir parçası olan sayıca 30 kadar proteinden oluşmaktadırlar. Bir kez aktive olduklarında kendi kendine etkinliğini sürdürebilen bir şelale oluşturmaları ve düzenleyici proteinler araya girene dek ortamda hedef ayırt etmeden sitotoksik hasar meydana getirirler. Kompleman sistemi üç yoldan aktive edilir, bunlar: klasik yol, lektin bağımlı yol ve alternatif yoldur. Klasik yol, kompleman proteinlerinden C1q'nun immün komplekslerdeki immünglobulinlerin Fc parçasına bağlanması ile başlatılır. Lektin yolu C1q ile aynı görevi gören Mannoza Bağlayıcı Lektin (MBL) aracılığıyla başlatılır. Alternatif yol ise immün komplekslerden bağımsız olarak polisakkarid antijenler, polimerik IgA, hasarlı hücreler ve bakteriyel ürünlerle aktive edilir. Her üç yolda 'C3 konvertaz' denilen ara ürün oluşur ve kompleman aktivitesi C5, C6, C7, C8 ve C9'un katıldığı son ortak yola ilerler. C4 molekülü C3 konvertaz'ı oluşturacak şekilde klasik ve lektin yollarında kullanılırken; alternatif yola katılmaz. C1q ise kompleman sisteminde sadece klasik yolun başlatıcısı olarak kullanılmaktadır. (Şekil 1).

Şekil 1. Kompleman Sisteminin Şematik Gösterimi



C4d, kompleman sisteminin klasik ve lektin yollarında kullanılan C4 molekülünün bir yan ürünüdür. Son 20 yılda nakil böbrekte antikor aracılıklı rejeksiyonu göstermesiyle ön plana çıkmıştır⁴³. Ortama diğer yan ürünler gibi zayıf bağlarla değil de tiyoester gibi kovalent bağlarla bağlandığından aynı mikroçevrede uzun süre tespit edilebilmektedir. Bu nedenle ‘humoral immünitenin ayak izi’ olarak anılmıştır (Şekil 2).

Şekil 2. Kompleman Sisteminde C4d Molekülünün Rolü⁴³



C4d molekülünün araştırma sahalarına antikor ile kompleman hasarının izleri sürülen sistemik otoimmün hastalıklar, gebelik kayıpları, böbrek hastalıkları da katılmıştır. Bu süreçte C4d'nin glomerulonefritleri kapsayan çeşitli patoloji çalışmalarında lektin bağımlı yolla ilişkisi gündeme getirilmiştir⁴⁴.

Birincil MN için bu molekülün yeri ilk olarak Kusunoki ve arkadaşlarının 1989'da direkt İF ile 12 birincil MN olgusunda 11 (%92) pozitif boyanma elde etmeleri ile anlaşılmıştır¹⁹. Bu çalışmada klasik yolun başlatıcısı C1q'nun, 12 olgunun sadece 2'sinde (%16) pozitif boyandığı da gözlenmiştir. Ancak o yıllarda lektin yolu bilinmediğinden bu durum klasik kompleman yoluna atfedilmiştir. Günümüzde İF çalışma için yeterli doku kalmadığında ve elektron mikroskopisine ulaşılamadığında bile C4d, birincil MN'in tanısal biyopsisinde

immünohistokimyasal yöntemlerle ve retrospektif olarak geçerliliğini göstermiştir. Val-Bernal ve arkadaşlarının 2011’de yayımladığı çalışma buna örnektir ²⁰. Bu çalışmada direkt İF bakılamamış, formalinle tespit edilmiş, parafine gömülü ve sonuçta tekrar İF uygulanamayacak olan biyopsi kesitleri retrospektif olarak ele alınmıştır. Söz konusu biyopsi kesitlerinde poliklonal C4d antikorları ile çalışılmıştır ve MN’li hastaların %100’ünde pozitif boyanma saptandığından çalışma immünohistokimyasal bir tanı yöntemi olarak yeterli bulunmuştur. İspanyol Espinosa ve ekibi ise, 2012’deki çalışmalarında İF için taze biyopsi kesiti kalmadığında erken evre MN ile minimal değişiklik hastalığının ayırıcı tanısının yapılamamasından yola çıkmışlardır ²¹. C4d antikoru, minimal değişiklik ve birincil MN biyopsilerinde immünohistokimyasal yöntemle geriye dönük olarak çalışmışlardır. Çalışmada minimal değişiklik grubunun tamamında C4d negatif, birincil MN grubunun tamamında ise pozitif bulunmuştur. Japonya’da 2010 yılında, pediatrik olguların global ve segmental MN olarak ayrıldığı daha farklı bir çalışma yayımlanmıştır. Bu çalışmada İF yöntemi kullanılarak her iki kolda çeşitli immünglobulinler, faktör B ve kompleman ürünleri karşılaştırılmış; segmental MN’li çocuklarda klasik yolun, global MN’li çocuklarda ise alternatif ve lektin yolların özgün ara ürünlerinin ön planda biriktiği gösterilmiştir.⁴⁵. Ancak bu çalışma, taze biyopsi kesitlerinde direkt IF yönteminin kullanılmasının yanısıra prospektif olarak planlanmıştır. Ayrıca yetişkinlerde birincil MN’de glomerülün segmental tutulumu çocuklara göre daha seyrektr.

Birincil MN’de klasik yolun başlatıcısı olan C1q glomerüllerde nadiren saptanırken, kompleman yolunun ara ürünlerinden C4d hemen her zaman saptanmaktadır. C4d komplemanın klasik ve lektin yollarında ortaya çıkar. Ancak bu durumun, IgG alt tiplerinden klasik yolu aktiveleştirme gücü en zayıf olan IgG4 ile ilişkisi uzun süre açıklanamamıştır. IgG4 galaktozdan fakir ve N-asetil glukozaminden zengin Fc kısımlarına sahiptir, böylelikle mannoz reseptörlerinden biri olan membran PLA2R’si ile etkileşime girebilmektedir ve bu sayede hem serumda hem de biyopsilerde saptanabilmektedir ⁴⁶⁻⁴⁸. Bu noktada yazarların vardığı en yaygın görüş, IgG4’ün zamanla mannoz bağlayıcı lektin (MBL) etkisi göstererek komplemanı lektin yolu üzerinden aktive ettiğidir. Ancak hastalık patogenezinde başlangıçtan ileri evrelere kadar sadece IgG4’ün üretilmediğini, başlangıçta IgG1 üretimiyle komplemana bağlı sitotoksikite oluşup, sonradan yardımcı T hücreleri aracılığıyla B hücrelerinin IgG4 üretimini arttırdığını gösteren yayınlar da mevcuttur ^{49,50}. Literatürde C4d ile birincil MN birlikteliğini araştıran çalışmalar bulunmasına rağmen, C4d’nin prognoz üzerinde etkisi olup olmadığını inceleyen bir çalışma yayımlanmadığı görülmektedir.

2.4 Epidemiyoloji, Klinik Özellikler ve Hastalık Seyri

Birincil MN nadir görülen bir hastalıktır, ancak tüm ırklarda ve geniş bir yaş grubunda görülebilir. Birincil glomerülofritlerin 20 yıllık insidansına yönelik geniş bir coğrafyayı kapsayan bir çalışmada birincil MN, IgA nefropatisinden sonra ve fokal segmental glomerüloskleroz ile ilk üç sırada bulunmuştur ^{51,52}. Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Avustralya, Ortadoğuyu kapsayan çalışmada hastalığın yıllık görülme oranı 1.2/100.000 olarak saptanmıştır ⁵¹. Çocuklarda tüm glomerülofritler içerisinde MN oranı %5'in altındadır ve birincil MN bu dilimin içinde %25'i oluşturmaktadır ^{53,54}. Birincil MN'nin erkeklerde kadınlardan iki kat daha fazla görüldüğünü destekleyen yayınlar mevcuttur. Ayrıca erkek cinsinde daha şiddetli klinik başvuru olduğu da gösterilmiştir ³. Beyaz ırkta birincil MN, siyah ırka göre daha sık olarak; Asya ve Uzakdoğu toplumlarına göre ise daha ağır bulgularla ortaya çıkmaktadır ^{2,6,14}. Tepe görülme yaşı yaşamın 4. ve 5. dekadlarıdır. Birincil MN'de proteinüride minimal değişiklik hastalığı veya fokal segmental glomerüloskleroz kadar gürültülü bir başlangıç olmayabilmektedir. Başvuru esnasında kreatinin değerindeki yükseklikler, genellikle uzamış ve yoğun proteinüri ile birlikte gelişen tübulo-interstisyel hasara veya ileri yaşa bağlıdır ⁵⁵. Hastalığın başlangıcında genellikle hipertansiyon gelişmez ancak önceden varsa böbrek sağkalımını olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir ¹³. İdrarda proteinüri seçici değildir ve makroskopik hematüri eşlik etmez. Birincil MN ailesel kalıtılan bir hastalık değildir, ancak özellikle membran-PLA2R'nin tanımlanması ile önce Kore'de sonra İskandinav ülkelerinde geniş gen haritası çalışmaları yapılmıştır ^{56,57}.

Membranöz nefropati diyabetik olmayan beyaz ırk toplumlarında nefrotik sendromun en önde gelen nedenlerindendir ¹. Nefrotik sendrom kliniği ile başvuranlarda kardiyovasküler hastalık riski 4-5 kat; venöz trombo-emboli görülme sıklığı diğer birincil nefrotik glomerülopatilere göre daha çok artmıştır ^{58,59}. 30 yıl önce tedavi edilmemiş olgularda, 5 yıllık izlemlerde %30 oranında kendiliğinden sönmeler görülmüş, ancak aynı olgular uzun süreli izleme alındığında 10 ve 15 yıl sonra alevlenmeler ve SDBY'ne gidişte artış gözlenmiştir ⁷⁻⁹. Japonya'da yapılan bir çalışmada ise ileri histopatolojik biyopsi bulgularına rağmen tedaviye yanıt ve remisyon oranlarının Batı ülkelerdeki benzer başvuru özellikleri olan hastalara göre daha iyi olduğu saptanmıştır ¹⁴. Bugüne kadarki çalışmalara göre ne histopatolojik bulgular, ne de proteinüri yoğunluğu ve süresi hastalığın bir daha tekrar edip etmeyeceğini öngörmede kriter olmamaktadır. Tekrarlama durumunun değerlendirilmesinde şimdilik tek istisna anti-PLA2R antikorları gibi görünmektedir. Kötü seyre dair işaretler tek tek değil, olabildiğince

birlikte ele alınmakta; bağışıklığı baskılayıcı tedavi veya konvansiyonel koruyucu tedavi seçiminde klinik, laboratuvar ve histopatolojik veriler bütüncül olarak değerlendirilmektedir (Tablo 3).

Tablo 3. Membranöz Nefropatide Kötü Böbrek Sağkalımı ile İlişkili Etkenler

Etkenler	Öngördürücü
<i>Klinik Özellikler</i>	
Yaş	Yaşlı> genç
Cinsiyet	Erkek> kadın
HLA tipi	HLA/B18/DR3 varlığı
Hipertansiyon	Var> yok
<i>Serum Seviyeleri</i>	
Albumin	<1,5 g/dl
Kreatinin	Normalin üzerinde
<i>İdrar Proteini</i>	
Nefrotik sendrom	Var
Proteinüri	>6 ay süre ile>8 g/gün
IgG atılımı	>250 mg/gün
Beta-2 mikroglobulin atılımı	>0,5 µg/dakika
C5b-9 atılımı	>5 U/ml
<i>Biyopsi Değişiklikleri</i>	
Glomerüler fokal skleroz	Var
Tübülointerstisyel hastalık	Var

2.5 Tedavi Yaklaşımı

Birincil MN'de tedavi yaklaşımları, hastalığın SDBY'ne ilerlemesini durdurmaya ve tekrarlama ihtimalini ortadan kaldırmaya yönelik ampirik modelleri kapsamaktadır. Nefrotik düzeyde olmayan proteinüri ile tanı alan hastalarda, ilk 2 yılda nefrotik sendroma ilerleme ihtimali yüksektir ⁶⁰. Bu bilgiler ışığında düzenlenen rehberlerde tedavi, olguların düşük riskli, orta riskli ve yüksek riskli olmasına göre düzenlenmiştir. Buna göre serum kreatinin değerleri normal olan ve 4 g/gün'ün altında proteinürisi olanlarda diyet, anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ve anjiotensin reseptör blokerleri (ARB) ile etkin kan basıncı kontrolü, ayrıca serum kolesterolünün sıkı kontrolü önerilir. Proteinürisi 4-8 g/gün arasındakilerde ise bağışıklık baskılayıcı ilaçlara karar vermede konservatif tedavi ile kontrol edilemeyen proteinüriye, hastalıkta geçen süreye, kreatinin değerindeki artışa ve hayatı tehdit eden komplikasyonların varlığına bakılır. Proteinürisi 8 g/gün veya üzerinde olan olgularda ACE ve ARB etkisi beklenmeden bağışıklığı baskılayan ilaç kombinasyonları tercih edilmektedir ¹². Son yıllarda nefrotik düzeyde, hatta 5 g/gün ve üzeri proteinürilerde sadece ACE inhibitörleri ve ARB kombinasyonunun yetersiz kaldığını gösteren yayınlar da mevcuttur ^{61,62}.

Bağışıklığı baskılayıcı ilaç rejimlerinde alkileyici ajan (siklofosfamid, klorambusil) ve steroid ikilisi en yaygın kabul gören ilk tedavi seçenekleridir. İlk tedaviye direnç veya ilaçları tolere edememe halinde yine sayılı ajan denenmiş; kalsinörin inhibitörleri ve sentetik Adrenokortikotropin hormonu (ACTH) ile yanıtlar alınmıştır ^{63,64}. ACTH uygulaması literatürde sınırlıdır; kalsinörin inhibitörleri ile ise hızlı sönme sağlanabilmesine rağmen ilaç bırakıldığında diğer tedavilere göre daha sık hastalık tekrarı yaşanmaktadır. Mevcut tedavi kalıplarında steroid kullanım süresi de hastalıkta sönme hızı ile ilişkili olarak hayli uzun tutulmuştur, bu da hastaları kortikosteroid yan etkilerine açık hale getirmektedir. Genel yaklaşım olarak ilk alevlenmede tekrar edilmesi önerilen başlangıç tedavisi, ikinci alevlenmede değiştirilir. Bir çalışmada kalsinörin inhibitörleri kullanımı ile yeniden hastalık kontrolü sağlanamamış olgularda humoral immünitenin etkisi de düşünülerek anti Cd-20 monoklonal antikor olan Ritüksimab uygulanmış, daha geç de olsa sönme elde edilmiştir; ancak Ritüksimab'ın uzun dönem etkileri bilinmemektedir ⁶⁵. Tanı anında glomerüler filtrasyon hızı (GFR) değeri düşük olup bağışıklığı baskılayıcı ilaç uygulanan olgularda ilaç toksisitesine bağlı tübülointerstisyel hasar gelişme ihtimali yüksektir. Bugüne kadar intrinsik antijene antikor saldırısı ile geliştiği ve organa özgü otoimmün bir hastalık olduğu kabul

edilen birincil MN’de, özellikle komplemanın son ürünü olan C5b-9’un biyopsilerde ve idrarda proteinüri yoğunluğu ile korelasyon gösterdiği anlaşılmıştır ⁶⁶. Buradan yola çıkarak hedefe yönelik tedaviler de gündeme gelmiştir. Hedefe yönelik ilaç olarak anti-C5 monoklonal antikoru Eculizumab (Soliris®) ile 16 haftalık bir çalışma 200 hasta üzerinde yürütülmüş ancak plaseboya göre proteinüride ve renal fonksiyonlarda fark görülemeyince durdurulmuştur. Bu çalışmada etkin dozun kullanılıp kullanılmadığı konusunda soru işaretleri bulunmaktadır. Birincil MN için hedefe yönelik tedavi arayışları sürmektedir ve immün kompleks oluşumuna eşlik eden baskın kompleman yolunun aydınlatılmasına yönelik kavrayış çabaları da bu nedenle sürmektedir.

2.6 Sonuç

Günümüzde birincil MN populasyonunun %70’i, ELISA gibi tekniklerle anti-PLA2R’nin niteliksel ve niceliksel olarak gösterilmesi sayesinde belirlenebilmektedir. Ancak tedavi stratejisi açısından ve hastalığın öngörülmesi zor ilerleyişi açısından tanı değerlendirmesinde böbrek biyopsisi vazgeçilmeyen unsurdur. C4d hem tanı anında taze dokularda IF ile hem de parafine gömülü dokularda immünohistokimyasal tekniklerle geriye dönük olarak gösterilebilmektedir. Hastalığın tüm aşamalarında klasik yol üzerinden değilse bile; birincil MN’de kompleman aktivitesi belli hasarlara yol açmaktadır. Araştırmamız, kliniğimizde birincil MN tanısı olarak izlenmiş vakalarda, böbrek biyopsilerinde C4d gibi bir ‘ayak izi’ üzerinden birikimsel olarak, kompleman aktivasyonu ile hastalık ilerleyişi ve ağırlığı arasındaki ilişkiyi geleneksel risk faktörleri ile karşılaştırarak değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Hipotezimiz, yoğun C4d birikiminin hastalıkta ilerleme ve azalmış böbrek sağkalımı ile ilişkili olduğu yönündedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışması, Dokuz Eylül Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Karar No: 2014/05-19 1028-Girişimsel Olmayan Araştırmalar). Etik kurul onayı sonrası Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne yazılı başvuru ile bütçe desteği talebinde bulunulmuştur. Hastaların böbrek biyopsilerinin boyanması, klinik verilerle ilgili geçmiş değerlendirmelerin yeniden gözden geçirilmesi ve tüm verilerin çalışma amacına uygun şekilde değerlendirilmesi için DEÜTF'nin sırasıyla Nefroloji, Patoloji ve Arşiv kayıt bölümlerinin yazılı olarak izinleri alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen hastalar DEÜTFH Nefroloji Bilim Dalı Glomerülonefrit Polikliniği'ne davet edilerek, önceden alınmış olan böbrek biyopsi materyallerinden C4d boyanması ve hastalık öyküsüne ilişkin bilgilerin kullanılması konusunda kendilerinden gönüllü bilgilendirilmiş olur formu alınmıştır.

3.1 Hastalar

2005 ile 2014 yılları arasında DEÜTF Patoloji Anabilim Dalı tarafından değerlendirilen böbrek biyopsileri sonucunda membranöz glomerülonefrit tanısı almış ve DEÜTF Nefroloji Bilim Dalı tarafından etyolojileri araştırılıp birincil MN tanısı konularak takip ve tedavi edilmiş olan 18 yaş ve üzeri hastalar bu araştırmaya dahil edilmiştir. (Tablo 4)

Tablo 4. Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri

Biyopsi yeterlilik kriterlerini karşılayan (en az 3 sklerotik olmayan glomerül dokusu) hastalar
18 yaş ve üzeri
Böbrek biyopsisi merkezimizde elde edilmiş ve değerlendirilmiş
Biyopsi incelemesi ve klinik değerlendirme sonucu birincil membranöz nefropati tanısı almış

Çalışmamıza Kidney Disease Improvement Global Outcome (KDIGO) 2012 kılavuzunda da belirtilen ikincil MN olguları ve ayrıca biyopsi yeterlilik kriterlerini karşılamayan biyopsi örnekleri dahil edilmemiştir (Tablo 5).

Tablo 5. Araştırmadan Dışlama Kriterleri

Otoimmün/romatolojik hastalıklar:
Sistemik lupus eritematozus
Romatoid artrit, Sjögren sendromu, mikst konnektif doku hastalığı, sistemik skleroz
Ankilozan spondilit, dermatomiyozit, temporal arterit
Hashimoto tiroiditi, myastenia gravis, bullöz pemfigoid
Crohn hastalığı, Graft-versus-host hastalığı, sarkoidoz
Enfeksiyonlar:
Hepatit B, Hepatit C, edinilmiş immün yetmezlik sendromu (AIDS)
Malarya, şistosoma, sifiliz, hidatik kist, lepra
Kanserler:
Karsinomlar (akciğer, özefagus, kolon, meme, böbrek, over, prostat, orofarinks ...vb.)
Karsinom olmayanlar (Hodgkin lenfoma, Non-Hodgkin lenfoma, kronik lenfositik lösemi, melanom, hepatik adenom, Wilm's tümörü, schwannoma, nöroblastom, mezotelyoma ...vb)
İlaç/toksin maruziyeti (steroid olmayan yangı gidericiler, lityum, altın tuzları ...vb)
En az 2 yıl öncesinden biyopsiye kadar Tip II diabetes mellitus tanısı almış hastalar
Tip I diabetes mellitus
Polikistik böbrek hastalığı
Orak hücreli anemi
Primer biliyer siroz

Hastaların DEÜTF hasta arşivinde yer alan dosyaları demografik, klinik ve histopatolojik veriler açısından retrospektif olarak incelenmiştir (Tablo 6-7). C4d boyanması açısından olgular boyanma derecesine göre ve ayrıca boyanma paternine göre ayrı ayrı gruplandırılarak; Tablo 6'da ve Tablo 7'de belirtilen veriler açısından söz konusu gruplar kendi içlerinde karşılaştırılmışlardır.

Tablo 6. Araştırmada Değerlendirilen Demografik ve Klinik Veriler

Demografik veriler (tanı anında)
Yaş
Cinsiyet
Takip süresi
Klinik veriler
Proteinüri (<4 g/gün, 4-8 g/gün, ≥8 g/gün olarak 3 ayrı sınıflandırma) (tanı anında; 3. ayda, 6. ayda ve en son)
Serum kreatinin düzeyi (mg/dl) (tanı anında; 3. ayda, 6. ayda ve en son)
Glomerüler filtrasyon hızı (MDRD'ye göre) (tanı anında, 3. ayda, 6. ayda ve en son)
Serum albumin düzeyi (<2,5 g/dl veya ≥2,5 g/dl olarak) (tanı anında, 3. ayda, 6. ayda ve en son)
Hipertansiyon (≥140/90 mm kan basıncı değeri veya antihipertansif tedavi varlığı)
Tedavide ACE inhibitörü/ARB ilaç kullanımı
Tedavide ACE inhibitörü/ARB ilaç ile birlikte bağışıklığı baskılayıcı ilaç rejimi varlığı
İzlemde serum kreatinin düzeyinde iki katına çıkma süresi
İzlemde kreatinin klirensinde %50 azalma için geçen süre
Renal replasman tedavisi varlığı

Tablo 7. Araştırmada Değerlendirilen Histopatolojik Veriler

Histopatolojik veriler (tanı anında)
Işık mikroskopisinde:
Bazal membranlarda kalınlaşma (0: normal, 1: hafif, 2: orta, 3: belirgin)
Mezangial hipersellülarite (0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli)
İnterstisyel enflamasyon (0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli)
İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi (İF-TA) dereceleri (0: yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli)
Glomerüler skleroz yüzdesi (segmental ve global)
Arteriyel ve arteriyoller çeperlerde kalınlaşma(0: normal, 1: hafif, 2: belirgin)
İmmünfloresan çalışma ile:
Glomerüler bazal membranda IgG, IgA, IgM, Ig kappa, Ig lambda, C1q ve C3 birikimleri (0: negatif, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli)
Glomerüler bazal membranda immünhistokimyasal yöntem ile C4d birikimi (boyanma derecesine göre 0: negatif, derece 1: ince granüler, derece 2: kalın granüler, derece 3: kaba depozit şeklinde) (boyanma paternine göre segmental/global ve diffüz/fokal olarak)
Glomerüler C4d birikim derecesi ile paterni arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunması halinde segmental/global çarpan skoru eklenmesi (C4d boyanma derecelerinin her hastada C4d boyanma paterni ile segmental boyanmaya 1 ve global boyanmaya 2 puan verilerek çarpımı)

Her hasta için böbrek biyopsisi zamanı izlemin başlangıcı olarak kabul edilmiştir. Çalışmaya dahil edilme kriterlerine uygun olan hastaların DEÜTF Patoloji Anabilim Dalı tarafından önceden değerlendirilmiş olan böbrek biyopsilerinde tanı aşamasında histopatolojik bulgularda ışık mikroskopisi için Hematoksilen-Eozin, Masson-trikrom, Periyodik Asit-Schiff ve methenamin gümüş boyaları kullanılmış; immünfloresan analiz için IgG, IgA, IgM,kappa ve lambda ile C1q ve C3 proteinlerine karşı antikorlar kullanılmıştır. Biyopsi kesitlerinde İF inceleme ile bazal membran boyunca granüler veya kaba desende IgG'nin ön planda birikim göstermesi ve C1q birikiminin hafif veya negatif boyanması durumunda C3'ün eşlik etmesinden bağımsız olarak membranöz nefropati tanısı konulmuştur.

3.2 C4d boyaması ve histopatolojik incelemeler

Araştırmaya dahil edilen hastaların biyopsi örnekleri C4d kiti (Cell Marque ®; C4d SP91, California, ABD) ile yeniden boyanmıştır. Bunun için formalinle fikse edilmiş ve parafine gömülü dokulardan hazırlanan 3 mikrometrelilik kesitler Benchmarck Ultra cihazında, ultraview universal Dab detection kit kullanılarak boyandı. Ultra CCI solusyonunda 64 dakika 95 derecede antijen retrieval (antijen geri kazanımı) yapıldı. C4d primer monoklonal antikoru (Cell Marque, C4d-SP91) uygulanarak 32 dakika inkübe edildi. Daha sonra biyopsiler C4d boyanma yoğunluğuna göre ve C4d boyanma paternine göre değerlendirildi.

İmmünohistokimyasal boyanma sonucunda C4d boyanma yoğunluğu (derecesi);

- GBM'in %25'inde veya daha azında boyanma: 0,
- GBM'de ince granüler boyanma: derece 1,
- GBM'de kalın granüler boyanma: derece 2,
- GBM'de kaba depozitler şeklinde boyanma: derece 3 olarak belirlenmiştir.

İmmünohistokimyasal incelemede boyanma yoğunluğu yanısıra C4d dağılım paterni;

- diffüz/fokal (biyopsi örneğinde tüm glomerüllerin %50'sinden azının veya çoğunun pozitif boyanmasına göre)
- segmental/global (biyopside bir glomerülün içindeki %50'den az/çok pozitif boyanmaya göre) olmasına göre değerlendirilmiştir²⁰. Boyanma paterni ile boyanma derecesi arasında istatistiksel anlamlı ilişki bulunması halinde segmental/global çarpan skorunun da değerlendirilmesi planlanmıştır.

3.3 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken istatistiksel analiz için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı kullanılmıştır; p değerinin 0,05'ten küçük saptanması durumunda söz konusu bulgular istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Sayısal verilerin analizi için ki-kare testi ve Fisher kesin testi; ölçümle belirlenen değişken analizi için Mann-Whitney U testi ve korelasyon analizi ile değerlendirme yapılmıştır. Ancak hasta sayısının az olması nedeniyle istatistiksel anlamlılığa ulaşılması açısından, C4d birikimi olmayan ve hafif derecede birikim olan hastalar ile orta ve şiddetli derecede birikim olan hasta grupları birleştirilerek yeniden analiz yapılmıştır. Söz konusu gruplarda da Mann-Whitney U testi, ki-kare testi ve Fisher kesin testi kullanılmıştır. İstatistiksel analiz yöntemlerine ilişkin planlamalar DEÜTF Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı ile görüşülerek belirlenmiş; analizler birlikte yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Demografik veriler

Araştırmamızda DEÜTFH bünyesinde renal biyopsi uygulanmış ve klinik izlemde tutulmuş 50 hastadan klinik dosya-arşiv verilerine göre, ikincil MN nedenleri ortaya çıkan 27 hasta ve arşiv biyopsilerinde yetersiz doku görülen 3 hasta çalışma dışı bırakılmıştır. Bu nedenlerle çalışmamıza 20 hasta dahil edilmiştir. Değerlendirilen 20 hastanın %55'i (n=11) erkek; %45'i kadın (n=9) olarak belirlenmiştir. Erkeklerde yaş ortalaması 48.90 yıl; kadınlarda 51.33 yıl olarak belirlenmiştir. Tüm hastaların tanı anındaki yaş ortalamaları 50 yıl (en küçük 34, en büyük 72 yıl) olarak saptanmıştır. Hastaların ortalama izlem süresi 43.75 ay (en kısa 6 ay, en uzun 130 ay) olarak kaydedilmiştir.

4.2 Klinik veriler

Tanı konulduğu sırada hastaların %40'ında (n=8) hipertansiyon olduğu görülmüştür. Hastaların ortalama proteinüri değeri tanı sırasında 8.036 g/gün ile ağır düzeyde saptanmıştır. Tanıda ağır düzeyde proteinüri oranı %50 (n=10), orta düzeyde proteinüri oranı %15 (n=3) ve hafif düzeyde proteinüri oranı ise %35 (n=7) olarak kaydedilmiştir. Hastaların %30'unda (n=6) tanı anında ağır düzeyde hipoalbuminemi saptanmıştır. Tüm hastalarda serum kreatinin düzeyi ortalaması 0.88 mg/dl; GFR ortalaması 92.14 ml/dk/1.73 m² (MDRD) olarak belirlenmiştir.

Hastaların hepsinde ACE inhibitörü ve/veya ARB ilaç verildiği, bağışıklık baskılayıcı tedavilerin ise hastaların %55'ine (n=11) uygulandığı kaydedilmiştir. Bağışıklık baskılayıcı tedavi modellerinden alkilleyici ajan içeren klorambusil-metilprednizolon (n=1) ve siklofosfamid-metilprednizolon (n=2), kalsinörin inhibitörü içeren siklosporin-metilprednizolon(n=5) kombinasyonlarının tercih edildiği; 2 hastaya ise sadece metilprednizolon verildiği saptanmıştır. Bağışıklığı baskılayıcı ilaç verilen hastaların %81.8'inde (n=9) tanı sırasında ağır derecede proteinüri düzeyleri kaydedilmiştir.

Hastaların hiçbirinde gereklilik oluşmadığından renal replasman tedavisi uygulanmadığı belirlenmiştir. Çalışmamızda, hastalarda izlem süresince kreatinin düzeyleri iki katına çıkmadığından ve GFR düzeylerinde %50 azalma izlenmediğinden renal sağkalım analizi yapılamamıştır. Hastaların tanı sırasındaki genel profili Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Araştırmaya Dahil Edilen Birincil Membranöz Nefropati Hastalarının Biyopsi Zamanındaki Profili

Hasta kohortu		Klinik bulgular				Işık mikroskopi bulguları							İmmünofloresan bulgular						C4d boyanma derecesi/ paterni/(S)	İzl süre (ay)	Tedavi
Hasta no/C	Yaş	HT	Pr	Kr	Kkl	Alb	Bazal memb	Mezan hipersel	İF/TA	İnt Enf	Skleroz (%)S/G	Art/artrl duvar k	IgG	IgA/IgM	C3	C1q	Kappa/ lambda				
1 K	67	Var	7800	0.93	60	3.2	+++	+	+/+	+	0/0	+/++	2	0/0	0	0	1/1	2/G (4)	50	Cyc+Ste	
2 E	57	Var	2460	1.01	76	2.8	N	+	+/-	-	5/0	N/N	2	1/0	1	0	3/3	0 (0)	75	ACEi/ARB	
3 K	58	Yok	10.000	0.73	82	3.4	+++	+	+/+	+	0/0	+/+	2	0/0	0	0	2/2	3/G (6)	64	Kl+Ste	
4 K	40	Yok	4990	0.47	147	2.77	+	N	+/-	-	0/0	+/N	1	0/0	1	0	1/1	3/G (6)	8	ACEi/ARB	
5 E	51	Yok	1780	1.21	63.2	3.91	++	+	+/+	+	0/0	N/+	3	1/1 ^Δ	1	0	3/3	1/G (2)	17	Ste	
6 E	46	Var	16000	1.29	60	1.8	++	++	++/+	+	16.6/5	+/+	3	0/0	0	0	2/2	1/S (1)	70	Csa+Ste	
7 E	34	Var	2550	1.47	55	4.4	+++	N	+/+	-	18.1/63.6	+++	1	0/0	1	0	1/1	1/S (1)	60	ACEi/ARB	
8 K	48	Var	3800	0.8	77	3.2	+	N	+/+	-	0/9	+/+	1	0/0	0	0	1/1	0 (0)	62	ACEi/ARB	
9 E	48	Yok	2510	0.72	117	2.3	+++	N	++/+	-	0/12.5	N/N	3	0/1	1	0	3/3	1/S (1)	59	ACEi/ARB	
10 K	51	Yok	8270	0.44	160	2.39	++	N	+/+	+	0/2.8	+/+	2	0/0	0	0	0/0	2/G (4)	8	ACEi/ARB	
11 E	72	Yok	1420	0.81	94	3.75	+++	N	+/+	+	0/9	+/+	3	0/1 ^Δ	1	0	1/1	3/G (6)	7	ACEi/ARB	
12 E	48	Yok	22890	0.65	131	2	+++	N	+/+	+	0/0	+/N	3	0/0	0	0	0/1	2/G (4)	44	Csa +Ste	
13 K	48	Yok	7800	0.56	116	2.9	++	+	+/-	-	0/2.9	N/+	3	0/1 ^Δ	1	0	2/2	2/G (4)	40	ACEi/ARB	
14 K	57	Yok	8160	0.79	75	3.5	+++	N	+/+	+	7.1/0	++/+	3	0/2	2	0	2/2	1/S (1)	27	Csa +Ste	
15 K	43	Yok	2410	0.57	116	2.9	++	+	+/+	-	0/3.2	*N	1	0/0	0	0	0/0	3/G (2)	37	Ste	
16 E	44	Yok	15200	1.64	46	2.9	++	N	+/+	+	0/9	+/N	3	0/0	2	1	1/2	2/G (4)	130	ACEi/ARB	
17 E	48	Var	13000	1.33	57	2.3	++	+	+++	++	0/0	+/+	2	0/0	2	0	2/2	2/G (4)	46	Csa +Ste	
18 E	44	Var	8250	0.71	128.7	2	N	+	+/+	+	0/0	+/+	2	0/0	0	0	1/1	1/S (1)	20	Csa +Ste	
19 K	50	Var	11500	0.75	82	2.5	++	+	+/+	+	0/7.6	++/+	1	0/0	0	*	*/*	3/G (6)	6	Ste	
20 E	46	Yok	9930	0.83	100	3.2	+++	+	+/+	+	28.5/0	+++	3	2/1	1	1	2/3	1/S (1)	45	Ste	

C, cinsiyet; HT, hipertansiyon varlığı (≥140/90 mmhg hipertansiyon var; <140/90 mmhg hipertansiyon yok);

Pr, proteinüri (mg/gün); Kr, serum kreatinin düzeyi (mg/dl); Kkl, kreatinin klerensi MDRD'ye göre (ml/dk/1.73m²); Alb, serum albumin düzeyi (g/dl);

Bazal memb, bazal membranda kalınlaşma (N: normal bazal membran, + hafif kalınlaşma, ++ orta düzeyde kalınlaşma, +++ belirgin kalınlaşma);

Mezan hipersel, mezangial hipersellülarite (N: normal mezangium, + hafif derecede hipersellüler, ++ orta derecede hipersellüler, +++ şiddetli derecede hipersellüler);

İF/TA, interstisyel fibrozis/tübüler atrofi dereceleri (+ hafif, ++ orta, +++ şiddetli); İnt Enf, interstisyel enflamasyon (+ hafif derecede, - enflamasyon yok);

Skleroz (%)S/G, segmental sklerozlu glomerül yüzdesi/global sklerozlu glomerül yüzdesi;

Art/artrl duvar k, arteriyel/arteriolar duvar kalınlığı artışı (N: duvar kalınlığı normal, + hafif derecede kalınlaşma, ++ belirgin kalınlaşma); direkt İF'de IgG, IgA, IgM, Ig kappa, Ig lambda, C3, C1q boyanma dereceleri 0: negatif, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli derecelerde boyanma;

İmmünohistokimyasal C4d boyanmasında derece 1 ince granüler, derece 2 kalın granüler, derece 3 kaba depozit şeklinde; C4d boyanma paterni S:diffüz-segmental; G: diffüz-global; (S), segmental-global C4d boyanması çarpan skoru;

Cyc, siklofosfamid; Ste, steroid; Kl, klorambusil; ACEi, anjiyotensin enzim inhibitörü; ARB, anjiyotensin reseptör blokleri; Csa, siklosporin (bağışıklığı baskılayıcı ilaç uygulanan hastaların hepsine ACEi/ARB ilaç verilmiştir.).

(*) 15 no.lu hastanın biyopsisinde arter görülmemiştir; 19 no.lu hastanın biyopsisinde C1q, kappa ve lambda boyanması için yeterli doku kesiti elde edilememiştir. (^Δ) 5, 11 ve 13 no.lu hastalarda hafif IgM boyanması sadece mezangiumda görülmüştür.

4.3 Histopatolojik veriler

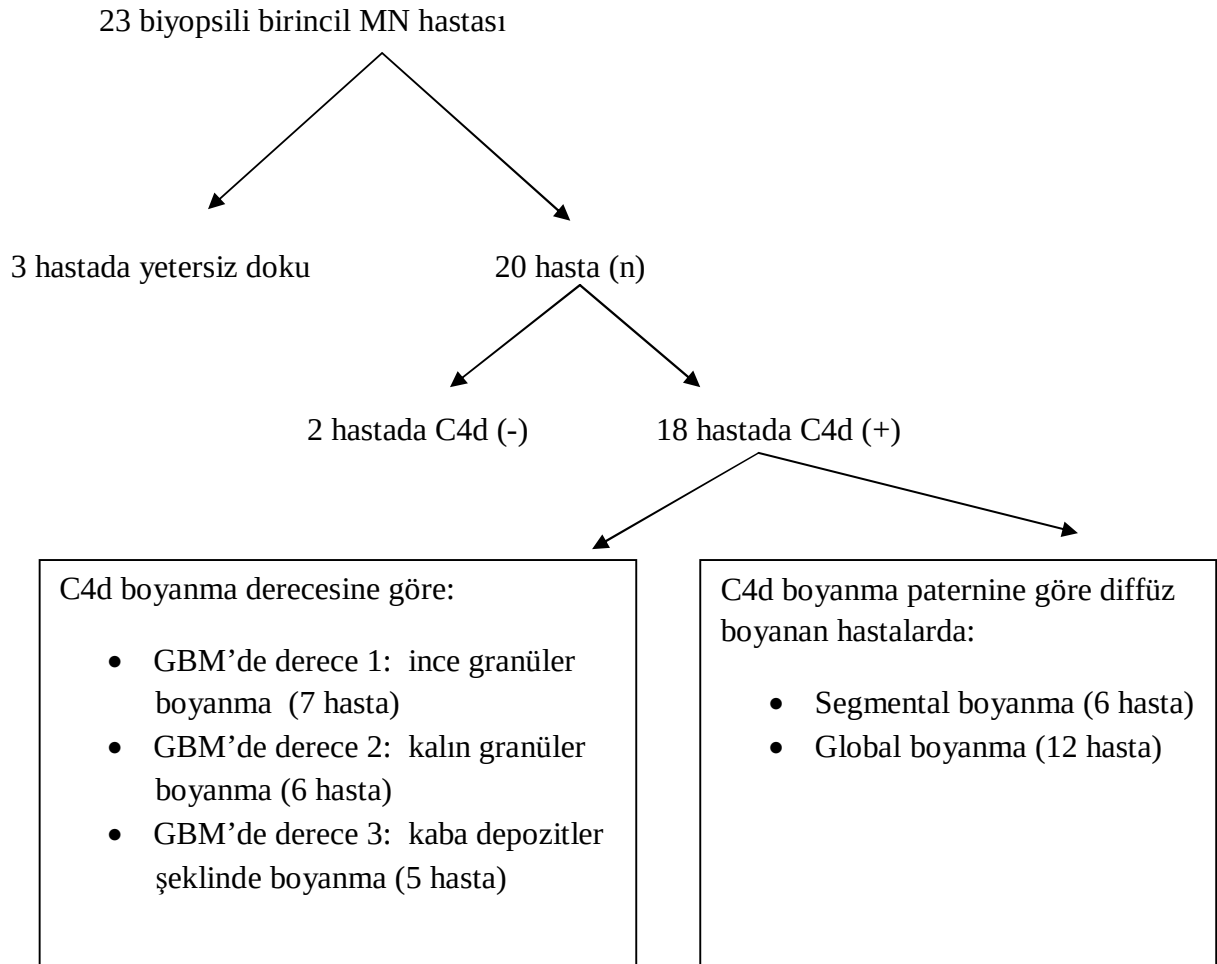
Işık mikroskopi bulgularından GBM kalınlığı hastaların %20'sinde (n=4) normal ve hafif kalınlaşmış olarak görülürken, %80'inde orta ve belirgin derecelerde GBM kalınlaşması (n=16) izlenmektedir. Tüm hastalarda tübüler atrofi-interstisyel fibrozis geliştiği ve en çok %85 oranla hafif düzeyde interstisyel fibrozis saptandığı (n=17) dikkati çekmiştir. İnterstisyel fibrozis derecesi %5 oranında (n=1) şiddetli derecede saptanmıştır; ayrıca 6 hastada tübüler atrofi derecesinden bir derece yüksek olarak kaydedilmiştir. Hastalarda %45 oranında (n=9) hafif düzeyde mezangial sellülarite artışı kaydedilmiştir, orta düzeyde mezangial sellülarite artışı ise %5 (n=1) oranında saptanmıştır. Biyopsilerin %65'inde (n=13) en az bir global veya segmental skleroz varlığı (n=13) kaydedilmiştir; bu hastalar arasında %10'luk dilim hem global hem segmental, %20 segmental glomerüloskleroz ve %45 ise global tipte glomerüloskleroz içermektedir. Beklendiği üzere, hastalardan hiçbirinde endokapiller/ekstrakapiller proliferasyon gözlenmemiştir. İnterstisyel enflamasyon tüm hastaların %65'inde (n=13) sadece hafif derecede olarak kaydedilmiştir, hepsinde enflamasyon türü lenfosit ağırlıklıdır. Arter duvarında kalınlaşma hastaların %75'inde (n=15) ve arteriyol duvarında kalınlaşma ise hastaların %70'inde (n=14) kaydedilmiştir.

Direkt İF bulgularına bakıldığında, hastaların tümünde GBM'de IgG birikimi rapor edilmiştir. IgG birikimi glomerülün tamamını kapsayacak şekilde global paternde, biyopsi kesitindeki glomerüllerin hepsini kapsayacak şekilde diffüz paternde ve granüler tarzda olarak kaydedilmiştir. Hastaların %55'inde (n=11) GBM'de C3 birikimi de IgG'ye eşlik etmektedir. Diğer immünglobulinlerden IgA ile IgM boyanmaları da sırayla hastaların %35'inde (n=7) orta ve hafif derecelerde kaydedilmiştir. C1q boyanmasına bakıldığında, hastaların %10'unda (n=2) hafif derecede olarak saptandığı görülmüştür. Kappa ve lambda hafif zincir proteinlerinin birikimi hastalarımızın tümünde IgG boyanma derecesini aşmayacak şekilde saptanmıştır. Yine kappa ve lambda birikiminin hastaların %85'inde (n=17) eşit derecelerde olduğu kaydedilmiştir (Tablo 8).

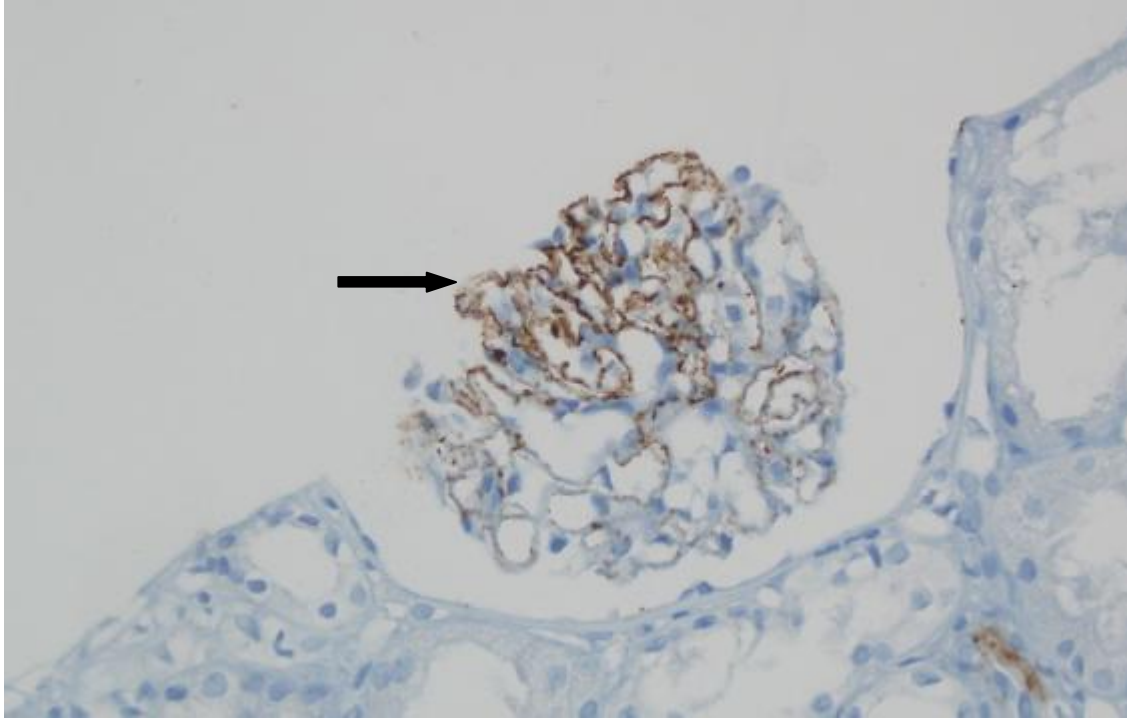
4.4 Glomerüler bazal membranda C4d boyanması

GBM’de C4d ile pozitif boyanma hastaların %90’ında (n=18) saptanmış olup, 2 hastada negatif boyanma görülmüştür. Pozitif boyanan biyopsilerden de C4d boyanma yoğunluğu açısından 7 hastada GBM’da ince granüler boyanma (derece 1), 6 hastada GBM’de kalın granüler boyanma (derece 2), 5 hastada kaba depozit şeklinde boyanma (derece 3) görülmüştür. C4d pozitif boyanan biyopsilerin tümü diffüz boyanma özelliği göstermektedir. Ayrıca 12 biyopside global paternde, 6 biyopside segmental paternde boyanma gözlenmiştir (Şekil 3) (Resim 1, 2 ve 3).

Şekil 3. Glomerüler C4d Boyanması Açısından Genel Hasta Profili

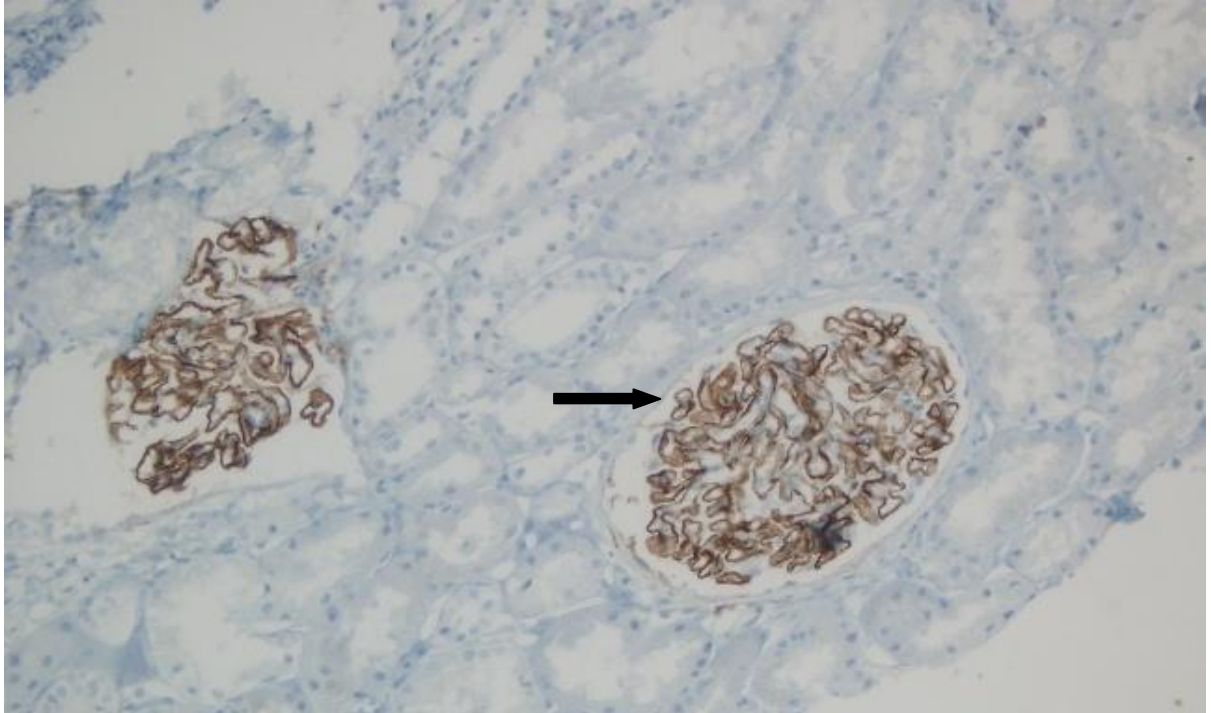


Resim 1. Glomerülde Segmental PaterndeC4d Boyanması



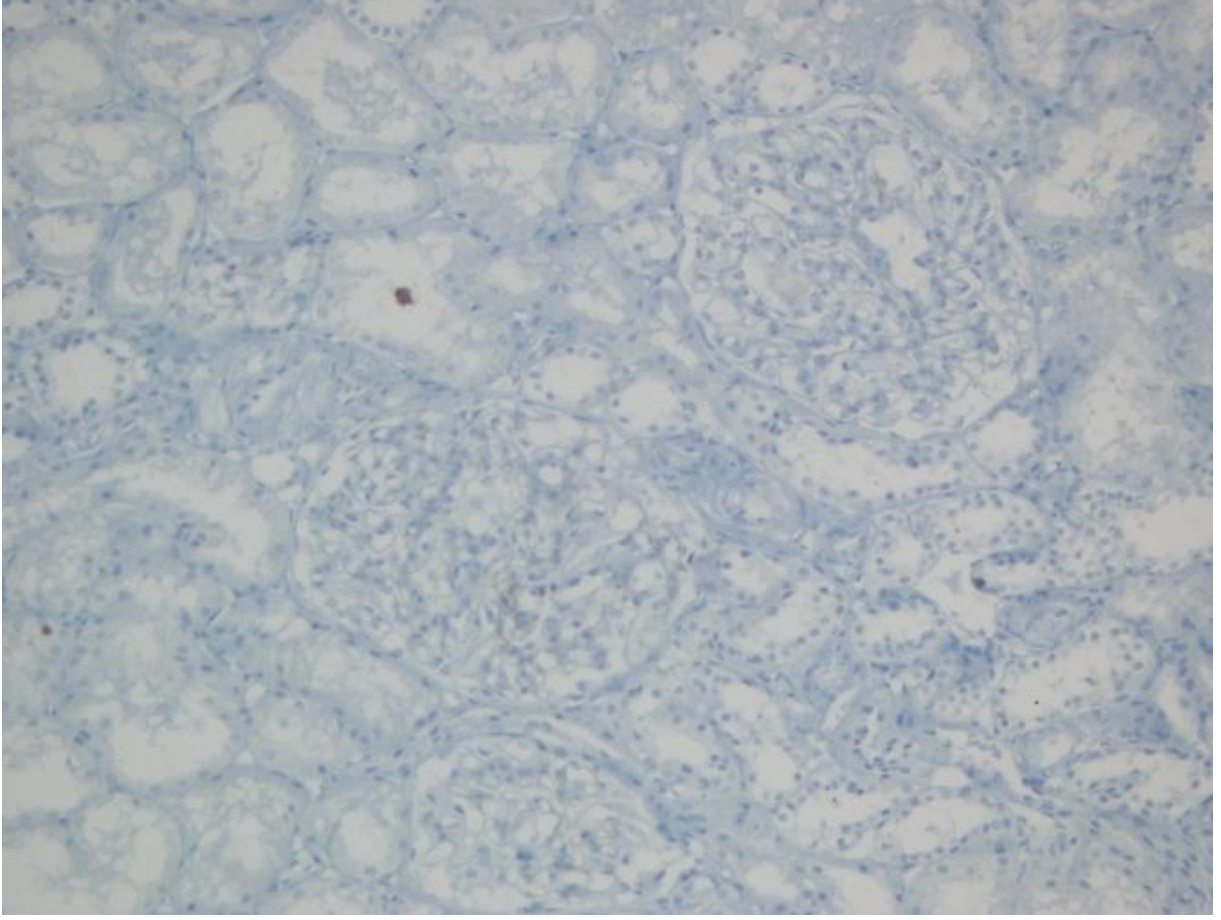
Resimde glomerüler bazal membranda kalın granüler (derece 2) ve segmental paternde C4d boyanması görülmektedir (kalın ok). Yer yer mezangial C4d boyanması da eşlik etmektedir.

Resim 2. Glomerülde Global Paternde C4d Boyanması



Glomerüllerin bazal membranlarında kalın granüler (derece 2) ve global paternde C4d boyanması görülmektedir (kalın ok)

Resim 3. Glomerülde Negatif C4d Boyanması



C4d boyanması negatif olan olguda ışık mikroskopi ile bazal membran dış yüzeyi de normal görülmektedir

4.4.1 C4d boyanma derecesinin histopatolojik bulgularla birlikteliği

Çalışmaya dahil edilen hastaların %80'inde C4d boyanması pozitif (n=18) ve %10'unda ise negatif (n=2) saptanmıştır. Hastalar boyanma derecesi açısından negatif ve hafif derecede boyananlar (n=9) ile orta derecede ve şiddetli derecede (n=11) boyananlar olarak gruplandırılmıştır. Söz konusu gruplandırma istatistiksel analiz başlığında da bahsedildiği üzere az sayıda hastada çeşitli verilerin korelasyonunun, istatistiksel çerçevede incelenmesi adına oluşturulmuştur. İki grup arasında demografik, klinik ve histopatolojik veriler karşılaştırılmıştır. Işık mikroskopi bulgularına bakıldığında, C4d negatif ve hafif derecede boyanan grubun segmental skleroz yüzdesi ile istatistiksel açıdan anlamlı birliktelik gösterdiği bulunmuştur (p=0.017). C4d orta-şiddetli derecede boyanan grupta ise hiç segmental skleroz bulunmadığı ve glomerülosklerozun global tipte olduğu saptanmıştır. Öte yandan yine negatif ve hafif derecede C4d birikimi olan grupta orta-şiddetli derecede C4d birikimi olan gruba göre, istatistiksel anlamlılığa ulaşmamakla birlikte global skleroz yüzdesinde de daha yüksek ortalama değeri saptanmıştır. Orta ve şiddetli derecede C4d boyanan grupta ise negatif ve hafif derecede C4d boyananlara göre bazal membran kalınlaşmasında daha ileri evreler (11 hastadan 9'unda orta düzeyde ve belirgin bazal membran kalınlaşması), daha çok sayıda hastada arter duvarında kalınlaşma (11 hastadan 9'unda) ve interstisyel enflamasyon varlığı da (11 hastadan 8'inde) istatistiki düzeye ulaşmamakla birlikte dikkat çekicidir. Işık mikroskopi bulgularından interstisyel enflamasyon hastaların tümünde iki kategoride (interstisyel enflamasyon yok ve hafif derecede var olarak) kaydedildiğinden istatistiksel olarak ki-kare testine göre analiz yapılmıştır ve bu nedenle tabloda gösterilmemiştir. İnterstisyel enflamasyon ve C4d arasında da anlamlı birliktelik saptanamamıştır (p=0.642).

Direkt immünfloresan bulgularına bakıldığında, negatif-hafif derecede C4d boyanan grupta, orta-şiddetli derecede C4d boyanan gruba göre IgA birikiminin ve kappa ile lambda proteinleri birikiminin birlikteliği istatistiksel anlamlı olarak daha fazla (p değeri sırasıyla p=0.044, p=0.029, p=0.049) bulunmuştur. C4d orta-şiddetli derecede boyanan grupta IgA birikimi kaydedilmemiştir. C4d boyanması ile IM bulgularının birlikteliği Tablo 9'da, C4d boyanması ile direkt İF bulgularının birlikteliği Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 9. C4d Boyanma Derecesinin Işık Mikroskopi Bulguları ile Birlikteliği

	C4d negatif-hafif derecede boyanma (n=9)		C4d orta-şiddetli derecede boyanma (n=11)		p değeri
	Ort ± St s	Med (min-maks)	Ort ± St s	Med (min-maks)	
Bazal membran kalınlığı	1.88 ± 1.26	2.00 (0.00-3.00)	2.27 ± 0.64	2.00 (1.00-3.00)	0.684
İnterstisyel fibrozis	1.11 ± 0.33	1.00 (1.00-2.00)	1.18 ± 0.60	1.00 (1.00-3.00)	0.942
Tübüler atrofi	0.88 ± 0.33	1.00 (0.00-1.00)	3.13 ± 0.53	1.00 (0.00-2.00)	0.957
Global skleroz yüzdesi	10.01 ± 20.63	0.00 (0.00-63.60)	3.13 ± 3.71	2.80 (0.00-9.00)	0.807
Segmental skleroz yüzdesi	5.22 ± 7.41	0.00 (0.00-18.10)	0.00 ± 0.00	0.00 (0.00-0.00)	0.017*
Mezangial sellülarite	1.66 ± 0.70	1.00 (0.00-2.00)	0.45 ± 0.52	0.00 (0.00-1.00)	0.520
Arter duvar kalınlığı^Ω	1.00 ± 0.86	1.00 (0.00-2.00)	1.00 ± 0.47	1.00 (0.00-2.00)	0.990
Arteriyol duvar kalınlığı	1.00 ± 0.70	1.00 (0.00-2.00)	0.42 ± 0.64	1.00 (0.00-2.00)	0.374

Bazal membran kalınlığı 0: normal, 1: hafif kalınlaşma, 2: orta düzeyde kalınlaşma, 3: belirgin kalınlaşma olarak 0-3 arasında;

İnterstisyel fibrozis 0: yok, 1: hafif derecede, 2: orta derecede ve 3: ağır derecede olarak 0-3 arasında;

Tübüler atrofi 0: yok, 1: hafif derecede, 2: orta derecede, 3: ağır derecede olarak 0-3 arasında derecelendirilmiştir.

Global skleroz yüzdesi biyopsi örneğindeki global sklerozlu glomerül sayısının tüm sklerotik glomerül sayısına oranı ile;

Segmental skleroz yüzdesi ise biyopsi örneğindeki segmental sklerozlu glomerüllerin sayısının tüm glomerül sayısına oranı ile elde edilmiştir.

Mezangial sellülarite 0: normal, 1: hafif artmış, 2: orta derecede artmış, 3. Şiddetli derecede artmış olarak 0-3 arasında,

Arter ve arteriyol duvar kalınlıkları 0: normal duvar kalınlığı, 1: hafif kalınlaşmış, 2: belirgin derecede kalınlaşmış olarak derecelendirilmiştir.

n hasta sayısını; **Ort**, ortalama değeri; **±St s**, standart sapmayı; **Med**, median değeri, **Min-maks**, minimum-maksimum dereceleri göstermektedir.

(^Ω) C4d orta-şiddetli derecede boyanan grupta bir hastanın biyopsi örneğinde arter izlenmemiştir.

*Tablo Mann-Whitney U testinden uyarlanmış olup; **Segmental Skleroz yüzdesi**'nde elde edilen istatistiksel p değeri Fisher kesin testi ile elde edilmiştir. (p<0.05).

Söz konusu p değeri segmental sklerozun, C4d orta-şiddetli derecede boyanan gruba göre C4d negatif ve hafif derecede boyanan grup ile daha fazla birlikte olduğunu göstermektedir.

Tablo 10. C4d Boyanma Derecesinin Direkt İmmünfloresan Bulguları ile Birlikteliği

	C4d negatif-hafif derecede boyananlar (n=9)		C4d orta-şiddetli derecede boyananlar (n=11)		p değeri
	Ort ± St s	Med (Min-maks)	Ort ± St s	Med (Min-maks)	
IgG	2.33 ± 0.70	3.00 (1.00-3.00)	2.09 ± 0.83	2.00(1.00-3.00)	0.488
IgA	0.44 ± 0.72	0.00 (0.00-2.00)	0.00 ± 0.00	0.00 (0.00-0.00)	0.044*
IgM	0.55 ± 0.72	0.00 (0.00-2.00)	0.18 ± 0.40	0.00 (0.00-1.00)	0.185
C3	0.77 ± 0.66	1.00 (0.00-2.00)	0.63 ± 0.80	0.00 (0.00-2.00)	0.563
C1q^Ω	0.11 ± 0.33	0.00 (0.00-1.00)	0.10 ± 0.31	0.00 (0.00-1.00)	0.939
Kappa^Ω	2.00 ± 0.86	2.00 (1.00-3.00)	1.00 ± 0.81	1.00 (0.00-2.00)	0.029*
Lambda^Ω	2.11 ± 0.92	2.00 (1.00-3.00)	1.20 ± 0.78	1.00 (0.00-2.00)	0.049*

İmmünglobulin G, A, M ile C3 ve C1q, ayrıca kappa ile lambda proteinlerinin dereceleri 0-3 arasında belirlenmiştir (o: birikim yok, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli derecede birikim)
n hasta sayısını; **Ort**, ortalama değeri; **±St s**, standart sapmayı; **Med**, median değeri, **Min-maks**, minimum-maksimum dereceleri göstermektedir.
(^Ω) C4d orta ve şiddetli derecede boyanan grupta bir hastada immünfloresan inceleme için yeterli doku kalmadığından C1q, kappa ve lambda gösterilememiştir.

*Tablo Mann-Whitney U testinden uyarlanmış olup, IgA, Kappa ve Lambda için anlamlı p değerinin elde edilmesinde Fisher kesin testi kullanılmıştır (p< 0.05).

Söz konusu p değerleri, IgA ile kappa ve lambda proteinlerinin C4d negatif ve hafif derecede boyanan grupta C4d orta-şiddetli derecede boyanan gruba göre daha fazla bulunduğunu göstermektedir.

4.4.2 C4d boyanma derecesinin demografik, klinik veriler ve laboratuvar izlem verileri ile birlikteliği

C4d boyanma derecesi ile yaş, cinsiyet ve izlem süresi arasında istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşan birliktelik saptanmamıştır. Negatif ve hafif derecede C4d boyanması görülen grup ile orta ve ağır derecede C4d boyanması görülen grup karşılaştırıldığında; tanı ve izlemde serum kreatinin düzeyi, kreatinin klerensi (MDRD), serum albumin düzeyi ve 24 saatlik idrar proteini açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Tedavide bağırsıklığı baskılayıcı ilaç varlığı ile de C4d'nin artan şiddette boyanma derecesinin istatistiksel anlamlılıkta birlikteliği saptanmamıştır ($p=0.684$). Demografik veriler ile klinik ve laboratuvar izlem verilerinin, C4d boyanma derecesine göre negatif-hafif derecede boyanan grup ile C4d orta-şiddetli derecede boyanan gruplar arasında karşılaştırılması Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. C4d Boyanma Derecesine Göre Demografik Verilerin ve İzlemdaki Klinik ve Laboratuvar Verilerin Değerlendirilmesi

	Çalışmada Değerlendirilen Hastalar					C4d negatif-hafif derecede boyananlar					C4d orta-şiddetli derecede boyananlar					p değeri
	Ort	N	± St s	Min	Maks	Ort	N	± St s	Min	Maks	Ort	N	± St s	Min	Maks	
Yaş (yıl)	50.00	20	8.78	34.00	72.00	47.88	9	6.99	34.00	57.00	51.7	11	10.01	40.00	72.00	0.515
İzlem (ay)	43.75	20	30.21	6.00	130.00	48.33	9	21.98	17.00	75.00	40.000	11	36.23	6.00	130.00	0.210
Pr0	8036.00	20	5681.00	1420.00	22890.00	6160.00	9	4798.50	1780.00	16000.00	9570.90	11	6094.37	1420.00	22890.00	0.270
Pr3	3086.00	20	2814.77	90.00	10760.00	3373.33	9	3828.02	90.00	10760.00	2850.90	11	1787.58	220.00	4770.00	0.543
Pr6	2662.50	20	2777.53	260.00	10250.00	3228.88	9	3456.34	670.0	10250.0	2199.0	11	2139.14	260.0	7240.00	0.543
PrSON	1019.47	19	1776.20	50.00	7240.00	613.75	8	473.55	80.00	1400.00	1314.54	11	2300.00	50.00	7240.00	0.649
Kr0	0.88	20	0.33	0.44	1.64	0.98	9	0.27	0.71	1.47	0.80	11	0.37	0.44	1.64	0.138
Kr3	0.84	20	0.28	0.39	1.65	0.91	9	0.31	0.65	1.65	0.79	11	0.26	0.39	1.33	0.342
Kr6	0.82	20	0.29	0.37	1.48	0.89	9	0.29	0.58	1.48	0.76	11	0.30	0.37	1.43	0.382
KrSON	0.87	20	0.32	0.37	1.56	0.94	9	0.27	0.67	1.56	0.82	11	0.36	0.37	1.51	0.210
GFR0	92.14	20	33.18	46.00	160.00	83.54	9	25.94	55.00	128.70	99.18	11	37.84	46.00	160.00	0.361
GFR3	94.03	20	30.53	48.00	184.00	91.73	9	27.15	48.00	124.64	95.90	11	34.24	58.00	184.00	0.790
GFR6	100.41	20	37.84	54.00	184.00	96.82	9	37.36	54.00	167.44	103.35	11	39.78	54.00	184.00	0.761
GFRson	91.33	20	36.61	48.00	184.00	84.28	9	26.48	50.00	124.00	97.09	11	43.64	48.00	184.00	0.704
Alb0	2.87	20	0.70	1.80	4.40	2.94	9	0.91	1.80	4.40	2.81	11	0.50	2.00	3.75	0.650
Alb3	3.47	20	0.71	2.10	5.20	3.60	9	0.94	2.10	5.20	3.35	11	0.46	2.30	4.10	0.849
Alb6	3.72	20	0.59	2.63	4.90	3.92	9	0.72	3.00	4.90	3.56	11	0.43	2.63	4.10	0.287
AlbSON	3.98	19	0.67	2.38	5.00	4.08	8	0.50	3.02	4.65	3.90	11	0.79	2.38	5.00	0.254

Pr0, (mg/gün) başlangıçtaki; Pr3, 3. ayda; Pr6, 6. ayda; PrSON, izlemde son vizitteki proteinüri düzeyini göstermektedir.

Kr0, (mg/dl) başlangıçtaki; Kr3, 3. ay; Kr6, 6. ay; KrSON, izlemde son vizitteki serum kreatinin düzeyini göstermektedir.

GFR0, (ml/dk/1.73 m²) başlangıçtaki; GFR3, 3. aydaki; GFR6, 6. aydaki; GFRson, izlemde son vizitteki glomerüler filtrasyon hızını göstermektedir.

Alb0, (g/dl) başlangıçta; Alb3, 3. ayda; Alb6, 6. ayda; AlbSON, izlemde son vizitteki serum albumin düzeylerini göstermektedir.

Yaş, yıl cinsinden; İzlem süresi ay cinsinden gösterilmiştir.

Tabloda her p değeri demografik veriler (yaş, izlem süresi) ile klinik ve laboratuvar (24 saatlik idrarda protein miktarı, serum kreatinin düzeyi, kreatinin klerensi [GFR'ye göre] ve serum albumin düzeyi) izlem verilerinin negatif ve hafif derecede C4d boyanan grup ile orta-şiddetli derecede C4d boyanan grup arasında karşılaştırılması ile elde edilen istatistiksel sonucu göstermektedir.

4.4.3 Hastaların segmental ve global paternde C4d boyanma özelliğine göre değerlendirilmesi

Araştırmamızda 18 diffüz C4d boyanması gösteren hastalarımızdan 6'sında segmental ve 12'sinde global paternde C4d dağılımı vardır. Bu hasta grupları demografik, klinik ve histopatolojik parametrelerde farklılık olup olmaması açısından karşılaştırıldılar. Segmental ve global paternde C4d boyanan gruplar arasında histopatolojik veriler karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık kaydedilmemiştir. Sadece C4d birikim derecesi, global paternde segmental paterne göre istatistiksel anlamlı ölçüde yüksek ($p=0.001$) saptanmıştır (Tablo 12).

Tablo 12. C4d Boyanma Paterni ile C4d Boyanma Yoğunluğu Arasındaki İlişki

	Negatif (n=2)	Segmental patern (n=6)	Global patern (n=12)	p değeri
C4d negatif-hafif derecede boyananlar (n=9)	%22.2 (n=2)	%66.7 (n=6)	%11.1 (n=1)	
C4d orta-şiddetli derecede boyananlar (n=11)	%0.0 (n=0)	%0.0 (n=0)	%91.7 (n=11)	0.001*

*Tablo Mann-Whitney U testinden uyarlanmış olup istatistiksel anlamlı p değeri için ki-kare testi kullanılmıştır ($p<0.01$). Söz konusu p değeri global paternde boyanmanın, C4d'nin orta-ağır derecede boyandığı grup ile segmental paternde boyanmaya göre daha fazla birlikte bulunduğunu göstermektedir.

C4d boyanma derecesinin global paternde C4d boyanan grupta istatistiksel anlamlılıkla yüksek saptanması üzerine, hastalar boyanma paternine de puan verilerek boyanma paterni ile boyanma derecesi çarpımına göre de değerlendirilmişlerdir. Segmental paternde boyanmaya bir, global paternde boyanmaya iki puan verilerek boyanma dereceleri ile çarpıldığında hastalarda 0,1,2,3,4 ve 6 olarak değişen skorlar elde edilmiştir. Segmental/global çarpan skorunun C4d orta-ağır derecede boyanan grupta istatistiksel anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.01$) (Tablo 13).

Tablo 13. C4d Boyanma Yoğunluğunun Segmental/Global Paternde Boyanma Çarpan Skoru ile Birlikteliği

		C4d negatif-hafif derecede boyananlar	C4d orta-şiddetli derecede boyananlar	p değeri
Segmental/global paternde boyanma ve C4d derece çarpanı	Ort ± St s	0.88 ± 0.60	4.54 ± 1.29	<0.01*
	Med (Min- maks)	1.00 (0-2)	4.00 (2-6)	

n hasta sayısını; **Ort**, ortalama değeri; **±St s**, standart sapmayı; **Med**, median değeri, **Min-maks**, minimum-maksimum dereceleri göstermektedir.

*Tablo Mann-Whitney U testinden uyarlanmış olup, segmental/global boyanma ve C4d derecesi çarpan skoru için anlamlı p değeri Fisher kesin testi kullanılarak elde edilmiştir (p<0.01). Söz konusu p değeri segmental/global paternde boyanma çarpan skorunun orta-şiddetli derecede C4d boyanması ile daha fazla birlikte bulunduğunu göstermektedir.

Segmental ve global paternde C4d boyanmasına göre oluşturulan iki grupta tanı sırasındaki demografik, klinik ve histopatolojik verilere bakıldığında istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşan farklılık saptanmamıştır. İzlemdaki klinik ve laboratuvar verilere bakıldığında iki grup arasında yine istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Ancak proteinüri hafif (<4 g/gün), orta (4-8 g/gün), ağır (≥8 g/gün) olarak kategorize edilerek karşılaştırıldığında; izlemin 3. ayındaki proteinüri derecesi C4d'nin global paternde boyandığı grupta segmental paternde boyandığı gruba göre istatistiksel anlamlılık düzeyinde yüksek saptanmıştır (p=0,027). Proteinüri derecesindeki bu farklılık başlangıçta, 6. ayda ve izlemin sonunda ortaya çıkmamıştır. Global ve segmental paternde C4d boyanmasına göre klinik izlem parametrelerinin karşılaştırılması Tablo 14'te gösterilmiştir.

Tablo 14. Segmental ve Global Paternde C4d Boyanmasına Göre İzlemdeki Klinik Laboratuvar Verilerin Değerlendirilmesi

		Pr3 (n=18) (mg/gün)	Pr6 (n=18) (mg/gün)	PrS (n=17) (mg/gün)	Kr3 (n=18) (mg/dl)	Kr6 (n=18) (mg/dl)	KrS (n=17) (mg/dl)	GFR3 (n=18) (ml/dk/1.73m ²)	GFR6 (n=18) (ml/dk/1.73m ²)	GFRs (n=17) (ml/dk/1.73m ²)	Alb3 (n=18) (g/dl)	Alb6 (n=18) (g/dl)	AlbS (n=17) (g/dl)
Segmental paterne (n=6)	Ort	4198.33	33618.33	1432.66	0.90	0.90	0.92	97.44	103.24	91.43	3.42	3.86	4.07
	St s	4385.71	3983.82	2742.86	0.36	0.35	0.33	31.28	45.46	30.24	1.13	0.72	0.59
	Min	780	670	106	0.68	0.58	0.67	48	54	50	2.10	3	3.02
	Maks	10760	10250	7000	1.65	1.48	1.56	124.64	167.44	124.60	5.20	4.48	4.65
Global paterne (n=12)	Ort	2954.16	2167.66	1230.90	0.81	0.77	0.83	93.83	100.69	96.09	3.39	3.53	3.94
	St s	1741.52	2259.62	2320.57	0.26	0.29	0.36	33.43	40.32	43.95	0.45	0.43	0.78
	Min	220	260	50	0.39	0.37	0.37	58	54	48	2.30	2.63	2.38
	Maks	4770	7240	7240	1.33	1.43	1.51	184	184	184	4.10	4.10	5
p değeri		0.027*	0.339	0.990	0.639	0.639	0.546	0.426	0.920	0.960	0.990	0.999	0.647

Ort, ortalama değeri; **St s**, standart sapma; **Min.** Minimum değeri; **Maks**, maksimum değeri.

Pr3, Pr6, PrS (mg/gün); 3. ay, 6. ay ve sonuncu 24 saatlik proteinüri değerlerini göstermektedir.

Kr3, Kr6, KrS (mg/dl); 3. ay, 6. ay ve sonuncu serum kreatinin değerlerini göstermektedir.

GFR0, GFR3 ve GFRs(ml/dk/1.73 m² cinsinden, MDRD'ye göre); 3. ay, 6. ay ve sonuncu glomerüler filtrasyon hızını göstermektedir.

Alb3, Alb6, AlbS; 3. ay, 6. ay ve sonuncu serum albümin (g/dl) değerlerini göstermektedir.

Tablo, segmental paternde ve global paternde boyanmaya göre iki grupta laboratuvar izlem verilerinin Freidman testine göre karşılaştırılmasını göstermektedir.

*Tabloda 3. aydaki proteinürinin global paternde C4d boyanan grupta segmental paternde C4d boyanan gruba göre daha yüksek derecelerde olduğunu gösteren p değeri; proteinürinin ayrıca <4 g/gün, 4-8 g/gün, ≥8 g/gün olarak kategorize edilmesi ile Kruskal-Wallis analizi üzerinden ve Fisher-kesin testi ile elde edilmiştir (p<0.05).

4.4.4 C4d boyanması negatif olan iki hastanın sonuçları

C4d boyanması negatif olan iki hastada yaş ortalaması 52,5 yıl ve takip süreleri ortalaması 68,5 ay olarak saptandı. Erkek cinsiyette olan hastada başlangıçtaki serum kreatinin düzeyinin yüksek (1,01 mg/dl) olduğu ve ayrıca hipertansiyonunun olduğu görüldü. Kadın hastanın ise başlangıçta hem yaşı daha genç (48 yıl) ve kan basıncı normal, hem de kreatinin değeri 0,8 mg/dl ile normal saptandı. Her iki hastada da başlangıç proteinürisi 4 g/gün'ün altında olarak hafif düzeyde idi. Erkek hastada hipoalbuminemi varlığı 2,8 g/dl olarak kaydedildi, kadın hastada 3,2 g/dl bulundu. Her iki hastada da bağışıklığı baskılayıcı ilaç tedavisi uygulanmadığı kaydedildi. Histopatolojik özellikler açısından her ikisinde de İFTA skoru hafif derecede saptandı. Yine iki hastada segmental veya global glomerüloskleroz açısından biyopsi örneklerinde 1'er adet global skleroz saptanmıştır. Erkek hastada arteriyel ve/veya arterioller duvar kalınlığında artış izlenmezken, kadın hastanın biyopsi örneğinde arter ve arterioller duvarlarında hafif derecede kalınlık artışı görülmüştür. Erkek hastada direkt İF bulgularını orta düzeyde IgG boyanması, hafif düzeyde IgA ve kompleman C3 boyanması ile şiddetli derecede Ig kappa ve Ig lambda boyanması oluştururken; kadın hastanın biyopsisinde IgG ile kappa ve lambda proteinleri hafif derecede pozitif boyanmıştır. Erkek hastada ayrıca hafif derecede mezangial sellülarite artışı görülürken, kadın hastanın biyopsisinde mezangium normal olarak görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda C4d monoklonal antikoru ile yeniden boyanan 20 hastanın %90'ında pozitif C4d boyanması elde edilmiş olup, bu oran birincil MN açısından C4d'nin tanıda kullanılabilirliğini ele alan patoloji çalışmaları ile benzerlik göstermektedir¹⁹⁻²¹. Demografik klinik, ve laboratuvar bulguların C4d boyanması ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde birlikteliği saptanmamıştır; ancak histopatolojik bulgulardan IM'de segmental glomerüloskleroz yüzdesi C4d negatif ve hafif derecede boyanan grup ile anlamlı birliktelik göstermektedir ($p=0.017$). C4d'nin negatif ve hafif derecede boyandığı hasta grubunda direkt İF bulgularından IgA, kappa ve lambda birikimi ile de anlamlı birliktelik saptanmıştır (p değeri sırayla $p=0.044$, $p=0.029$ ve $p=0.049$). Ayrıca segmental ve global paternde C4d boyanmasına göre ele alınan gruplardan global paternde boyanma olan grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede yoğun C4d birikimi de gösterilmiştir ($p=0.001$). Bu nedenle C4d boyanma yoğunluğuna göre oluşturulan iki grupta segmental/global boyanma çarpan skoru karşılaştırıldığında, orta-şiddetli C4d boyanması olan grupta global paternde boyanmanın sonucu olarak çarpan skorunun anlamlı ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.01$). İstatistiksel anlamlılığa ulaşmamakla birlikte, C4d'nin orta-şiddetli derecede boyanmasının bazal membranda kalınlaşma, arter duvarında kalınlaşma ve interstisyel enflamasyon gibi histopatolojik verilerle birlikteliği dikkat çekicidir.

C4d'nin pozitif boyanma oranı açısından bakıldığında çalışmamız öncül histopatolojik çalışmalar ile benzerlik göstermektedir. İspanya'da Espinosa ve arkadaşlarının 2012'de yayımladıkları çalışmada, 21 minimal değişiklik ve 19 birincil MN hastasından birincil MN hastalarının tümünde C4d pozitif boyanmıştır. Minimal değişiklik hastalarının hiçbirinde C4d saptanmamıştır. Söz konusu çalışmada da bizim araştırmamızda olduğu gibi retrospektif olarak immünohistokimyasal yöntem kullanılmıştır²¹. Val-Bernal ve arkadaşlarının çalışmasında da benzer yöntemle daha fazla çeşitlilikte glomerülo nefritte C4d çalışılmıştır ve bunlardan 31 birincil MN hastasının tamamında GBM boyunca çalışmamızdaki evrelerle aynı şekilde tanımlanan pozitif C4d boyanması elde edilmiştir²⁰. Direkt İF yöntemin kullanıldığı 1989'daki Kusunoki ve arkadaşlarının çalışmasında, 12 birincil MN biyopsisi %92 oranla C4d pozitif boyanmıştır¹⁹. Sunulan çalışmamızda, C4d boyanması negatif saptanan iki hastada pozitif boyanma elde edilememesinin nedeni hastalığın başlaması ile başvuru arasında geçen sürenin kısalığı olabilir. Negatif boyanan biyopsi örneklerinde interstisyel fibrozis ile tübüler atrofinin hafif derecelerde olması da bu durumu destekliyor olabilir. Nitekim C4d

negatif erkek ve kadın hastada direkt İF bulguları açısından da, IgG birikiminin ve C3 birikiminin orta ve şiddetli derecelere ulaşmadığı görülmektedir. Yine iki hastada biyopsi sırasında proteinüri düzeyi de 4 g/gün'ün altındadır. Tüm bu veriler ışığında, iki hastadaki membranöz glomerülo nefritin biyopsi zamanında şiddetli hastalık düzeyinde olmadığı söylenebilir. Yetişkinde birincil MN tanısında C4d'nin her koşulda %100 pozitif saptanıp saptanmayacağını belirlemek açısından daha fazla sayıda ve farklı ırklarda hastalar ile yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda histopatolojik bulgulardan segmental sklerozun yüksek yüzdelik değerlerinin, C4d negatif ve hafif dereceler ile istatistiksel anlamlılık düzeyinde birlikteliği dikkat çekicidir ($p=0.017$) Bu sonucun ortaya çıkmasında orta-şiddetli derecelerde C4d boyanan hastalarda hiç segmental skleroz bulunmamasının da katkısı olduğu düşünülmüştür. Öte yandan, C4d'nin negatif ve hafif derecede boyandığı hastalar global skleroz açısından da C4d orta-şiddetli boyanan gruba global skleroz yüzde ortalaması üzerinden göstermektedir; ancak bu veri istatistiksel değere ulaşmamaktadır. Sklerotik glomerül varlığı birincil MN için böbrek sağkalımına yönelik bağımsız bir kötü böbrek sağkalımı belirtecidir. Çalışmamızda segmental ve global sklerozun C4d ile korelasyon göstermemesi glomerülosklerozun klasik ve lektin kompleman yolları haricinde daha farklı patogenetik mekanizmalarla meydana geldiğini düşündürmektedir.

İstatistiki düzeyde olmasa da bazal membran kalınlaşmasının ileri evreleri yönünden, orta ve şiddetli derecede C4d boyanan olan olguların çoğunlukta olduğu görülmektedir. Boyanma paterni ele alındığında segmental ve global gruplar, bazal membranda kalınlık artışı açısından birbirine istatistiksel ölçüde anlamlı bir üstünlük göstermemiştir. Ancak burada da GBM'in orta düzeyde ve belirgin olarak kalınlaştığı hastalarda global paternde C4d boyanmasının segmental paternde C4d boyananlara göre sayıca üstünlüğü dikkati çekmektedir. C4d'nin hem global paternde hem de orta-şiddetli derecede boyanması, bazal membranda özellikle orta derecede kalınlaşma ile birlikte bulunmuştur. GBM'in ileri derecede kalınlaşması ile immün komplekslerin kaba depozitler haline gelmesi ve sonrasında çözünmeye başlaması bunda etken olabilir.

Arter duvarı kalınlaşması ile de istatistiksel olarak anlamlı birliktelik kaydedilememiştir; ancak arter duvarında kalınlaşma görülen hastaların C4d orta-şiddetli derecede boyananlarda C4d negatif-hafif derecede boyananlara göre sayıca üstün olduğu fark edilmektedir. Hastalarımızdan orta-şiddetli derecede C4d birikimi olanlarda interstisyel enflamasyonun da

istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamakla birlikte; negatif ve hafif derecede C4d boyanan gruba göre daha fazla sayıda hastada kaydedildiği dikkati çekmektedir. C4d bu bulgulara göre komplemana bağlı patolojik hasarın birikimsel bir göstergesi olarak düşünülebilir. C4d'nin histopatolojik risk faktörleri ile ilişkisini değerlendirmede daha fazla sayıda hastaya ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Tıpkı bazal membranda kalınlaşma gibi interstisyel fibrozis ve tübüler atrofi de, patolojik yaklaşımda kronikleşme belirtici olarak değerlendirilmektedir. Tüm hastalara bakıldığında biyopsilerde interstisyel fibroziste ve tübüler atrofide hafif derecede değişiklikler ön planda görülmektedir. Hastaların membranöz nefropatinin klinik düzeyde ilk defa ortaya çıkışında başvurusu bu durumu açıklayabilir. İnterstisyel fibrozis-tübüler atrofisi orta derecede olan iki hasta ve ağır derecede olan bir hasta da bulunmaktadır. Fibrozis ve atrofi değişiklikleri orta-ağır derecede olan bu hastalarda en az 5 yıllık izlem sürelerinin sonunda GFR'de %50 azalma veya kreatininde iki katına çıkma gözlenmemiştir. Burada tedavi başarısının da etkili olduğu düşünülmektedir. Birincil MN'de hastalık yoğun proteinüri ile kendini gösterdiğinde tübüler atrofisinin ve interstisyel fibrozisin de hızla ileri derecelere ulaşmayabileceği bilinmektedir. Ancak diğer glomerülofritlerde olduğu gibi birincil MN'de de, tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis böbrek sağkalımı üzerine olumsuz rol oynamaktadır ^{10,13,14}. Çalışmamızda interstisyel fibrozis ve tübüler atrofisinin C4d birikimi ile birliktelik göstermemesinde, bu iki antitenin birincil membranöz nefropatinin haricinde çok çeşitli etkenlerin de (hipertansiyon, yaş, böbrek kanlanması bozulma oluşan iskemi gibi durumlar, ilaçlar ve geçirilmiş üst üriner sistem enfeksiyonları gibi) bir sonucu olmasından kaynaklanabileceği düşünülebilir.

IgA'nın birincil MN'de eser miktarda birikimi veya hiç saptanmaması beklenen bir bulgudur. Bundan ötürü IgA'nın C4d negatif ve hafif derecede boyanan hastalarda eser miktarda pozitif saptanmış olması, aktif izlemde kalan bu hastalarda tanı sırasında geçirilmiş viral enfeksiyon gibi durumlar sonrasında biyopsi uygulanmasına bağlı olabilir. Yani patogeneizde birincil bir etken olarak düşünülmemiştir. Aynı şekilde immünglobulinler içinde özgün olmayan proteinler olarak kappa ve lambdanın negatif ve hafif derecede C4d boyanan hastalarda istatistiksel anlamlı düzeye ulaşması birincil MN'de böbrek hasarlanması ve prognoz açısından önem taşımamaktadır. Kappa ve lambda proteinleri için birincil MN'de beklenen, birikim derecelerinin yüksekliğinden çok, yaklaşık ve eşit derecelerde saptanmalarıdır.

Beklendiği gibi C1q ve IgM birikimleri ile C4d birikimi arasında pozitif bir ilişki görülmemektedir. Hatta negatif C1q boyanması orta ve şiddetli derecede C4d boyanan gruplarda daha fazladır, bu da patogeneizde C1q saptanmayan lektin yolunun sürece katkısını düşündürmektedir. Bu sonuçlar önceki çalışmalarda da gösterilmiştir.

Beklenildiği üzere hastalarımızdan hiçbirinde C4d boyanması interstisyumda, endotelde ve GBM haricinde bir alanda yoğun nicelikte saptanmamıştır. Sadece bazı segmental patern gösteren hastalarda hafif düzeyde mezangial C4d boyanması dikkatleri çekmiştir. Bu negatif bulgularla uyumlu olarak mezangial sellülarite artışı ile C4d boyanma derecesi/paterni arası ilişki de görülmemiştir.

Literatürde, yetişkin birincil MN'sinde 'segmental birincil MN' nadir olarak bildirilmektedir. Normalde bazal membran dış yüzeyinin diffüz, ince granüler tarzda ve global paternde tutulması membranöz nefropatide 'global birincil MN' olarak adlandırılırken; direkt İF incelemede IgG'nin global değil de farklı olarak segmental paternde tutulmasına (bir glomerülün %50den azının IgG birikimi göstermesi) da 'segmental birincil MN' denilmiştir. Japonya'da çocuk hastalarda Batı ülkelerine göre daha yüksek oranda birincil segmental MN saptanabilmektedir. Bu noktadan hareketle Segawa ve arkadaşları 2010'da prospektif olarak 16 MN hastası ve 20 kontrol grubundan oluşan bir çalışma yayımladılar ⁴⁵. Segmental MN'li 6 hastanın ve global MN'li 10 hastanın belirlendiği çalışmada, bizim çalışmamızdaki direkt İF parametrelerine ek olarak IgG alt grupları (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), MBL, C4bp, C5b-9, Cd59 ve faktör-B de eklenmiştir. Çalışmada IgG1, IgG2 ve IgG4'ün global grupta segmental gruba göre daha yüksek oranda boyandığı; yine global grupta MBL ve faktör-B'nin daha yoğun boyandığı saptanmıştır. Segmental MN'li çocuklarda ise C1q'nun global MN grubuna göre daha yoğun boyandığı görülmüştür. Çalışma IgG1 ve IgG3 ile segmental MN'lerde klasik yolun; ayrıca IgG2, IgG4, MBL ve faktör-B ile de global MN'lerde lektin ve alterne yolun daha aktif olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Aynı çalışmada EM ile elektron dense depozitlerin mezangial birikiminin de segmental MN'li hastalarda daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Bizim çalışmamızda IgG boyanması GBM boyunca global ve granüler tarzda dağılım göstermiştir; Segawa'nın birincil segmental MN grubundaki gibi segmental IgG boyanması kayıt edilmemiştir. IgG alt tiplerine rutinde bakılmadığından çalışmamızda IgG alt tipleri de incelenmemiştir. Ancak 6 hastada segmental paternde C4d boyanması saptanması dikkat çekicidir. Bu nedenle hastaları demografik, klinik, ve patolojik verilerle birliktelik açısından

segmental ve global patern olarak iki gruba ayırdık. C4d'nin global paternde boyandığı 12 hastada segmental paternde boyandığı 6 hastaya göre daha yoğun C4d birikimi (orta ve şiddetli dereceler) olduğu belirlenmiştir ($p= 0,001$). C4d'nin global patern grubunda şiddetli derecelerde boyanması; zamanla doğru orantılı olarak ortamdan uzaklaşmaksızın biriktiğinin, kendiliğinden sönme görülen hastalık alevlenmeleri sonucunda bir iz olarak kaldığının göstergesi olarak da değerlendirilebilir. Segawa'nın çalışmasında tüm kompleman ara ürünlerinin taze biyopsi dokularından direkt İF ile gösterilmiş olması, pediatrik yaş grubunun ele alınmış olması ve segmental MN gibi farklı bir histopatolojik antitenin varlığı; yetişkinlerdeki birincil global MN'de de aynı bulguların elde edilebilirliği konusunda net fikir sağlayamamaktadır. Öte yandan günümüze kadar yapılmış çalışmalarda yetişkin MN'de IgG4'ün diğer alt tiplere göre ön planda boyandığı, birincil MN'lerin %70-75'i olan m-PLA2R antikoru pozitif vakalarda da baskın antikor alt tipinin IgG4 olduğu ve C1q'nun çalışmamızdakine benzer şekilde nadiren pozitif saptandığı gösterilmiştir. Tüm bu bilgilere rağmen birincil MN'de hastalık süresince bir tek kompleman yolunun aktif olduğunu söylemek mümkün olamamaktadır. Farklı bir mekanizma olarak alternatif yolun da hastalık sürecinde sitotoksik membran hasarında rol alması söz konusu olabilir.

Araştırmamızda IgG dağılımı, C4d boyanma derecesi ile aynı yönde birliktelik göstermemiştir. C4d negatif ve hafif derecede boyanan hastalarda istatistiksel anlamlılığa ulaşmamak kaydıyla, C4d orta-şiddetli derecede boyananlara göre IgG'nin birikim derecelerinin daha yüksek ortalama değeri dikkat çekicidir. Daha önce yapılan çalışmalarda IgG birikimi ile C4d birikimi korelasyon göstermiştir ¹⁹. Çalışmamızda C4d ile IgG birikimleri arasında korelasyon olmamasında histokimyasal yöntem farkı bir etken olabilir. Yani hastalarımızdan C4d'nin orta-şiddetli derecede boyandığı grupta daha düşük IgG ortalama derecesi, aslında İF yönteminde kullanılan anti serumun veya antikorun belki de baskın olan IgG4'ü zayıf bağlamasından kaynaklanıyor olabilir. Nitekim tanıda mutlaka gerekmediğinden ve maliyet etkinlik açısından rutin klinik pratikte IgG alt tipleri bakılmamaktadır. Yakın bir zamanda birincil MN'deki baskın kompleman yoluna yönelik IgG alt grup analizlerini ele alan, 25 aylık ve 157 hastayı kapsayan bir patoloji çalışması yayımlanmıştır. Bu çalışmada birincil MN hastalarının IM, İF ve EM bulgularına göre hastalığın birinci evresinde olanlarda IgG1'in baskın oranda boyandığı (%64), orta ve ağır evrelerde olanlarda IgG4'ün baskın boyandığı ve C1q'nun azaldığı ortaya konulmuştur ⁴⁹. Bu çalışmadan yola çıkarak, birincil MN'de başlangıçta klasik kompleman yolunun aktif

olduğunu ve sonrasında belki de lektin bağımlı yolun devreye girebileceğini söylemek mümkün olabilir.

Çalışmamızda klinik ve laboratuvar bulguların C4d boyanma derecesi ile istatistiksel anlamlı düzeyde birlikteliği saptanamamıştır. Burada kısa izlem süresinin önemli bir etken olduğu düşünülmektedir, ayrıca izlemde klinik ve laboratuvar ölçütlerin değerlendirilmesinde daha fazla sayıda hastaya da ihtiyaç olduğu anlaşılmaktadır. Hastalar boyanma paternine göre segmental ve global olarak ikiye ayrıldığında izlemin 3. ayında proteinürinin derecesi global paternde boyanma olan C4d grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,027$). Glomerülde global boyanmanın daha yaygın görülmesi açısından bu sonuç, C4d'nin tedavi yanıtının daha geç elde edildiği immünopatolojik aktiviteler ile ilişkili olmasına atfedilebilir. Ancak 3 ay, birincil MN'lerde tam remisyon için yeterli bir süre olmayabilmektedir ve tedavide radikal değişiklikler 6. ayda hatta ilk yılın sonunda yapılabilir. İzlemde diğer aylarda proteinüri derecesindeki farklılığın saptanamaması nedeniyle bu bulgunun rastlantısal olabileceği akla gelmektedir.

Çalışmamızda başlangıçta böbrek sağkalımı analizi yapmayı planladık. Ancak izlem süreleri 6 ay ile 130 ay arasında değişen ve ortalama olarak 3,5 yıl izlem süresi elde edilen hastaların hiçbirinde izlemde serum kreatinin düzeyinin iki katına yükselmediğini ve GFR'de %50'den fazla azalma görülmediğini saptadık. Aksine hastalar arasında, serum kreatinin düzeyleri başlangıç değerlerine göre hiç azalmayan 13 hasta bulunmaktadır. Bu durum düzenli takip ve kesintiye uğramayan tedaviye bağlı olarak değerlendirilmiştir. Yine de böbrek sağkalımı analizi yapmak açısından daha uzun süreli izlemler ile klinik ve laboratuvar parametrelerinin kaydedildiği çalışmalar oluşturulabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda C4d boyanma derecesi ile demografik, klinik ve laboratuvar bulgular arasında istatistiksel olarak anlamlı birliktelik saptanmamıştır. Birincil MN humoral immün sistemin organa özgü olarak GBM'in dış yüzeyine saldırdığı, şiddetli immün aktivitenin sonucunda da bazal membranda podosit mimarisinde kalıcı bozulmaların görüldüğü ve aktif hastalık süreleri eklendikçe tübülo-interstisyel hasarın oluştuğu bir hastalıktır. Klasik yol ile de başlasa, orta ve ileri evrelerinde IgG4 ile ilişkili bulgularla lektin yolu da ön planda olsa; klasik ve lektin yollarında kullanılan C4 komplemanı patogenetik sürece katılmaktadır. Kompleman C4'ün ayak izi olan C4d ise immünohistokimyasal yöntemlerle çoğu vakada saptanabilmektedir. Biz de IM ve direkt İF bulguları ile membranöz glomerülonefrit tanısı konulmuş, kliniğimizde ikincil nedenler gerekli tetkiklerle irdelenerek birincil MN tanısı elde edilmiş olgularda C4d'yi immünohistokimyasal yöntemle retrospektif olarak göstermiş olduk. Humoral immünitenin ayak izi olmakla birlikte C4d, çalışmamıza göre membranöz nefropatinin zamanı kestirilemeyen alevlenmeleri ve sönmeleri için de, prognozu öngörme açısından da yeterli bulunmamıştır. Ancak istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmamakla birlikte C4d'nin boyanma derecesinin bazal membranda ve arter duvarında kalınlaşma ile interstisyel enflamasyon gibi bazı histopatolojik verilerle birlikteliği dikkati çekmiştir.

Bu konuda yapılacak çalışmalarda birincil MN nadir görüldüğünden, tek patoloji birimine bağlı çok merkezli çalışma planlanarak daha çok sayıda hasta katılımı ve izlem sağlanabilir. Komplemanda farklı yollara bağlı hasarı araştırmada tanı biyopsisinde faktör-B gibi alternatif yol belirteçlerinin dahil edildiği prospektif analizler planlanabilir. Ayrıca dokularda membran-PLA2R antikorunun da retrospektif olarak bakılabildiği bazı çalışmalarda gösterilmiştir ⁶⁷. Birincil MN ile C4d birlikteliğini inceleyen çalışmalara, membran-PLA2R antikorunun da geriye dönük incelenmesi eklenebilir. Ancak birincil MN'de komplemanın ve lektin yolunun etkilerine yönelik yapılacak çalışmalarda, prospektif olarak serum anti-PLA2R'nin tanı ve izlemde bakılmasının değerlendirilmede daha kesin bir yol çizeceği düşünülmektedir. Yine de hastalığın patogenezinin aydınlatılması hususunda daha kapsamlı ve daha çok sayıda olgunun dahil edildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Haas Mark, Meehan S, Karrison T et al. Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: A comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *American Journal of Kidney Diseases*. 1997; 30: (5)621-631.
2. Abe S, Amagasaki Y, Konishi K et al. Idiopathic membranous glomerulonephritis: Aspects of geographical differences. *Journal of Clinical Pathology*. 1986; 39: 1193-98.
3. Cattran D, Reich H, Beanlands H et al. The impact of sex in primary glomerulonephritis. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008; 23: (january)2247-53.
4. Jennette JC, Olson JL Membranous glomerulonephritis Lippincott Williams&Wilkins, Heptinstall's Pathology of The Kidney 6th edition. 2007; 205-251.
5. Cahen R, Francois B, Trolliet P et al. Aethiology of membranous glomerulonephritis: A prospective study of 82 adults. 1989; 4: (3) 172-180.
6. Zeng C, Chen H, Wang R et al. Etiology and clinical characteristics of membranous nephropathy in Chinese patients. *American Journal of Kidney Diseases*. 2008; 52: 691-8.
7. Donadio J, Torres V, Velosa J et al. Idiopathic membranous nephropathy: The natural history of patients. *Kidney International*. 1988; 33: 708-715.
8. Schieppatti A, Mosconi L, perna A et al. Prognosis of Untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. *New England Journal of Medicine* 1993; 329: 85-89.
9. Polanco N, Gutierrez E, Covarsi A et al. Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy. *Journal of American Society of Nephrology*. 2010; 21: 697-704.

10. Du-Buf Vereijken P, Branten A, Wetzels J et al. Idiopathic membranous nephropathy: Outline and rationale of treatment strategy. *American Journal of Kidney Diseases*. 2005; 46: 1012-1029.
11. Glasscock Richard J. Diagnosis and natural course of membranous nephropathy. *Seminars in Nephrology*. 2003. 23: 324-332.
12. KDIGO Work Group KDIGO clinical practice guidelines for glomerulonephritis. *Kidney International Supplements*. 2012; 2: (2) 1-174.
13. Reichert L J, Koene RA, Wetzels JF et al. *American Journal of Kidney Diseases: the official journal of the kidney foundation*. 1998; 31: (1) 1-11
14. Shiiki H, Saito T, Nishitani Y, et al. Prognosis and risk factors for idiopathic membranous nephropathy with nephrotic syndrome in Japan. *Kidney Int*. 2004; 65: 1400-1407.
15. Koene RA, Wetzels JF, Reichert LJ et al. Urinary Beta-2 microglobulin predicts renal outcome with idiopathic in patients membranous nephropathy. *Journal of American Society of Nephrology*. 1995; 6: (6) 1666-1669.
16. Branten AJW, Du Buf-Vereijken PW, Klasen IS, et al. Urinary excretion of beta2-microglobulin and IgG predict prognosis in idiopathic membranous nephropathy: a validation study. *Journal of American Society of Nephrology*. 2005; 16: 169-174.
17. Segal Paul E Recent advances and pprognosis in idiopathic membranous nephropathy. *Advances in Chronic kidney Disease*. 2012; 19: (2) 114-119.
18. Murata Kazunori, Baldwin W, et al. Mechanisms of complement activation, C4d deposition and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplantation Reviews*. 2009; 23: 139-150.
19. Kusunoki Y. Glomerular deposition of C4 cleavage fragment (C4d) and C4-binding protein in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Nephron*. 1989;51(1):17-19.

20. Val-Bernal JF, Garijo MF, Val D, Rodrigo E, et al. C4d Immunohistochemical staining is a sensitive method to confirm immunoreactant deposition in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue in membranous nephropathy. *Histology Histopathology*. 2011; 26: (11) 1391-7.
21. Espinosa-Hernandez M, Ortega- Salas M, Lopez-Andreu M, et al. C4d as a diagnostic tool in membranous nephropathy. *Nefrologia*. 2012; 32: (3) 295-9
22. Mellors RC, Ortega RC, Jones et al. New observations on the pathogenesis of lipoid nephrosis, periarteritis nodosa and secondary amyloidosis in man. *Landmarks Papers in Nephrology. Analytical Pathology 3* edited from: *American Journal of Pathology* 1956; 455-499
23. Ehrenreich T, Churg J, et al. Pathology of membranous nephropathy. *Pathology Annual* pp. Apleton Century-Crofts Newyork 1968; 145-186.
24. Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, et al. M-type phospholipase A2 receptor as a target antigen in membranous nephropathy. *New England Journal of Medicine*. 2009; 361: (1) 11-21.
25. Cybulsky A, Rennke H, Feintzeig I, et al. Complement-induced glomerular epithelial cell injury. Role of the membrane attack complex in rat membranous nephropathy. *Journal of Clinical Investigation*. 1986; 77: 1906-1107.
26. Takano T, Elimam H, Cybulsky A, et al. Complement-mediated cellular injury. *Seminars in Nephrology*. 2013; 33: (6) 586-601
27. Rus H, Niculescu F, Shin M, et al. Role of the C5b-9 complement complex in cell cycle and apoptosis. *Immunological Reviews*. 2001;180: 49-55
28. Jennette J, Iskandar S S, Dalldorf F G, et al. Pathologic differentiation between lupus and non-lupus membranous glomerulopathy. *Kidney International*. 1983; 24: 377-385

29. Heymann W, Hackel DB, Harwood S, Wilson SG, et al. Production of nephrotic syndrome in rats by Freund's adjuvants and kidney suspensions. *Journal of American Society of Nephrology*. PMID: 10616854 [PubMed- Indexed for MEDLINE] 1959; 11: (1) 183-8.
30. Feenstra K, van Der Lee R, greben HA, Arends A, et al. Experimental glomerulonephritis in the rat induced by antibodies directed against tubular antigens. A natural history: A histologic and immunohistologic study at the light microscopic and ultrastructural level. *Laboratory Investigations* PMID: 113514 [PubMed-indexed for MEDLINE]1975; 32: (2) 235-242
31. Fujigaki Y, Nagase M, Honda N, et al. Intraglomerular basement membrane translocation of immune complex (IC) in the development of passive in situ IC nephritis of rats. *The American Journal of Pathology*. 1993; 142: (3) 831-842.
32. Kerjaschki D, Farquhar M, et al. The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. 1982; 79: 1557-61.
33. Farquhar M, Kerjaschki D, et al. Gp 330 and RAP: The Heymann nephritis antigenic complex. *Annals of the New York Academy Sciences*. 1994; 737: 96-113.
34. Doi T, Mayumi M, Kanatsu K, et al. Distribution of IgG subclasses in membranous nephropathy. *Clinical and Experimental Immunology*. 1984; 58: 57-62.
35. Debiec H, Guignon V, Mougnot B, et al. Antenatal membranous glomerulonephritis due to antineutral endopeptidase antibodies. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346: (26) 2053-60.
36. Llorca O. Extended bent conformations of the mannose receptor family. 2008; 65: 1302-1310. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2008; 65: 1302-10.
37. Debiec H, Ronco P, et al. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. *The New England Journal of Medicine*. 2011; 364: 689-690.

38. Quin W, Beck L, Zeng C, et al. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *Journal of The American Society of The Nephrology*. 2011; 22: 1137-1143.
39. Oh YJ, Yang S, Kim D, et al. Autoantibody against phospholipase A2 receptor in Korean patients with membranous nephropathy. *PloS One*. 2013; 8: (4) e62151.
40. Kanichigerla D, Gummadove J, McKenzie E et al. Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population on patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney International*. 2013; 83: 940-948
41. Debiec H, Martin L, Jouanneau C, et al. Autoantibodies specific for the phospholipase A2 receptor in recurrent and de novo membranous nephropathy. *American Journal of Transplantation*. 2011; 11: 2144-2152.
42. Hofstra JW, Wetzels J, et al. Anti-PLA2R antibodies in membranous nephropathy: Ready for routine clinical practice? 2012; 70: 109-13.
43. Cohen D, Colvin R, et al. Pros and Cons of C4d. *Kidney International*. 2012; 81: (7) 628-639.
44. Espinosa M, Ortega R, Gomez-Carrasco J, et al. Mesangial IgA: A new prognostic factor. *Nephrology dialysis Transplantation*. 2009; 24: (3)886-891.
45. Segawa Y, Hisano S, Matsushita M, et al. IgG subclasses and complement pathway in segmental and global membranous nephropathy. *Pediatric Nephropathy*. 2010; 25: 1091-1099.
46. Malhotra R, Wormald M, Rudd P, et al. Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. *Nature Medicine*. 1995; 1: 237-243.
47. Aalberse R, Stapel S, Schuurman, et al. Immunoglobulin g4: An odd antibody. *Clinical and Experimental Allergy*. 2009; 39: 469-477.

48. Larsen C, Messias NC, Silva F, et al. Determination of primary versus secondary membranous glomerulopathy utilizing phospholipase A2 receptor staining in renal biopsies. *Modern pathology. An official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, inc.* 2013; 26: 709-15.
49. Huang Cheng Cheng, Lehman A, Albawardi A, et al. IgG subclass staining in renal biopsies with membranous glomerulonephritis indicates subclass switch during disease progression. *Modern pathology. An official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, inc.* 2013; 26: 799-85.
50. Kuroki A, Iyoda M, Shibata T, et al. Th2 cytokines increase and stimulate B cells to produce IgG4 in idiopathic membranous nephropathy. *Kidney International.* 2005; 68: 302-310.
51. McGrogan A, Franssen C, De Vries C, et al. The incidence of primary membranous glomerulonephritis worldwide: A systematic review of the literature. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2011; 26: (2) 414-430.
52. Braden G, Mulhern J, O'Shea M, et al. Changing incidence of glomerular diseases in adults. *American Journal of Kidney Diseases: the official journal of the National Kidney Foundation.* 2000; 35: 878-883.
53. Lee B, Cho H, Kang H, et al. Idiopathic membranous nephropathy in children. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany).* 2006; 21: 1707-1715.
54. Menon S, Valentini R, et al. Membranous nephropathy in children: Clinical presentation and therapeutic approach. *Pediatric Nephrology.* 2010; 25: 1419-1428.
55. McQuarrie E, Stirling C, et al. Idiopathic membranous nephropathy and nephrotic syndrome: Outcome in the era of evidence based therapy. *Nephrology Dialysis transplantation.* 2012; 27: 235-242.
56. Bockenhauer PD, Cottgen A, et al. HLA-DQA1 and PLA2R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *New England Journal of Medicine.* 2011.

57. Stanescu H, Arcos-Burgos M, Medlar A, et al. Risk HLA-DQA1 and PL2R1 alleles in membranous nephropathy. *New England Journal of Medicine*. 2011; 364: 616-626.
58. Lionaki S, Derebai V, Hogan S, et al. Venous thromboembolism in patients with membranous nephropathy. *Clinical Journal of The American Society of Nephrology*. 2012;7: 43-51.
59. Kerlin B, Ayoob R, Smoyer W, et al. Epidemiology and pathophysiology of nephrotic syndrome-associated thromboembolic disease. *Clinical Journal of The American Society of Nephrology*. 2012; 7: 513-520.
60. Cattran D, Daniel C, et al. Observations of idiopathic membranous nephropathy cases with subnephrotic proteinuria-two year follow up. Unpublished work, University of Toronto, Canada. 2006.
61. Praga M, Borstein B, et al. Nephrotic Proteinuria without hypoalbuminemia: Clinical characteristics and response to angiotensine-converting enzyme inhibition. *American Journal of Kidney Diseases: the official journal of the Natural Kidney Foundation*. 1991; 17: (3) 330-338.
62. Praga M, Hernandez E, Montoyo C, Et al. Long term beneficial effects of angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with nephrotic proteinuria. *American Journal of Kidney Diseases: the official journal of the Natural Kidney Foundation*. 1992; 20: (3) 240-248.
63. Ponticelli C, Passerini P, Salvadori M, et al. A randomized pilot trial comparing methylprednisolone plus a cytotoxic agent versus synthtetic ACTH in idiopathic membranous nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. 2006; 47: 233-240.
64. Cattran DC, Appel GB, Hebert L a, et al. Cyclosporine in patients with steroid-resistant membranous nephropathy: A randomized trial. *Kidney International*. 2001; 59: 1484-1490.

65. Fervenza Fernando C, Abraham R, Erickson S, et al. Rituximab therapy in idiopathic membranous nephropathy: a 2 year study. *Clinical Journal of The American Society of Nephrology*. 2010; 5: (12)2188-98.
66. Ma Hong, Sandor D, Beck L, et al. The role of complement in membranous nephropathy. *Seminars in Nephrology*. 2013; 33: (6) 531-542.
67. B. Svobodova, E Honsova, P. Ronco et al. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2013; 28:1839-44