

Birincil Membranöz Nefropatide C4d Varlığı ve Yoğunluğunun Böbrek Hasarlanma Derecesi ile Birlikteliği

Association of Presence and Quantity of C4d with the Severity of Kidney Injury in Primary Membranous Nephropathy

ÖZ

AMAÇ: Birincil membranöz nefropati (MN) tanısı alan hastalarda glomerüller C4d boyanmasının demografik, klinik ve histopatolojik bulgular ile birlikteliğini değerlendirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: Çalışmaya 2005 - 2014 yılları arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde birincil MN tanısı konulan ve izleme alınan 20 erişkin hasta alınmıştır. Hastalar glomerüller C4d boyanma derecelerine (negatif-hafif, orta-şiddetli) göre ve C4d boyanma paternlerine (segmental, global) göre iki gruba ayrılmıştır. Bu iki grup; demografik, klinik izlem, laboratuvar izlem ve histopatolojik veriler açısından karşılaştırılmıştır.

BULGULAR: Segmental skleroz yüzdesinin ($p=0,017$), immünglobulin A birikiminin ($p=0,044$), kappa ile lambda proteinlerinin (sırasıyla $p=0,029$, $p=0,049$) negatif-hafif derecede C4d boyanan grup ile anlamlı birlikteliği saptandı. Global paternde boyanma ile orta-şiddetli derecede C4d boyanması arasında anlamlı birliktelik saptandı ($p=0,001$). Bu bulgu üzerine, hastaların C4d boyanma paternine puan verildi (segmental patern bir puan, global patern iki puan), bu puanlar ile C4d boyanma derecesi çarpılarak skorlama yapıldı. Segmental/global paternde boyanma çarpan skorunun orta-şiddetli derecede C4d boyanan grupta istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu saptandı ($p<0,01$).

SONUÇ: Çalışmada, global paternde boyanma ile orta-şiddetli derecede C4d boyanması arasında anlamlı birliktelik saptanması MN'de global paternde immün birikimin daha yaygın olabileceğini düşündürmektedir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: C4d, Membranöz nefropati, Böbrek hasarı

ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of this study was to evaluate the correlation between glomerular C4d staining and the demographic, clinical and histopathological findings in patients with primary membranous nephropathy (MN).

MATERIAL and METHODS: A total of 20 patients who underwent kidney biopsy and diagnosed as MN between 2005 and 2014 were included in this study. Patients were divided into two groups based on to C4d staining degrees and patterns. Those two groups were compared according to their demographical features, clinical follow-up, laboratory follow-up and histopathological findings.

RESULTS: The percentage of segmental sclerosis ($p=0.017$), deposition of immunoglobulin A ($p=0.044$), and kappa and lambda proteins ($p=0.029$, $p=0.049$ respectively) were associated significantly with the negative-mild degree C4d staining group. Staining in a global pattern was statistically associated with intermediate-severe degree of C4d staining ($p=0.001$). The C4d staining patterns of the patients were then scored (segmental pattern one point, global pattern two point) and multiplied by the degree of C4d staining. The score of segmental/global pattern of staining factor was significantly higher within the intermediate-severe degree of C4d staining group ($p<0.01$).

CONCLUSION: Association of the global pattern and intermediate-severe degree of C4d staining suggests that immune deposition is more prevalent within the global pattern in primary MN.

KEY WORDS: C4d, Membranous nephropathy, Kidney injury

Esra GÖKÇE¹
Mehtat ÜNLÜ²
Serkan YILDIZ³
Caner ÇAVDAR³
Sülen SARIOĞLU²
Taner ÇAMSARI³

- 1 Yusufeli Devlet Hastanesi, İç Hastalıkları Bölümü, Artvin, Türkiye
- 2 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı İzmir, Türkiye
- 3 Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nefroloji Bilim Dalı İzmir, Türkiye



Geliş Tarihi : 28.11.2016

Kabul Tarihi : 04.04.2017

Yazışma Adresi:

Serkan YILDIZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Nefroloji Bilim Dalı, İzmir, Türkiye

Tel : +90 232 412 37 66

E-posta : serkan.yildiz@gmail.com

GİRİŞ

Membranöz nefropati (MN), subepitelyal immün kompleks birikimi ve glomerül bazal membran kalınlaşması ile karakterizedir (1). Erişkinlerde görülen nefrotik sendromun en önemli nedenleri arasındadır (2). MN'nin büyük çoğunluğu birincil (idiyopatik, primer) tip olup diğer ikincil nedenler ise otoimmün hastalıklar, maligniteler, enfeksiyonlar ve ilaçlardır (3, 4).

Membranöz Nefropati, genellikle diğer glomerüler hastalıklara göre daha sinsi başlayabilirse de, olguların %80'i nefrotik sendrom semptomları, %20'si de nefrotik düzeyde olmayan proteinüri ile başvurmaktadır (5,6). Hastalığın doğal seyri konusunda önceki yıllarda kendiliğinden sönmelerin daha yaygın olduğu düşünülürken; tedavisiz beş yıllık izlemler 10-15 yıla çıkarıldığında alevlenmelerin görülebildiği ve tüm olguların üçte birinin son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) evresine ilerlediği gözlemlenmiştir (7-9).

Hastalıkta SDBY evresine ilerleme riski söz konusu olduğunda bağışıklık sistemini baskılayıcı tedaviler gündeme gelir (10-12). Başlangıçta proteinürinin 4 gr/gün'den az ve kısa sürmüş olması, hipertansiyon (HT) olmaması, kadın cinsiyet, genç yaş "iyi"; erkek cinsiyet, HT varlığı, ileri yaş ve tanı anında yüksek serum kreatinin değeri, 8 gr/gün'den fazla proteinüri ve biyopside ileri histopatolojik bulgular ise "kötü" prognostik kriterler olarak görülmektedir (13-15). MN'nin SDBY evresine ilerlemesini öngörmeye 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 (16, 17). Literatürde birincil MN'de C4d'yi içeren çalışmalar tanısız yeterliliğe odaklanan histopatoloji çalışmalarıdır ve C4d'nin prognoz öngördürücülüğünü değerlendirmemektedirler (18-20).

Glomerüler C4d pozitif boyanan birincil MN hastalarında komplemanın lektin yolunun aktif olduğu düşünülmektedir; böylelikle bu hastalarda böbrek hasarlanma derecesinin ciddi ve böbrek sağkalım oranlarının düşük olması beklenmektedir.

Bu çalışmanın amacı birincil MN tanısı alan hastalarda glomerüler C4d boyanmasının demografik, klinik ve histopatolojik bulgular ile birlikteliğini değerlendirmektir.

GEREÇ ve YÖNTEMLER

Çalışmamıza Eylül 2005 - Eylül 2014 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi'nde böbrek biyopsisi ile birincil MN tanısı konulan ve halen Nefroloji Bilim Dalı Polikliniği'nde izlenen 18 yaş üzeri 20 hasta alınmıştır. Çalışmamıza Kidney Disease Improvement Global Outcome (KDIGO) 2012 kılavuzunda (21) da belirtilen ikincil MN olguları ve ayrıca biyopsi yeterlilik kriterlerini karşılamayan biyopsi örnekleri dahil edilmemiştir.

Hastalar Nefroloji Bilim Dalı Polikliniği'ne davet edilmiş, birebir klinik görüşme ortamında, böbrek biyopsi örneklerinin ve dosya (arşiv) bilgilerinin kullanımı açısından kendilerinden gönüllü aydınlatılmış onam formu ile onay alınmıştır. Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı alınarak gerçekleştirilmiştir (Karar No: 2014/05-19 1028 - Girişimsel Olmayan Araştırmalar). Hastane arşivinde yer alan hasta dosyaları geriye dönük olarak incelenmiştir.

Patoloji bölümü tarafından saklanmış böbrek dokuları C4d kiti (Cell Marque R C4d/SP91 monoklonal antikoru) ile immünohistokimyasal yöntemle (18) yeniden boyanarak değerlendirilmiştir. Glomerüler C4d boyanma dereceleri negatif (glomerüler bazal membranın %25'inden azının boyanması), hafif (ince granüler), orta (kalın granüler) ve şiddetli (kaba depozitlenmeler) olarak belirlenmiştir.

Hastalar negatif ve hafif derecede boyananlar ile orta ve şiddetli derecede boyananlar olarak iki gruba ayrılmıştır. Bu gruplar; demografik veriler (yaş, cinsiyet, takip süresi), klinik ve laboratuvar izlem verileri [biyopsi sırasında, izlemin üçüncü ayı, altıncı ayı ve sonunda proteinüri miktarı; serum kreatinin düzeyi; serum albumin düzeyi; MDRD (Modification of Diet in Renal Diseases Study) formülüne (22) göre tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR); tanı sırasında hipertansiyon varlığı; konservatif tedavi veya bağışıklık baskılayıcı tedavi başlanma durumu; izlemlerde serum kreatinin düzeyinde iki katına çıkma ve eGFR'de yarıya düşme süreleri ve böbrek yerine koyma tedavisi varlığı] ve 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 hipersellülarite varlığı, immünfloresan incelemede immünoglobulin G (IgG), immünoglobulin A (IgA), immünoglobulin M (IgM), immünoglobulin kappa ve lambda, kompleman C1q ve C3 birikimi] açısından karşılaştırılmıştır. Çalışmaya alınan hastaların tanı sırasındaki proteinüri miktarı tedavi açısından belirleyici olduğu için; hafif (< 4 gr/gün), orta (4-8 gr/gün) ve ağır (> 8 gr/gün) olmak üzere üç farklı grupta sınıflandırılmıştır (21).

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 iki gruba ayrılmıştır (18). Bu gruplar da aynı demografik, klinik izlem, laboratuvar izlem ve histopatolojik veriler açısından karşılaştırılmıştır.

İstatistiksel analizde SPSS 15.0 programı kullanılmış ve p değerinin 0,05'ten küçük saptanması durumunda bulgular istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir. Sayısal veri analizi için ki-kare testi ve Fisher kesin testi, ölçümle belirlenen değişken analizi için Mann-Whitney U testi ve korelasyon analizi kullanılmıştır. Glomerüler C4d boyanmasının böbrek sağkalımı üzerine olan etkisini değerlendirmek için Kaplan-Meier ve Cox oransal risk analizleri kullanılmıştır.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 20 hastanın (dokuz kadın) yaş ortalaması $50 \pm 8,78$ yıl, ortalama izlem süresi $43,75 \pm 30,21$ ay idi. Tanı konulduğu sırada hastaların %40'ında (n=8) HT olduğu görülmüştür. Hastaların ortalama proteinüri değeri tanı sırasında $8,036$ gr/gün ile ağır düzeyde saptanmıştır. Tanıda ağır düzeyde proteinüri (> 8 gr/gün) oranı %50 (n=10), orta düzeyde proteinüri ($4-8$ gr/gün) oranı %15 (n=3) ve hafif düzeyde proteinüri (< 4 gr) oranı ise %35 (n=7) olarak kaydedilmiştir. Hastaların %30'unda (n=6) tanı anında ağır düzeyde hipalbuminemi saptanmıştır. Tüm hastalarda serum kreatinin düzeyi ortalaması $0,88$ mg/dl; eGFR ortalaması $92,14$ ml/dk/1.73 m² (MDRD) olarak belirlenmiştir.

Hastaların hepsinde renin anjiyotensin sistemi (RAS) blokajı yapan ilaç verildiği, bağımsızlık baskılayıcı tedavilerin ise hastaların %55'ine (n=11) uygulandığı kaydedilmiştir. Bağımsızlık baskılayıcı tedavi modellerinden alkilleyici ajan içeren klorambusil + metilprednizolon (n=1) ve siklofosamid + metilprednizolon (n=2), kalsinörin inhibitörü içeren siklosporin + metilprednizolon (n=5) kombinasyonlarının tercih edildiği; dört hastaya ise sadece metilprednizolon verildiği saptanmıştır. Bağımsızlığı baskılayıcı ilaç verilen hastaların %81,8'inde (n=9) tanı sırasında ağır derecede proteinüri düzeyleri kaydedilmiştir.

Hastaların hiçbirinde gereklilik oluşmadığından böbrek yerine koyma tedavisi uygulanmadığı belirlenmiştir. Hastaların izlem süresi boyunca; serum kreatinin düzeyi iki katına çıkmadığından, eGFR'de %50'den fazla azalma görülmediğinden ve böbrek yerine koyma tedavisi gereksinimi olmadığından böbrek sağkalım analizi yapılamamıştır.

Işık mikroskopi bulgularından glomerüler bazal membran kalınlığı hastaların %20'sinde (n=4) normal ve hafif kalınlaşmış olarak görülürken, %80'inde orta ve belirgin derecelerde glomerüler bazal kalınlaşması (n=16) izlenmektedir. Tüm hastalarda tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis geliştiği, en çok %85 oranla hafif düzeyde interstisyel 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 ve 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 immünfloresan bulgularına bakıldığında, hastaların tümünde glomerüler bazal membranda 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) glomerüler bazal membranda 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.

Glomerüler C4d boyanması hastaların %90'ında (n=18) pozitif, %10'unda (n=2) negatif olarak belirlenmiştir. Pozitif boyanan biyopsilerde de C4d boyanma yoğunluğu açısından yedi hastada glomerüler bazal membranda ince granüler boyanma (derece 1), altı hastada glomerüler bazal membranda kalın granüler boyanma (derece 2), beş hastada glomerüler bazal membranda 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 1,2).

Negatif-hafif derecede C4d boyanan grup ile orta-şiddetli derecede C4d boyanan grup karşılaştırılmış, C4d birikim derecesinin şiddeti ile demografik ve klinik veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı birliktelik bulunmamıştır. Segmental skleroz yüzdesinin (p=0,017), IgA birikiminin (p=0,044), kappa ile lambda proteinlerinin (sırasıyla p=0,029, p=0,049) negatif-hafif derecede C4d boyanan grup ile anlamlı birlikteliği saptanmıştır. Negatif-hafif derecede C4d boyanan grupta, bu bulgulara global skleroz yüzdesi ve IgG birikimi de istatistiksel düzeye ulaşmamakla birlikte eşlik etmektedir. Orta-şiddetli derecede C4d boyanan grupta; daha ileri evrelerde bazal membran kalınlığı, daha fazla sayıda arter duvar kalınlaşması ve interstisyel inflamasyon varlığı istatistiksel anlamlılığa ulaşmamakla birlikte dikkat çekicidir. Tablo I'de çalışmaya dahil edilen birincil MN tanılı hastaların böbrek biyopsisi yapıldığı sıradaki özellikleri görülmektedir.

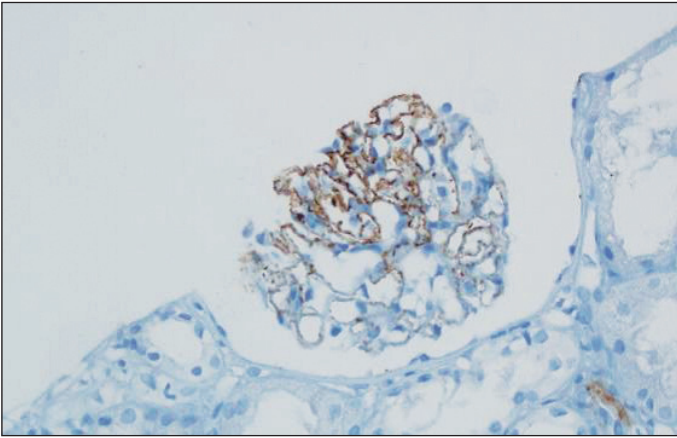
Biyopsiler segmental ve global paternde olmak üzere iki grup olarak değerlendirildiğinde altı biyopsinin segmental, 12 biyopsinin ise global boyandığı belirlenmiştir. Global paternde boyanma ile orta-şiddetli derecede C4d boyanması arasında anlamlı birliktelik saptanmıştır (p=0,001). Bu bulgu üzerine, hastaların C4d boyanma paternine puan verilmiş (segmental patern bir puan, global patern iki puan), bu puanlar ile C4d boyanma derecesi çarpılarak skorlama yapılmıştır. Segmental/global paternde boyanma çarpan skorunun orta-ağır derecede C4d boyanan grupta istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek olduğu görülmüştür (p<0,01). C4d Boyanma Paterni ile C4d Boyanma Yoğunluğu Arasındaki İlişki Tablo II'de, C4d Boyanma Yoğunluğunun Segmental/Global Paternde Boyanma Çarpan Skoru ile Birlikteliği Tablo III'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Çalışmaya dahil edilen birincil membranöz nefropati tanımlı hastaların böbrek biyopsisi yapıldığı sıradaki özellikleri.

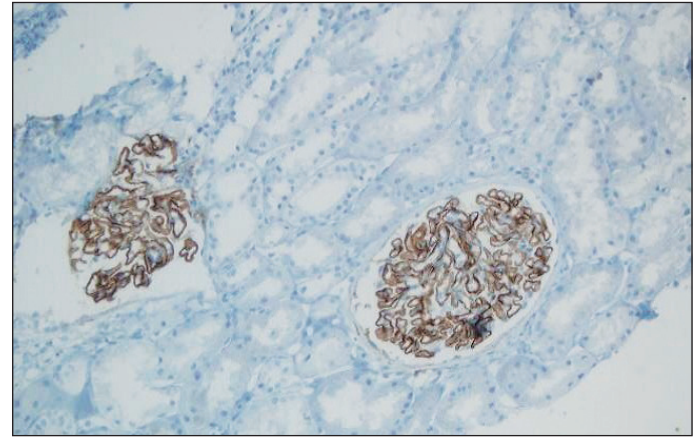
Hasta kohortu	Klinik bulgular				Işık mikroskopik bulguları						İmmünofloresan bulgular						C4d boyanma derecesi/paterni/(S)	İz süre (ay)	Tedavi	
	Yaş	HT	Pr	Cr	Cl Cr	Alb	BM	Mezan hipersel	IF/TA	İnt Enf	Skleroz (%S)/G	Art/arteriol duvar k	IgG	IgA/IgM	C3	C1q				Kappa/lambda
1	67	Var	7800	0,93	60	3,2	+++	+	+/+	+	0/0	+/+	2	0/0	0	0	1/1	2/G (4)	50	Cyc+Ste
2	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	58	Yok	10,000	0,73	82	3,4	+++	+	+/+	+	0/0	+/+	2	0/0	0	0	2/2	3/G (6)	64	KI+Ste
4	40	Yok	4990	0,47	147	2,77	+	N	+/-	-	0/0	+/+	1	0/0	1	0	1/1	3/G (6)	8	ACEi/ARB
5	51	Yok	1780	1,21	63,2	3,91	++	+	+/+	+	0/0	N/+	3	1/1Ω	1	0	3/3	1/G (2)	17	Ste
6	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	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	48	Var	3800	0,8	77	3,2	+	N	+/+	-	0/9	+/+	1	0/0	0	0	1/1	0 (0)	62	ACEi/ARB
9	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	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	72	Yok	1420	0,81	94	3,75	+++	N	+/+	+	0/9	+/+	3	0/1Ω	1	0	1/1	3/G (6)	7	ACEi/ARB
12	48	Yok	22890	0,65	131	2	+++	N	+/+	+	0/0	+/+	3	0/0	0	0	0/1	2/G (4)	44	Csa +Ste
13	48	Yok	7800	0,56	116	2,9	++	+	+/-	-	0/2,9	N/+	3	0/1Ω	1	0	2/2	2/G (4)	40	ACEi/ARB
14	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	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	44	Yok	15200	1,64	46	2,9	++	N	+/+	+	0/9	+/+	3	0/0	2	1	1/2	2/G (4)	130	ACEi/ARB
17	48	Var	13000	1,33	57	2,3	++	+	+/+	+	0/0	+/+	2	0/0	2	0	2/2	2/G (4)	46	Csa +Ste
18	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	50	Var	11500	0,75	82	2,5	++	+	+/+	+	0/7,6	+/+	1	0/0	0	*	*/*	3/G (6)	6	Ste
20	46	Yok	9930	0,83	100	3,2	+++	+	+/+	+	28,5/0	+/+	3	2/1	1	1	2/3	1/S (1)	45	Ste

HT: Hipertansiyon varlığı (≥140/90 mmHg hipertansiyon var; <140/90 mmHg hipertansiyon yok), **Pr:** Proteinüri (mg/gün), **Cr:** Serum kreatinin düzeyi (mg/dl), **C1q:** Kreatinin klerensi MDRD'ye göre (ml/dk/1.73m²), **Alb:** Serum albumin düzeyi (g/dl), **BM:** Bazal membranda kalınlaşma (N: normal bazal membran, + hafif kalınlaşma, ++ orta düzeyde kalınlaşma, +++ belirgin kalınlaşma), **Mezan hipersel:** Mezangial hipersellülarite (N: Normal mezangium, + hafif derecede hipersellülarite, ++ orta derecede hipersellülarite, +++ şiddetli derecede hipersellülarite), **IF/TA:** İnterstisyel fibrozis/tübüler atrofi dereceleri (+ hafif, ++ orta, +++ şiddetli), **İnt Enf:** İnterstisyel enfamasyon (+ hafif derecede, - enfamasyon yok), **Skleroz (%S)/G:** Segmental sklerozlu glomerül yüzdesi/global sklerozlu glomerül yüzdesi, **Art/arteriol duvar k:** Arteriyel/arteriyel duvar kalınlığı artışı (N: Duvar kalınlığı normal, + hafif derecede kalınlaşma, ++ belirgin kalınlaşma), **direkt IF'de IgG, IgA, IgM, C3, C1q** boyanma dereceleri 0: negatif, 1: hafif, 2: orta, 3: şiddetli derecelerde boyanma; İmmünhistokimyasal C4d boyanmasında derece 1 ince granüller, derece 2 kalın granüller, derece 3 kaba depozit şeklinde, C4d boyanma paterni **S:** Diffüz-segmental, **G:** Diffüz-global, **(S)** Segmental-global C4d boyanması çarpan skoru, **Cyc:** Siklofosamid, **Ste:** Steroid, **KI:** 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. (Ω) 5, 11 ve 13 no.lu hastalarda hafif IgM boyanması sadece mezangiumda görülmüştür.



Şekil 1: Glomerülde bazal membranda kalın granüler (derece 2) ve segmental paternde C4d boyanması (x40).



Şekil 2: Glomerülde bazal membranda kalın granüler (derece 2) ve global paternde C4d boyanması (x40).

Tablo II: C4d boyanma paterni ile C4d boyanma yoğunluğu arasındaki ilişki.

	Negatif (n=2)	Segmental paternde boyanma (n=6)	Global paternde boyanma (n=12)	p değeri
C4d negatif-hafif derecede boyananlar (n=9)	%22,2 (n=2)	%66,7 (n=6)	%11,1 (n=1)	> 0,05
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-şiddetli derecede boyandığı grup ile segmental paternde boyanmaya göre daha fazla birlikte bulunduğu göstermektedir.

Tablo III: C4d boyanma yoğunluğunun segmental/global paternde boyanma çarpan skoru ile birlikteliği.

		C4d negatif-hafif derecede boyananlar (n=9)	C4d orta-şiddetli derecede boyananlar (n=11)	p değeri
Segmental/global paternde boyanma ve C4d derece çarpanı	Ort ± SS	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, ± SS: Standart sapmayı, Med: Ortanca değeri, Min-Maks: Minimum ve 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 boyanan gruplar klinik ve demografik açıdan karşılaştırıldığında, proteinürinin hafif, orta ve ağır dereceleri olarak sınıflandırıldığı analizde üçüncü aydaki proteinüri düzeyi global paternde boyanan grupta daha yüksek bulunmuştur (p=0,027).

TARTIŞMA

Çalışmamızda C4d monoklonal antikoruna 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 göstermektedir (17-20).

Kusunoki ve ark.nın yapmış olduğu çalışmada ise; direkt immünfloresan yöntemin kullanılmış, birincil MN tanısı alan 12 hastanın böbrek dokusunda %92 oranında C4d pozitif boyanması saptanmıştır (17).

Val-Bernal ve ark.nın yapmış olduğu bir çalışmada da; benzer yöntemle birçok glomerülonefrit tipinde C4d boyanması yapılmış, 31 birincil MN hastasının tamamında glomerüler bazal membran boyunca çalışmamızdaki evrelerle aynı şekilde tanımlanan pozitif C4d boyanması saptanmıştır (18).

Espinosa-Hernández ve ark.nın yapmış olduğu bir çalışmada; minimal değişiklik hastalığı tanısı alan 19 ve birincil MN tanısı alan 21 hastanın böbrek dokuları immünohistokimyasal yöntemle C4d monoklonal antikoru ile yeniden boyanmıştır. MN tanısı alan hastaların tümünde C4d birikimi saptanırken, minimal değişiklik hastalığı tanısı alan hastaların hiçbirinde C4d birikimi saptanmamıştır (19).

Hui ve ark.nın yapmış oldukları bir çalışmada; birincil MN tanısı alan 25, lupus nefritine ikincil MN tanısı alan 17 ve hepatit C enfeksiyonuna ikincil MN tanısı alan iki hastanın böbrek dokuları immünohistokimyasal yöntemle C4d monoklonal antikoru ile yeniden boyanmıştır. Birincil ve ikincil MN tanısı alan hastaların tamamında glomerüler bazal membran boyunca granüler C4d pozitifliği saptanmıştır (20).

Sunulan çalışmamızda, C4d boyanması negatif saptanan iki hastada pozitif boyanma elde edilememesinin nedeni hastalığın başlaması ile başvuru arasında geçen sürenin kısalığı olabilir. C4d boyanması negatif saptanan iki hastanın biyopsi örneğinde interstisyel fibrozis ile tübül atrofisinin hafif derecelerde olması da bu durumu destekliyor olabilir. C4d boyanması negatif saptanan iki hastanın biyopsi örneğinde direkt immünfloresan bulguları açısından da, IgG birikiminin ve C3 birikiminin orta ve şiddetli derecelere ulaşmadığı görülmüştür. Yine bu iki hastada biyopsi sırasında proteinüri düzeyi de 4 g/gün'ün altındadır. Tüm bu veriler ışığında, iki hastadaki MN'nin 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 glomerüler C4d boyanma dereceleri negatif (glomerüler bazal membranın %25'inden azının boyanması), hafif (ince granüler), orta (kalın granüler) ve şiddetli (kaba depozitlenmeler) olarak belirlenmiştir. MN ile yapılan çalışmalarda glomerüler C4d boyanma dereceleri ve paternleri açısından uluslararası kabul görmüş bir sınıflandırma yöntemi bulunmamaktadır. Kim ve ark. yapmış oldukları bir çalışmada; lupus nefriti tanısı almış hastalarda glomerüler C4d boyanma derecelerini gruplandırmak açısından bizim kullandığımız sınıflandırmaya benzer bir sınıflandırma yöntemi kullanmışlardır (23).

Hastalar negatif ve hafif derecede boyananlar ile orta ve şiddetli derecede boyananlar olarak iki gruba ayrılmıştır. Çalışmamızda C4d'nin boyanma derecesi ve paterni ile geleneksel risk faktörleri arasında korelasyon bulunmamıştır. Segmental skleroz yüzdesinin C4d'nin negatif-hafif derecede boyandığı grupta yüksek saptanması ve global skleroz yüzdesinin de istatistiksel anlamlılığa ulaşmasa da aynı grupta daha yüksek olması dikkat çekicidir. Bu bulgu, sklerozun kompleman bağlı hasardan farklı bir mekanizma ile de oluşabilen bağımsız bir risk faktörü olmasına bağlanmıştır.

Negatif-hafif derecede C4d boyananlarda IgA'nın ve kapp ile lambda'nın anlamlı birlikteliği; birincil MN dışında enfeksiyon gibi ikincil nedenlere bağlanmıştır. IgA'nın birincil MN'de eser miktarda birikimi veya hiç saptanmaması beklenen bir bulgudur (24). Bundan dolayı IgA'nın C4d negatif ve hafif derecede boyanan hastalarda eser miktarda pozitif saptanması, aktif izlemde kalan bu hastalarda tanı sırasında geçirilmiş viral enfeksiyon gibi durumlar sonrasında biyopsi uygulanmasına bağlı olabilir. Yani patogeneze birincil bir etken olarak düşünülmemiştir. Aynı şekilde immünglobulinler içinde özgün olmayan proteinler olarak kapp ve lambda'nın negatif ve hafif derecede C4d boyanan hastalarda istatistiksel anlamlı düzeye ulaşması birincil MN'de böbrek hasarlanması ve prognoz açısından önem taşımamaktadır. Kapp ve lambda proteinleri için birincil MN'de beklenen, birikim derecelerinin yüksekliğinden çok, yaklaşık ve eşit derecelerde saptanmalarıdır (25).

İstatistiksel anlama ulaşmasa da interstisyel inflamasyon 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.

Global paternde boyanma ile orta-şiddetli derecede C4d boyanması arasında anlamlı birliktelik saptanması MN'de global paternde immün birikimin daha yaygın olabileceğini düşündürmektedir. C4d'nin global paterninin şiddetli derecelerde C4d boyanması ile birliktelik göstermesi erişkin MN'de 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.

Çalışmada başlangıçta böbrek sağkalımı analizi yapılması planlanmıştır. Ancak izlem süreleri altı 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 eGFR'de %50'den fazla azalma görülmediğini saptanmıştır. 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.

C4d birikimi immünohistokimyasal yöntemle geriye dönük olarak gösterilebilmektedir (20). Ancak prognostik bir risk faktörü olup olmadığı gösterilememiştir (26). Literatürde, birincil MN'de C4d'nin prognoz üzerine etkisini inceleyen sadece bir çalışma bulunmaktadır. Sepe ve arkadaşlarının yapmış oldukları bu çalışmada; birincil MN tanısı alan, glomerüllerde global ve diffüz C4d boyanması gözlenen 15 hastada altıncı ay sonunda proteinüri düzeyinin daha fazla, eGFR değerinin ise daha düşük olduğu saptanmıştır (27).

C4d komplemanın klasik ve lektin yollarında açığa çıkan bir yan üründür (28). Lektin yolunun belirteci olarak C4d ile bulguların negatif korelasyonu düşünüldüğünde, farklı bir mekanizma olarak alternatif yolun da hastalıkta aktiveşebileceği 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 değerlendirildiği ve ayrıca daha fazla sayıda hastanın dahil edildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Floege J, Amann K: Primary glomerulonephritis. *Lancet* 2016;387: 2036-2048
2. Haas M, Meehan SM, Karrison TG, Spargo BH: Changing etiologies of unexplained adult nephrotic syndrome: A comparison of renal biopsy findings from 1976-1979 and 1995-1997. *Am J Kidney Dis* 1997;30:621-631
3. Beck LH Jr, Salant DJ: Membranous nephropathy: from models to man. *J Clin Invest* 2014;124:2307-2314
4. Glassock RJ: The pathogenesis of membranous nephropathy: Evolution and revolution. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2012;21:235-242
5. Francis JM, Beck LH Jr, Salant DJ: Membranous Nephropathy: A journey from bench to bedside. *Am J Kidney Dis* 2016;68:138-147
6. Donadio JV Jr, Torres VE, Velosa JA, Wagoner RD, Holley KE, Okamura M, Ilstrup DM, Chu CP: Idiopathic membranous nephropathy: The natural history of untreated patients. *Kidney Int* 1988;33:708-715
7. Schieppati A, Mosconi L, Perna A, Mecca G, Bertani T, Garattini S, Remuzzi G: Prognosis of untreated patients with idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med* 1993;329: 85-89
8. Polanco N, Gutiérrez E, Covarsí A, Ariza F, Carreño A, Vigil A, Baltar J, Fernández Fresnedo G, Martín C, Pons S, Lorenzo D, Bernis C, Arizabalaga P, Fernández-Juárez G, Barrio V, Sierra M, Castellanos I, Espinosa M, Rivera F, Olié A, Fernández-Vega F, Praga M: Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:697-704
9. Glassock RJ: Diagnosis and natural course of membranous nephropathy. *Semin Nephrol* 2003;23:324-332
10. Du Buf-Vereijken PW, Branten AJ, Wetzels JF: Idiopathic membranous nephropathy: Outline and rationale of a treatment strategy. *Am J Kidney Dis* 2005;46:1012-1029
11. Quaglia M, Stratta P: Idiopathic membranous nephropathy: Management strategies. *Drugs* 2009;69:1303-1317
12. Hofstra JM, Fervenza FC, Wetzels JF: Treatment of idiopathic membranous nephropathy. *Nat Rev Nephrol* 2013;9:443-458
13. Cattran DC, Reich HN, Beanlands HJ, Miller JA, Scholey JW, Troyanov S (Genes, Gender and Glomerulonephritis Group): The impact of sex in primary glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2008;23:2247-2253
14. Reichert LJ, Koene RA, Wetzels JF: Prognostic factors in idiopathic membranous nephropathy. *Am J Kidney Dis* 1998;31:1-11
15. Segal PE, Choi MJ: Recent advances and prognosis in idiopathic membranous nephropathy. *Adv Chronic Kidney Dis* 2012;19: 114-119
16. Murata K, Baldwin WM 3rd: Mechanisms of complement activation, C4d deposition, and their contribution to the pathogenesis of antibody-mediated rejection. *Transplant Rev (Orlando)* 2009;23:139-150
17. Kusunoki Y, Itami N, Tochimar H, Takekoshi Y, Nagasawa S, Yoshiki T: Glomerular deposition of C4 cleavage fragment (C4d) and C4-binding protein in idiopathic membranous glomerulonephritis. *Nephron* 1989;51:17-19
18. Val-Bernal JF, Garijo MF, Val D, Rodrigo E, Arias M: C4d immunohistochemical staining is a sensitive method to confirm immunoreactant deposition in formalin-fixed paraffin-embedded tissue in membranous glomerulonephritis. *Histol Histopathol* 2011;26:1391-1397
19. Espinosa-Hernández M, Ortega-Salas R, López-Andreu M, Gómez-Carrasco JM, Pérez-Sáez MJ, Pérez-Seoane C, Aljama-García P: C4d as a diagnostic tool in membranous nephropathy. *Nefrologia* 2012;32:295-299
20. Hui M, Uppin MS, Prayaga AK, Raju SB, Rajasekhar L: C4d immunohistochemistry in membranous nephropathy. *J Lab Physicians* 2014;6:76-79
21. Beck L, Bomback AS, Choi MJ, Holzman LB, Langford C, Mariani LH, Somers MJ, Trachtman H, Waldman M: KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Am J Kidney Dis* 2013;62:403-441
22. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D: A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: A new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461-470
23. Kim MK, Maeng YI, Lee SJ, Lee IH, Bae J, Kang YN, Park BT, Park KK: Pathogenesis and significance of glomerular C4d deposition in lupus nephritis: Activation of classical and lectin pathways. *Int J Clin Exp Pathol* 2013;6:2157-2167

24. Schwartz MM: Membranous glomerulonephritis. In: Jennette JC, Olson JL, Schwartz MM, Silva FG (eds). *Heptinstall's Pathology of the Kidney*. (6th ed). Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 205-251
25. Uppin MS, Prayaga AK, Srinivas BH, Rapur R, Desai M, Dakshina Murthy KV: Light chain immunofluorescence in various nephropathies. *Indian J Pathol Microbiol* 2011;54:55-58
26. Cohen D, Colvin RB, Daha MR, Drachenberg CB, Haas M, Nickenleit V, Salmon JE, Sis B, Zhao MH, Bruijn JA, Bajema IM: Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney Int* 2012;81:628-639
27. Sepe V, Albrizio P, Dal Canton A: C4d glomerular deposits and disease progression in native idiopathic membranous nephropathy. *J Nephrol Ther* 2015;5:1-5
28. Sethi S, Nasr SH, De Vriese AS, Fervenza FC: C4d as a diagnostic tool in proliferative GN. *J Am Soc Nephrol* 2015;26:2852-2859