

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**İMMÜNGLOBULİN A NEFROPATİLİ HASTALARDA C4d, ADAM10 VE
WT1 EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI VE PROGNOZ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Gözde Elif TAŞAR KAPAKLI

UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

ANKARA
2020

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PATOLOJİ ANABİLİM DALI

**İMMÜNGLOBULİN A NEFROPATİLİ HASTALARDA C4d, ADAM10 VE
WT1 EKSPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI VE PROGNOZ ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Gözde Elif TAŞAR KAPAKLI

UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Arzu SAĞLAM AYHAN

ANKARA
2020

TEŞEKKÜR

(Bu araştırma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından THD-2018-16882 numaralı bilimsel araştırma projesi olarak desteklenmiştir).

Nefropatolojiye olan ilgimi destekleyen, tez sürecinde karşılaştığım her sorunu sabırla ve sahiplenerek karşılayan, tüm engellere akılcı ve pratik çözümler bulan, danışmanlığıyla tezimi yaptığım Doç. Dr. Arzu Sağlam Ayhan'a

Çalışmanın hazırlık sürecindeki yönlendirmeleri ve daha sonraki katkıları nedeniyle Prof. Dr. Dilek Ertoy Baydar, Prof. Dr. Yunus Erdem ve Dr. Müge Üzerk Kibar'a,

Çalışmanın plan aşamasındaki yönlendirmeleri nedeniyle Dr. Duygu Aydın Haklı'ya ve istatistiksel analizlerini yapan Dr. Osman Dağ'a,

Arşivden preparatların teminini gerçekleştiren Lokman Kale'ye, arşivden preparatların temini, blokların çıkartılması ve kesit yapılmasında desteklerini esirgemeyen Rahime Çiçek'e, immünohistokimyasal yöntemlerin uygulanmasında yardımcı olan teknisyenlerimiz Özlem Kalaycı, Ziya Birinci, Sultan Selim Saraç ve Gökalp Zarif İşal'a,

Asistanlığım boyunca iyi bir eğitim almamı önemseyen, geleceğe yönelik kaygılarımı bir nebze azaltan değerli hocalarıma ve birlikte çok güzel hatıralar biriktirdiğimiz asistan arkadaşlarıma,

Eğitim sürecim boyunca desteklerini hiç esirgemeyen anne ve babama, bu süreçte kızımın bakımında yardımlarını ve sevgisini esirgemeyen Gülizar Avan'a,

Araştırma görevliliğine başladığımdan beri sabırla ve özveri ile desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Abdulkadir Kapaklı'ya,

Varlığı bana her daim motivasyon ve umut veren çok sevgili kızım Gülse'ye en içten duygularıyla teşekkür ederim.

ÖZET

Taşar Kapaklı G. E., İmmünglobulin A nefropatili hastalarda C4d, ADAM10 ve WT1 ekspresyonunun araştırılması ve prognoz üzerine etkisi, Hacettepe Üniversitesi, Patoloji Tezi, Ankara, 2020. İmmünglobulin A (IgA) nefropatisi dünyada en sık görülen primer glomerüler hastalık olup çok değişken klinik, morfoloji ve prognoz gösterebilmektedir. Yeni parametrelerin tanımlanması hem patogenezin daha iyi anlaşılması, hem erken dönemde prognozu öngörmede katkı sağlaması, hem de tedavi yönünde yeni açılımlar sağlaması adına önemlidir. Biz bu çalışmada IgA nefropatili hastaların böbrek biyopsilerinde C4d, ADAM10 ve WT1'in immünohistokimyasal olarak ekspresyonunu ve klinik, laboratuvar ve histopatolojik bulgular aracılığı ile bu belirteçlerin prognostik öneme sahip olup olmadıklarını araştırmayı hedefledik.

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2001-2018 yılları arasında tanı almış 128 IgA nefropatili hastanın parafine gömülü böbrek iğne biyopsi dokularından elde edilen kesitlere immünohistokimyasal olarak C4d ve ikili boyama şeklinde WT1 / ADAM10 çalışmalarını uyguladık. C4d pozitifliği perimesangial/mesangial alandaki boyanma olarak kabul edildi. Biyopsiler Oxford klasifikasyonunda yer alan parametrelere göre yeniden değerlendirildi. Hastalar yaş, cinsiyet gibi epidemiyolojik özellikleri; biyopsi anındaki günlük proteinüri, serum kreatinin ve tahmini glomerüler filtrasyon hızları gibi laboratuvar sonuçları ve kullandıkları tedavi, süreçte böbrek fonksiyon testlerinin durumu gibi klinik takip parametreleri ile yeniden değerlendirildi. Hastaların takip süreleri ve son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyip ilerlemedikleri kaydedilerek renal sağkalım analizi yapıldı.

C4d pozitif hastaların negatif hastalara göre istatistiksel anlamlı olarak daha yaşlı ve tanı anında daha yüksek proteinüri değerine sahip olduğu, daha fazla son dönem böbrek yetmezliğine ilerlediği saptandı. İstatistiksel anlamlı olarak C4d pozitif hastaların renal sağkalım süresi negatif olanlara göre daha kısa olarak gözlemlendi. C4d pozitif hastaların biyopsilerinde negatiflere göre istatistiksel anlamlı olarak daha

fazla %25'in üzerinde segmental skleroz ve daha fazla %25'in üzerinde selüler/fibroselüler kresent mevcuttur. Literatür ile uyumlu olarak mannoz bağlayıcı lektin yolağının aktivasyonuna işaret eden glomerüler perimesangial/mesangial C4d pozitifliği IgA nefropatili hastalarda kötü prognoz ile ilişkili bulundu. ADAM10 sonuçları ile klinik ya da patolojik parametreler arasında prognostik açıdan anlamlı bir ilişki elde edilemedi. Transkripsiyon düzeyinde ilişkili olduğu proteinlerin ekspresyonunu düzenleyen ve nükleer ifadenmesi olduğu bilinen WT1 proteininin aslında sitoplazmik kompartmanda da yer aldığı ve burada aktive proteozomlarla ilişkili olarak ilgili olduğu proteinlerin ekspresyonunu posttranskripsiyonel olarak da yönettiği anlaşılmıştır. Bizim serimizde de bir kısım biyopside podositlerde WT1 ile sitoplazmik ekspresyon görüldü. Sitoplazmik WT1 ekspresyonu olan hastaların proteinüri ve segmental skleroz gibi klinik ve morfolojik parametrelerden bağımsız olarak son dönem böbrek yetmezliğine daha fazla ilerlediği kaydedildi; ancak bu sonuç istatistiksel olarak anlamlılık sınırında kaldı.

Anahtar Kelimeler: IgA nefropatisi, C4d, ADAM10, WT1, prognoz

ABSTRACT

Tasar Kapakli G. E., Analysis of C4d, ADAM10 and WT1 expression in immunoglobulin A nephropathy patients and impact on prognosis, Hacettepe University, Pathology Thesis, Ankara, 2020. Immunoglobulin A (IgA) nephropathy is the most common chronic glomerular disease in the world. It has variable clinical, morphologic and prognostic features. It is important to define new parameters to better understand the pathogenesis of the disease, predict prognosis at earlier stages and to pave the path for new treatment modalities. We thus aimed to investigate the immunohistochemical expression of C4d, ADAM10 and WT-1 in kidney biopsies of IgA nephropathy patients and correlate the findings with clinical, laboratory and histopathologic features.

In this study we compiled paraffine embedded kidney core biopsy samples of patients who had received a diagnosis of IgA nephropathy between the years of 2001 and 2018 at the Pathology Department of Hacettepe University Faculty of Medicine. The sections were immunohistochemically treated with C4d and ADAM10 / WT-1 dual stain. Perimesangial/mesangial localization was accepted as positive staining. Biopsies were evaluated according to parameters of the Oxford classification, epidemiologic features (age, gender), laboratory findings at presentation (daily proteinuria, serum creatinine and estimated glomerular filtration rate) and clinical follow up (type of treatment and kidney function tests' status). Renal survival analyses was carried out by recording the follow up times and whether or not the patients progressed to end stage renal disease.

We detected that C4d positive patients were statistically significantly older, had higher proteinuria values at presentation and had a higher rate of progression to end stage renal disease. The renal survival time of C4d positive patients were statistically significantly shorter than negative ones. In the biopsies of C4d positive patients there were statistically significantly more >25% segmental sclerosis and more >25% cellular/fibrocellular crescents. In accordance with the literature mesangial/perimesangial C4d positivity, which is the indicator of activation of the

mannose binding lectine pathway, was related to bad prognosis. There wasn't any statistical significant correlation between ADAM10 staining results and clinical or pathologic parameters. It is known that WT-1 protein regulates protein expression at the transcriptional level and there is nuclear expression of this protein. It was later found out that WT-1 regulates protein expression not only at the transcriptional level but also at the posttranscriptional level, due to its relationship with active proteosomes, disclosing a possible explanation for the cytoplasmic expression of this protein. In our series, podocytes in some biopsies showed cytoplasmic expression with WT-1. The patients with cytoplasmic WT-1 expression had statistically marginally higher positivity rates of progression to end stage renal disease. It was not related to any clinical and morphologic parameters like proteinuria or segmental sclerosis.

Key Words: IgA nephropathy, C4d, ADAM10, WT-1, prognosis

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. IgA Nefropatisi Genel Bilgiler	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Patofizyoloji	4
2.1.3. Klinik Özellikler	11
2.1.4. Laboratuvar Bulguları	11
2.1.5. Patoloji	12
2.1.6. Prognoz	13
2.1.7 Tedavi	16
2.2. C4d	17
2.3. ADAM10 (ADAM Metallopeptidase Domain 10)	21
2.4. WT1 (Wilm's Tumor 1)	24
2.5. AMAÇ	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Çalışılan Populasyon	28
3.2. Tanı Anındaki ve Takip Sürecindeki Klinik Değişkenler	28
3.3. Klinik Tanımlamalar	28
3.4. Histopatolojik, İmmü floresan ve İmmünohistokimyasal çalışmalar	29
3.5. İstatistik Analiz	31
4. BULGULAR	32

4.1. Tanı Anındaki ve Takip Sürecindeki Bulgular	32
4.2. C4d pozitif ve Negatif Hastaların Karşılaştırılması	33
4.3. ADAM10 pozitif ve negatif hastaların karşılaştırılması	37
4.4. WT1 Analiz Sonuçlarının Klinik Korelasyonu	38
4.5. Renal Sağkalım Analizi	40
4.6. Erken Dönem Hastalarda C4d ekspresyonu	43
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	53
7. KAYNAKLAR	54
8. EKLER	57
Ek1. Etik Kurul Onay Belgesi	57
Ek2. İncelenen Hastaların Biyopsi Numaraları	58

SİMGELER ve KISALTMALAR

IgA	: İmmünglobulin A
IgG	: İmmünglobulin G
IgM	: İmmünglobulin M
ADAM10	: <i>ADAM Metallopeptidase Domain 10</i>
CXCL16	: CXC Kemokin ligand 16
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızı
eGFR	: Tahmini glomerüler filtrasyon hızı
ITAM	: <i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
Cosmc	: <i>core 1 β1,3galactosyltransferasespecific chaperone 1</i>
IL-6	: İnterlökin 6
ASGP-R	: Asialoglikoprotein reseptör
pIgR	: Polimerik immünglobulin reseptörü
CD89	: <i>Cluster of differentiation 89</i>
CD71	: <i>Cluster of differentiation 71</i> (Transferrin reseptörü)
TNF	: <i>Tumour necrosis factor</i>
TGFβ	: <i>Transforming growth factorβ</i>
AGTR	: Anjiotensin reseptör
κ	: Kappa
λ	: Lambda
ACE	: <i>Angiotensin-converting enzyme</i>
ACEI	: <i>Angiotensin-converting enzyme inhibitor</i>
M	: Mesangial hiperselülarite
E	: Endokapiller proliferasyon
S	: Segmental skleroz
T	: Tübüler atrofi / interstisyel fibrozis
C	: Crescent
RAS	: Renin-Anjiotensin Sistemi
KDIGO	: <i>Kidney Disease Improving Global Outcomes</i>

ARB	: Anjiotensin reseptör blokörü
MASP	: MannoZ bağlayıcı lektin ilişkili serin proteaz
MAK	: Membran atak kompleksi
MBL	: MannoZ bağlayıcı lektin
RAAS	: Renin anjiotensin aldesteron sistemi
LDL	: <i>Low density lipoprotein</i>
CXCR6	: CXC kemokin reseptör 6
CKD-EPI	: <i>The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
H&E	: Hematoksilen-eozin
PAS	: <i>Periodic acid Schiff</i>
PAMS	: <i>Periodic acid methenamine silver</i>
JMS	: <i>Jones methenamine silver</i>
MTC	: Masson trikrom
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i>
WT1	: <i>Wilm's tumor 1</i>
DAB	: 3,3'- Diaminobenzidine
AEC	: 3-Amino-9-ethylcarbazole
BFT	: Böbrek fonksiyon testi
mRNA	: mesajcı ribonükleik asit
miRNA	: mikro ribonükleik ait
IGF-I	: <i>insulin like growth factor</i>
PDGF-A	: <i>platelet derived growth factor A-chain</i>
HR	: <i>Hinge region</i>
Poli IgA	: Polimerik İmmünglobulin A

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1. IgA1, IgA2 ve dimerik IgA1 moleküllerinin yapılarını gösteren diagram (1) no'lu referanstan aynen alınmıştır.	5
Şekil 2. Normal galaktozile IgA1 molekülü ile eksik galaktozile IgA1 molekülleri (1) no'lu referanstan aynen alınmıştır.	6
Şekil 3. Dolaşan immün kompleksler mezangial hücrelerin yüzeyinde bulunan transferrin reseptörü (CD71) ile etkileşerek mezangial hücre aktivasyonuna neden olurlar. Mezangial hücreler çoğalır ve mezangial matriks üretimini artırır. (1) no'lu referanstan aynen alınmıştır.	9
Şekil 4. MEST-C; A) Segmental skleroz (MTC), B) Mesangial hiperselülarite (H&E), C) Selüler kresent ve endokapiller proliferasyon (PAS), D) Tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis (MTC).	16
Şekil 5. C4d klasik ve lektin yollarının aktivasyonu ile oluşabilir. C1q saptanmayan hastalarda klasik kompleman yolak aktivasyonu dışlanabilir. MBL, Mannose-binding lectin. (21) no'lu referanstan aynen alınmıştır.	19
Şekil 6. C4d boyanma lokalizasyonları; A) perimesangial/mesangial, B) periferel, C) segmental skleroza çökmüş, D) perifeal ve mesangial/perimesangial	34
Şekil 7. ADAM10 ile distal tübül epitel hücrelerinde membranöz boyanma	38
Şekil 8. WT1 boyanma lokalizasyonları; A) Sitoplazmik, B) Nükleer	39
Şekil 9. C4d durumuna göre Kaplan-Meier renal sağkalım eğrisi; C4d pozitif hastalarda C4d negatif olanlara göre renal sağkalım süresinin daha kısa olduğunu göstermektedir (Log Rank p=0.005). "Sansür" son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemeyen hastaları ifade etmektedir.	42

TABLULAR

	Sayfa
Tablo 1. Mesangial/Perimesangial C4d Birikimine Göre Hastaların Biyopsi Anındaki Patolojik Özellikleri	35
Tablo 2. Mesangial/Perimesangial C4d Birikimine Göre Hastaların Biyopsi Anı ve Takip Sürecindeki Klinik Özellikleri	36
Tablo 3. WT1 Boyamasına Göre Hastaların Takip Sürecindeki Klinik Özellikleri	39
Tablo 4. C4d ve WT1 Boyamasının Karşılaştırması	40
Tablo 5. Son Dönem Böbrek Yetmezliğine Gidişi Etkileyen Faktörler	41
Tablo 6. Çoklu Lojistik Regresyon Analizi	43

1. GİRİŞ

İmmünglobulin A (IgA) nefropatisi dünyada en sık görülen primer glomerüler hastalık olup IgA nefropatili bireylerin 1/3'ü son dönem böbrek hastalığına ilerlemektedir. Klinik prezantasyon şekli ve histomorfolojik görünümü çok çeşitli olmakla birlikte en sık klinik prezantasyon şekli mikroskopik ve tekrarlayıcı makroskopik hematüri ile birlikte düşük dereceli proteinüri, en sık ışık mikrokopi bulgusu diffüz ve global mesangial hiperselülaritedir. İmmünfloresan bulgusu mesangial IgA immün komplekslerinin birikimidir (1, 2). Son yıllarda IgA nefropatisinin patogenezi anlamak için belirgin ilerlemeler yaşanmış olsa da moleküler temeli hala tam anlamıyla aydınlatılamamıştır. Bu nedenle şimdiye kadar tanısal anlamda ve hastalığın şiddetini tahmin etmede birçok molekül tanımlanmış olsa da IgA nefropatisinin prognozunu belirleme anlamında yeterince başarılı bir belirteç elde edilememiştir. Aynı sebeple şu anda kullanılan tedavi seçenekleri de yeterince etkili ve hedefe yönelik değildir. "Proteomik" yaklaşımı ile IgA nefropatisinde ve diğer glomerüler hastalıkların patogenezinde yer alan biyokimyasal moleküler değişimler tanımlanmaya çalışılmaktadır ve daha ileri hastalık spesifik çalışmalar için açılım aranmaktadır. Bu çalışmalarda gündeme gelen moleküllerden biri "ADAM Metallopeptidase Domain 10" (ADAM 10)'dur (3-5). ADAM10, podositlerde ve mezangial hücrelerde ifadelenen kemokin olan CXCL16'nın çözülebilir formunu artırarak inflamatuvar hücre migrasyonundan sorumludur. Ayrıca bu molekülün mesengioproliferatif hastalıklarda, patogenezinde podositopatilerin tanımlandığı glomerüler hastalıklarda ve glomeruloskleroza sorumlu olduğu da gösterilmiştir. (6-8). Yanısıra, prognozu öngörmede, kompleman yollarından mannoz bağlayıcı lektin (MBL) yolağının aktivasyonuna işaret eden C4d molekülü üzerinde çalışılmış olup bu molekülün hem erişkin hem de pediatrik yaş grubunda mesangial alanlardaki varlığının klinik ve histomorfolojik olarak ileri evreye işaret eden bir takım parametrelerle korele olduğu izlenmiştir (9-11). Buradan yola çıkarak bir disintegrin ve metalloproteinaz olan ADAM10 molekülünün, kompleman yollarından mannoz bağlayıcı lektin yolağının aktivasyonuna işaret eden C4d molekülünün ve matür

podositlerde nükleer ifadelenmesi olduğu bilinen WT1 proteininin IgA nefropatili hastaların böbrek biyopsilerinde ekspresyonunun araştırılması ve bu belirteçlerin hastalığın patogenezi ile prognozu üzerindeki etkilerinin gösterilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. IgA Nefropatisi Genel Bilgiler

2.1.1. Epidemiyoloji

IgA nefropatisinin sıklığı kıtadan kıtaya, ülkeden ülkeye ve hatta bir ülke içerisindeki çeşitli bölgelerde farklılıklar göstermektedir. Bunun nedenleri arasında birinci basamak sağlık hizmetine ulaşımın değişken olması ve her bölgede böbrek biyopsisi uygulama endikasyonlarının farklı olması da yer almaktadır. IgA nefropatisi, primer glomerüler hastalıkların, gelişmiş Asya ülkelerinde %40-50'si, Avrupa ülkelerinde %20-30'u ve Amerika'da %10-20'sini oluşturmaktadır. Afrika ülkelerinde yaygın olmayan bir hastalıktır. Gelişmekte olan ülkelerde birinci basamak sağlık hizmetlerine ulaşımın güç olması nedeniyle IgA nefropati sıklığı az iken; aksine gelişmiş ülkelerde birinci basamak sağlık hizmetlerine ulaşımın kolay olması, erken tanı ve takip yönetiminin gelişmiş olması nedeniyle IgA nefropatisi sıklığı daha yüksektir. Gelişmiş ülkelerde sıklığının fazla olma nedenleri; giderek gelişim gösteren biyopsi tekniklerine bağlı komplikasyonların azalması, kreatinin yüksekliği ya da glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalma olmadan persistan mikroskopik hematüri varlığında biyopsi yapma ve immünfloresan yöntemi ile IgA içeren komplekslerin tespit edilmesidir. IgA nefropati sıklığındaki farklılıklara neden olan diğer değişkenler ise sosyoekonomik düzey, yaş, genetik alt yapı ve cinsiyettir. Sosyoekonomik düzey insanların sağlık problemlerine olan ilgisinin düzeyi ile korelidir. Buna göre daha gelişmiş sosyoekonomik düzeye sahip bölgelerde sıklık artmaktadır. IgA nefropati riski ile ilişkili aday genler ve koruyucu genler insan genom çalışmalarında ortaya konmuştur. Buna göre Doğu Asya ülkelerinde daha sık izlenirken, Afrika ülkelerinde en az oranda rastlanmaktadır. Sıklıkla çocuklarda ve genç erişkinlerde izlenen bir hastalıktır. Hafif bir erkek baskınlığı mevcuttur (2).

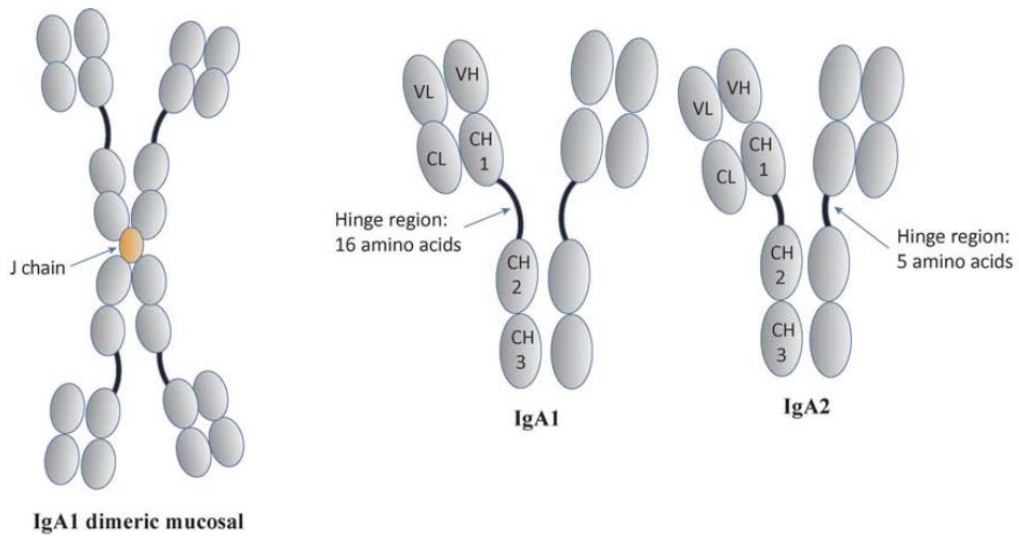
2.1.2. Patofizyoloji

IgA nefropatisi etiyolojik olarak multifaktoriyel bir hastalığı temsil etmektedir. Makroskopik hematüri ataklarının mukozal enfeksiyonlarla eş zamanlılık gösteriyor olması mikrobiyal ajanların hastalığın gelişiminde tetikleyici rol aldığını göstermektedir. Yanı sıra tanımlanan genlerdeki değişikliklere bağlı %6-8 oranında risk artışı tespit edilmiştir. Bu genler ailesel IgA nefropatili hastalardan faydalanılarak tanımlanmış olup; doğal immün sistem ve kompleman sistemi, antijen işleme, sunma ve mukozal IgA üretiminin düzenlenmesi ile ilişkili çok sayıda protein kodlanmasından sorumludur (12).

IgA nefropatisi patogenezi bir çerçeve yaratmak ve yapılacak çalışmalara yön vermek amacıyla çoklu vuruş modeli geliştirilmiştir. Tek başına ele alındığında çoklu vuruş modeli, oldukça kompleks nitelikte olan IgA nefropatisi patogenezi oldukça basite indirgemektedir. Modele göre öncelikle glakatozilasyon defekti gösteren IgA1 moleküllerinde artış meydana gelir (vuruş 1) ve bunlara karşı IgA ve immünglobulin G (IgG) gibi otoantikorlar gelişerek (vuruş 2) dolaşan immün kompleksler ortaya çıkar (vuruş 3). Dolaşan immün kompleksler mesangial hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörler aracılığıyla mesangial hücre ve kompleman yollarının aktivasyonuna ve mesangial-podositik-tübüler iletişim aracılığıyla glomerüllerde ve interstisyel mesafede hasara yol açar (vuruş 4) (2, 12).

Modeli ayrıntılandırarak inceleyecek olursak; IgA moleküllerini kodlayan genler iki adet olup 14. kromozom üzerinde yer almaktadır. Mukozal yüzey sekresyonlarında yer alan bu antikor; epitelyal bariyer bütünlüğünün devamını sağlar, mikrobiyal ve diğer çevresel antijenlerin vücuda girişini sınırlar ve kommensal mikrobiyal bileşenlerin düzenlemesini yapar.

IgA molekülü iki ağır, iki hafif zincirden meydana gelmektedir. Herbir ağır zincirde bir değişken, üç sabit bölge var iken; her bir hafif zincirde bir değişken bir sabit bölge bulunmaktadır. IgA molekülünü diğer immünglobulinlerden farklı kılan özelliklerden biri, ağır zincirdeki birinci ve ikinci sabit bölgeler arasındaki menteşe bölgesi (hinge region)' dir. Bir diğeri ise IgA molekülünün hem monomerik hem de dimerik formda bulunabilmesidir (şekil 1).



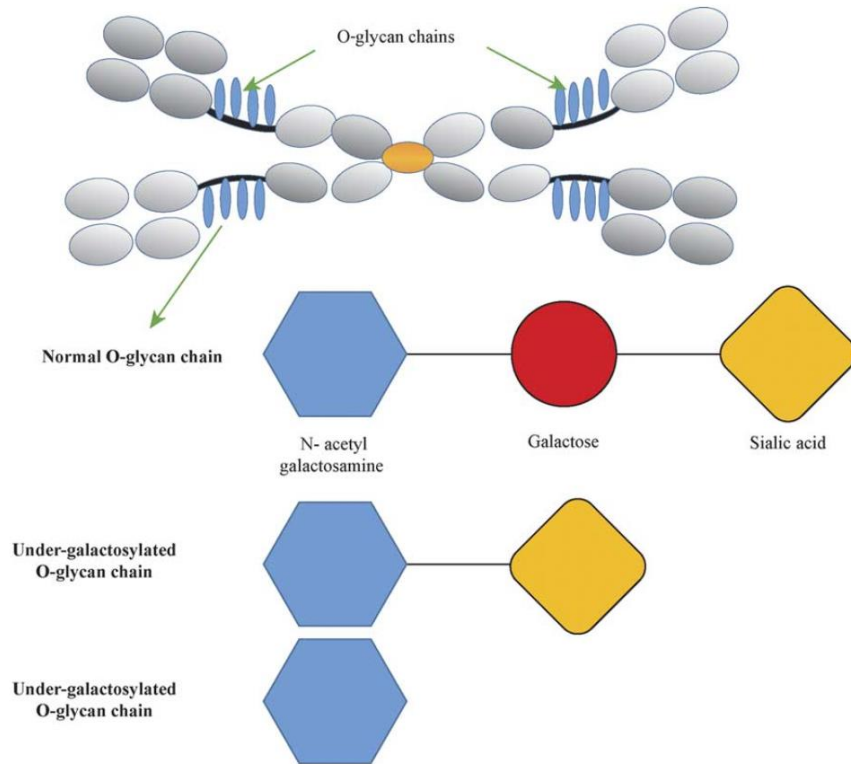
Şekil 1. IgA1, IgA2 ve dimerik IgA1 moleküllerinin yapılarını gösteren diagram (1) no'lu referanstan aynen alınmıştır.

Monomerik formu çoğunlukla dolaşımda bulunurken; mukozal sekresyonlarda neredeyse tümüyle dimerik/polimerik formda bulunur. Dimerik formdaki IgA molekülleri bağlayıcı bir zincir ile birbirlerine bağlanıp sekretuar parça ile de stabilize edilirler. Sekretuar parça proteolitik enzimlere karşı koruma görevi görür. Bu komplekse sekretuar IgA denmekte olup tüm mukozal yüzeylerde yer alan endojen bakteriler bu molekül ile kaplıdır. Bu sayede endojen bakterilerin mukozal yüzeylere sınırlı kalması sağlanır. Mukozal yüzeylerde sekrete edilenden çok daha az oranda (2-3 mg/ml) sistemik dolaşımda da kemik iliğindeki plazma hücreleri tarafından sekrete edilen IgA molekülleri bulunur (1). Dolaşımdaki IgA molekülleri tipi ve yapısına bağlı olarak immün inhibisyondan sorumlu olabilirken, inflamatuvar hastalıkların patogenezinde de yer almaktadır. Serumda yer alan monomerik IgA molekülünün bağlandığı reseptör olan *Fca receptor* tip I (*FcaRI* ya da CD89) tirozine dayalı aktivasyon motifi (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif: ITAM*) içeren bir reseptördür. Monomerik IgA molekülü üzerinde antijen olup olmasına bağlı olarak farklı aviditede *FcaRI*'e bağlanır. Eğer antijen taşımayan bir IgA molekülü ise *FcaRI*'e düşük aviditede bağlanarak ITAM'ın eksik fosforilasyonuna bağlı olarak hücreye inaktive edici sinyaller gönderilir ve otoimmünite engellenir. Eğer IgA1

molekülü immün kompleks formunda ise yüksek avidite ile bağlanarak ITAM'ın tam fosforilasyonuna neden olur ve hücreye aktive edici sinyaller gönderilerek inflamatuvar yanıtı neden olur (13).

Monomerik IgA moleküllerinin IgA1 ve IgA2 olmak üzere iki formu mevcuttur. IgA2 molekülleri çoğunlukla mukozal yüzeylere sınırlı iken IgA1 molekülleri hem serumda hem de mukozal yüzeylerde bulunur. Serum IgA moleküllerinin neredeyse %90'ı IgA1 molekülleridir. Bu IgA molekülleri arasındaki temel fark HR bölgelerini oluşturan aminoasitlerdir. IgA1 molekülünde 8 aminoasitten oluşan dizinin iki defa tekrarını içeren 16 aminoasitlik bir dizi ve bu diziye O bağlı N-asetilgalaktozamin, galaktoz ve sialik asitten oluşan 3 ya da 6 karbonhidrat birimi mevcuttur. IgA2 molekülünde ise HR bölgesi 5 aminoasitten oluşmuş olup O bağlı karbonhidrat birimleri mevcut değildir. Her iki IgA molekülüne N bağlı oligosakkaridler mevcuttur.

IgA nefropatisinin patogenezi temelde yatan değişiklik IgA1 moleküllerinin eksik galaktozilasyonudur (şekil 2).



Şekil 2. Normal galaktozile IgA1 molekülü ile eksik galaktozile IgA1 molekülleri (1) no'lu referanstan aynen alınmıştır.

Galaktozilasyonu eksik olan IgA1 molekülleri polimerize olma eğilimindedir (13). Galaktozilasyonun eksik olmasının kökeninde ilgili enzimleri kodlayan genlerin aktivitesinde azalma gözlenmiştir. IgA nefropatili hastaların kanından IgA sentezleyen B hücre kökenli ölümsüzleştirilmiş hücreler ve sağlıklı kontrollerden elde edilen hücreler karşılaştırıldığında “*core 1 β1,3galactosyltransferase 1*” adlı enzim ekspresyonunda ve “*core 1 β1,3galactosyltransferasespecific chaperone 1: Cosmc*” adlı enzim (yeni oluşmakta olan enzimin stabilizasyonunda görevli) ekspresyonunda azalma yanı sıra “*αNacetylgalactosaminide α2,6sialyltransferase 2*” adlı enzim ekspresyonunda artış dikkati çekmiştir (2). Enzim aktivitelerindeki değişimin epigenetik olduğuna dair şüpheler mevcuttur. Cosmc genine ait promotör bölgesinin metilasyonundaki azalmanın ifadenmesinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (13). Yanı sıra bu enzimleri ekspresyonundaki değişimde bazı sitokinlerin örneğin IL-6'nın da etkisi vardır (2).

Her ne kadar eksik galaktozile IgA1 moleküllerinin IgA nefropatisinde spesifik olduğu düşünülse de aslında ileri derecede sirotik hastalar üzerinde yapılan çalışmalar göstermiş ki mukozal mikrobiyal floranın değişmesi ya da bakteriyel translokasyon sürecine bağlı olarak IgA galaktozilasyonu değişebilmektedir (13).

Farkedilen bir diğer nokta ise mukozal IgA yani polimerik IgA (poli IgA) moleküllerini sentezleyen plazma hücrelerinin hedefi şaşırmasıdır. Normalde mukozaya salınan IgA molekülleri polimerik olup bunlar epitel aracılığıyla dolaşıma geçmeden direkt olarak mukozaya salınırlar. Poli IgA'ları sentezleyen lenfoplazmositer hücreler bölgesel lenf nodlarından mukoza ilişkili lenfoid dokuya geri dönerler. Dolaşıma geçenler ise yine kemokinler ve hem plazmablastların yüzeyinde hem de vasküler endotel üzerinde eksprese edilen spesifik reseptörler aracılığıyla mukoza ilişkili lenfoid dokuya geri dönüş yaparlar. Fakat IgA nefropatili hastalarda bunlardan herhangi birindeki defekt aracılığı ile mukozaya dönüş yapması gereken, poli IgA sentezleyecek olan plazmablastların kemik iliğinde akümüle olduğu anlaşılmıştır. Bu şekilde normalde dolaşımda görmeyi beklediğimiz monomerik IgA molekülleri yerine poli IgA moleküllerinde artış meydana gelmektedir (1, 13).

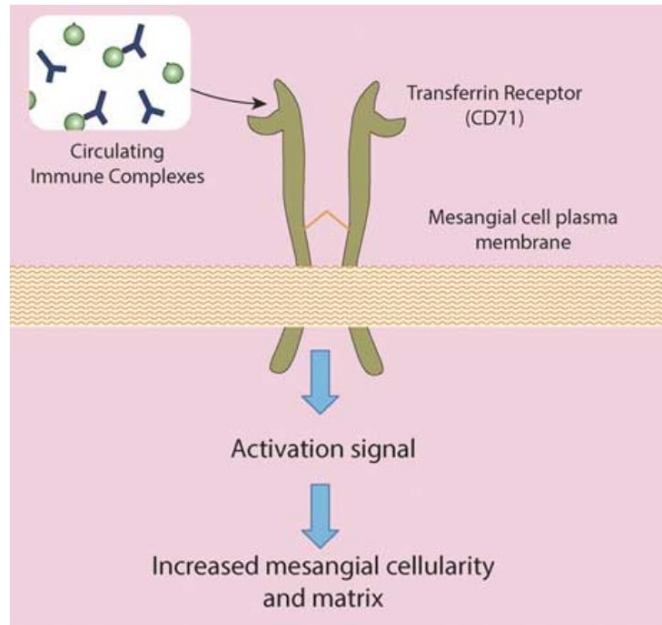
N asetilgalaktozamin bağlı, sialik asit içerebilen ya da içermeyen eksik galaktozile IgA1 molekülleri dolaşımda doğal olarak bulunan IgG ve IgA1 antikorları tarafından bağlanırlar ve nefritojenik immün kompleksler oluşur (1). Bazı bakteri ve virüslerin yüzeyinde tanımlanan galaktozile olmayan N-asetilgalaktozamin moleküllerine karşı gelişen otoantikorlarla eksik galaktozile IgA1 moleküllerinin çapraz reaksiyon verdiği düşünülmektedir (12). IgA nefropatili hastalardan elde edilen hücre dizileri aracılığıyla eksik galaktozile IgA1 moleküllerini bağlayan IgG antikorları üzerine çalışılmış ve ağır zincir üzerindeki tamamlayıcı-tanımlayıcı bölge 3'te bulunması gereken alanin aminoasidi yerine serin aminoasidi olduğu fark edilmiştir. Bu IgG otoantikorlarının serum düzeylerinin hastalık aktivitesi ve prognozu ile ilişkili olduğu bulunmuştur. IgA1 otoantikorları ile ilgili olarak kesin ve anlamlı bir fark henüz elde edilememiştir (2).

Oluşan poligA1 molekülleri ve IgA1/IgG immün komplekslerinin mesangial bölgeye affiniteleri mevcuttur. Mesangial hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörlere bağlanarak mesangial hücre aktivasyonuna ve proliferasyonuna neden olurlar (şekil 3). Bu reseptörlerin tümü tam anlamıyla anlaşılmış olmamakla birlikte bunlardan biri transferrin reseptörü (CD71)'dür (1). Eksik galaktozile IgA1 immün kompleksleri için mesangial hücreler yüzeyinde bulunan ana reseptör adayı CD71'dir. Transgenik fare model çalışmaları göstermiştir ki; eksik galaktozile ve immün kompleks formunda olmayan IgA1 molekülleri CD71'e düşük affinite ile bağlanmaktadır. Yanı sıra CD71 polimerik IgA1 moleküllerini bağlamakta iken, IgA2 moleküllerini bağlamamaktadır. IgA nefropatili hastaların mesangial bölgelerinde CD71 ifadenmesinin arttığı dikkati çekmiştir (13). Tanımlanan diğer reseptörler ASGP-R, pIgR, FcαR1 (CD89) ve Fc-a/m reseptörüdür (1). Çözülebilir CD89, monositlerin yüzeyinde bulunan g-less CD89 molekülünün dolaşıma karışan kısmıdır. Progresif nitelik gösteren IgA nefropatili hastalarda fark edilmiş ki dolaşımda yer alan immün komplekslerde çözülebilir CD89 sabit ve düşük düzeylerde bulunmakta iken; stabil IgA nefropatili hastalarda dolaşımdaki immün komplekslerde çözülebilir CD89 daha yüksek miktardadır. Bu da progresif hastalığa sahip hastalarda CD89'un mesangial bölgeye hapsolması ile açıklanmıştır. IgA1 immün komplekslerinde yer alan CD89'un mesangial hücre

yüzeyindeki CD71'e bağlanarak işlev gördüğü anlaşılmıştır. Sonuç olarak CD89'un IgA nefropatisinin patogenezinde ve progresyonunda yer aldığı sonucuna varılmıştır.

CD71'in IgA1 immün kompleksleri ya da CD89 ile etkileşimi sonucu mesangial hücrelerde transglutaminaz 2 ekspresyonunda artış meydana gelir. Transglutaminaz 2, renal fibrozisin gelişiminde iyi bilinen bir molekül olmakla birlikte CD89 ve IgA1 immün komplekslerinin CD71 ile etkileşiminin devamlılığında ve stabilizasyonunda da yer almaktadır. Transgenik fare modelleri ile yapılan çalışmalarda anlaşılmıştır ki; transglutaminaz 2 yokluğunda mesangial IgA depozitleri oluşmamakta, CD71 ekspresyonu oldukça düşük kalmakta ve farede hematüri ve proteinüri oluşmamaktadır (13).

Gliadin antijenlerinin de CD89'a bağlanarak IgA1-çözülebilir CD89 komplekslerinin katlanmasına ve sonuç olarak reseptörler üzerindeki etkinliğin artmasına neden olduğu dikkati çekmiştir. Glüten fakir diyetin bir tür tedavi yaklaşımı olabileceği sonucuna varılmıştır (13).



Şekil 3: Dolaşan immün kompleksler mezangial hücrelerin yüzeyinde bulunan transferrin reseptörü (CD71) ile etkileşerek mezangial hücre aktivasyonuna neden olurlar. Mezangial hücreler çoğalır ve mezangial matriks üretimini artırır. (1) no'lu referanstan aynen alınmıştır.

Mesangial hücrelerin yüzeyindeki reseptörlerin uyarılmasına bağlı olarak mesangial hücreler tarafından ekstraselüler matriks sentezinde artış, kemokin ve sitokin üretimi meydana gelir. Kemokinlerin ve sitokinlerin etkisi altında podositlerde nekroz, apoptoz ya da defektif otofaji yolu ile azalma yanı sıra podosit komponentlerinde (podoklasin, dendrin vb.) değişim meydana gelir. Podosit hasarlanması ise glomeruloskleroz ve proteinüri ile doğrudan ilişkilidir. Mesangial hücrelerden ağırlıklı olarak “*tumour necrosis factor*” (TNF), “*transforming growth factor β* ” (TGF β) ve anjiotensin II salgınır. Salınan bu humoral faktörler glomerüler filtrasyon ya da post-glomerüler kapillerler aracılığı ile podositlere ulaşır ve podositlerden de TNF sentezinde artışa neden olur. Eş zamanlı olarak podositlerin yüzeyindeki TNF1 ve TNF2 reseptörlerinin ekspresyonunda artış meydana gelir. TNF1 reseptörü aracılığı ile podositlerdeki IL-6 üretiminde ve apoptoziste artış meydana gelir. IL-6 tübül epitelinde anjiotensin II üretiminde artışa neden olur iken anjiotensin II reseptör ifadenmesinde de düzenleyici rol alır. Anjiotensin II ve reseptörünün etkileşmesi sonucunda tübül epitelinde protein kinaz C ve mitojen-aktive protein kinaz yolağında aktivasyon meydana gelir. Bu da tübülinterstisyel alanda inflamatuvar yanıtı neden olur. Mesangial hücrelerden salgınan TNF, TGF β ve IL-6 üretimi tübül epiteli tarafından da sentezlenerek proinflamatuvar ve fibrotik yanıtı güçlendirir. Mesangial hücrelerden salgınan anjiotensin II tübül epiteli üzerinde bulunan anjiotensin reseptör I (AGTR1)’e bağlanarak etkisini gösterir. Eksik galaktozile IgA immün kompleksleri ile karşılaşmanın akut döneminde bu reseptörün ifadenmesinde azalma olsa da kronik dönemde bu ifadenme azalması ortadan kalkar ve aynı zamanda anjiotensin reseptör 2 (AGTR2) ekspresyonunda artış meydana gelir. Bu da tübül epitelinde apoptozisin tetiklenmesi ve tübül atrofisi ile sonuçlanır. Mesangial hücrelerden mineralokortikoidler de salgınır ve anjiotensin II ile sinerjistik etki gösterir. İmmün komplekslerin mesangial hücrelerden humoral faktörlerin salgınması aracılığı ile mesangial-podositik-tübüler iletişime neden olması yanı sıra alternatif kompleman yolağı ve mannoz bağlayıcı lektin yolağında da aktivasyona neden olduğu bilinmektedir (2).

2.1.3. Klinik Özellikler

IgA nefropatisinin prezentasyonu oldukça çeşitlilik göstermekle birlikte çoğu hastada kronik sessiz bir seyir izler. En hafif uçta asemptomatik mikroskopik hematüri yer alırken diğer uçta hızlı ilerleyen glomerulonefritler bulunmaktadır. Nadir olmayarak ilk prezentasyonda, geri dönüşlü akut böbrek yetmezliği ile ilişkili makroskopik hematüri ve eş zamanlı mukozal enfeksiyon olabilir. Hematüriye nefrotik düzeylere ulaşmayan ve dar aralıklarda değişim gösteren proteinüri eşlik edebilir. %30'dan az hastada 1g/gün ve daha fazla proteinüri izlenebilir. Makroskopik hematüri ile eş zamanlı mukozal enfeksiyon dönemlerinde proteinüride geçici artışlar izlenebilir ki bu hastaların büyük kısmının zaman içinde ilerleme gösterdiği kaydedilmiştir. Şiddetli proteinüri ve hipertansiyon ile birlikte 20 yıl ve daha fazla bir sürede son evre böbrek yetmezliği gelişebilir (2).

2.1.4. Laboratuvar Bulguları

IgA nefropatisinin tanısını koymak için tek ya da kombine bir laboratuvar testi bulunmamaktadır. Nihai tanı böbrek biyopsisinin histopatolojik incelemesi ile konulabilir. Yapılan ön testler böbrek biyopsi endikasyonu olup olmadığını belirlemek içindir. Bu ön testler idrar analizi, böbrek fonksiyon testler ve serum IgA düzeyinden oluşmaktadır.

Sabahın ilk idrarının faz-kontrast ya da ışık mikroskopik değerlendirmesinde eritrosit silendirlerinin görülmesi ya da dismorfik eritrositlerin izlenmesi (hematürinin glomerül kaynaklı olduğunun kanıtı) IgA nefropatisinin ilk ipucudur. Proteinüri değerlendirmesi zamanlı toplanan idrar örneklerinde olabileceği gibi spot idrarda protein/kreatinin oranına göre de yapılabilir. Değişen derecelerde proteinüri olabilir.

Böbrek fonksiyonları GFR ya da kreatinin klerensi ile değerlendirilir. Böbrek biyopsisi anındaki böbrek fonksiyonları baz alınarak prognoz hakkında yorum yapılabilir. Buradan yola çıkarak histopatolojik değerlendirmede prognostik öneme sahip bulgular mevcuttur.

Serum IgA düzeylerinin %33-50 hastada arttığı izlenmiştir, fakat bu durum IgA nefropatisi tanısı için yeterli düzeyde sensitif ya da spesifik değildir. IgA nefropatisinin

patogenezinde yer alan galaktozilasyon eksikliği olan IgA1 moleküllerinin tespitinin tanısasal sensitivitesi ve spesifitesi yüksek olmasına rağmen tek başına hastalığı oluşturmak için yeterli olmayışı bu belirtecin de tek başına anlamını kısıtlamaktadır (2).

2.1.5. Patoloji

Böbrek biyopsilerinde IgA nefropatisinin ışık mikroskopik görüntüsü normalden, sadece değişken derecelerde mesangial hiperselülarite ve matriks artışına, florid kresentik glomerülonefritten, ileri düzeyde sklerozan görünüme kadar değişkenlik gösterir. Sklerozan lezyonlar agresif proliferasyona sekonder olabileceği gibi kronik hasarlanmaya sekonder de gelişebilmektedir (2). En sık görülen ışık mikroskopik bulgu mesangial matriks artışı ve mesangial hiperselülaritedir (3- μ m kalınlıktaki kesitte her mesangial alanda 4 veya daha fazla hücre olması) (1). Işık mikroskopideki çeşitliliğe rağmen immünfloresan incelemede, mesangial bölgede λ hafif zincir ağırlıklı, κ hafif zincirlerini de içeren IgA1 molekülleri saptanır (2). IgA molekülleri glomerülleri diffüz olarak tutmalı ve en az 1+ yoğunlukta olmalıdır (12). 1/3 hastada immün depozitler mesangial bölgeye ek olarak kapiller duvarlarda da saptanmıştır. IgA %30 hastada biriken tek immünglobulin olabileceği gibi %25 hastada IgM ve IgG ile birliktelik gösterebilir. %90 hastada IgA'ya göre daha az yoğunlukta ve granüler boyanma gösteren C3 eşlik eder. C1q nadir olarak izlenir; eğer baskın ise IgA nefropatisinden uzaklaştırır. 1/3-1/2 hastada glomerüller C4d eşlik etmektedir. C3 ve C4d'nin IgA'ya eşlik ediyor olması alternatif kompleman yolağı ve mannoz bağlayıcı lektin yolağının hastalık patogenezinde rol aldığını gösteren ipucudur (1, 12). Elektron mikroskopide ağırlıklı olarak mesangial yerleşimli, proliferatif lezyonlarda subendotelyal bölgede de izlenebilen elektron dense depozitler izlenir. Depozitlerin subepitelyal bölge yerleşimi oldukça nadirdir. Hematürinin varlığını açıklayan bazal membranda incelleme, yırtılma ya da yeniden şekillenme izlenebilir (12). Diğer immün kompleks glomerülonefritlerinden ayrımda depozitlerin yerleşim yeri, baskın olarak IgA immün komplekslerinin birikimi, biriken kompleman yolağına ait ürünlerin tipi, ışık mikroskopik ve ekstra-renal bulgular yardımcı olmaktadır (2).

2.1.6. Prognoz

IgA nefropatisi kliniği ve histopatolojisi oldukça çeşitlilik gösteren bir hastalık olması nedeniyle hem klinik hem de histopatolojik olarak tanı anında prognozu öngörmek amacıyla birçok çalışma yapılmış ve bir takım parametreler ortaya konmuştur. Tanı anında renal fonksiyonları korunmuş hastalarda kötü prognostik parametreler klinik olarak erkek cinsiyet, obezite, 60 yaşın üzerinde olmak, makroskobik hematüri hikayesi olmaması iken; laboratuvar bulguları anlamında kalıcı mikroskobik hematüri, kalıcı hipertansiyon, tanı anında kreatinin değerlerinin yüksek olması, günde 1 gr üzerinde kalıcı proteinüri, hipertrigliseridemi, hiperürisemi ve ACE (*Angiotensin-converting enzyme*) delesyon/delesyon genotipi olmasıdır (2).

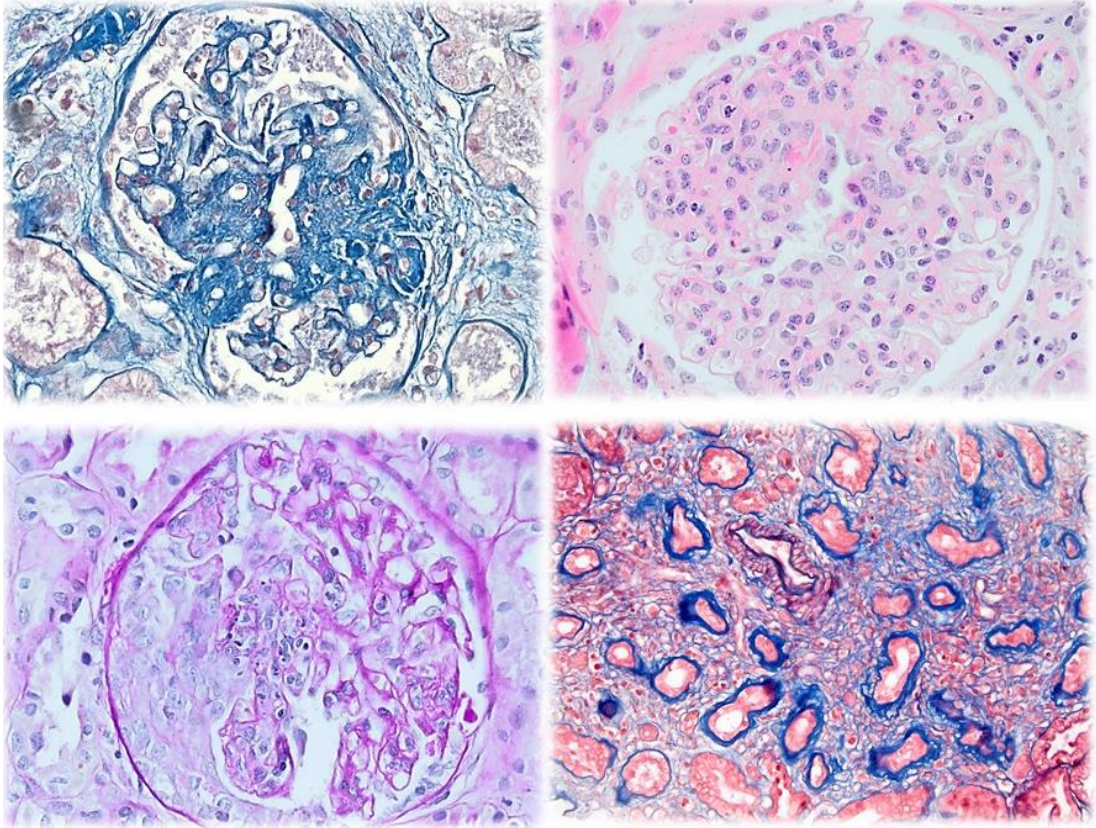
Prognozu histopatolojik olarak belirlemek amacıyla sırasıyla 1982 ve 1997 yıllarında Lee ve Haas klasifikasyonları öncelikle literatüre sunulmuştur. Bu klasifikasyon biçimlerinde derecelendirme 5'li kategorizasyon temelinde kurulmuş olup her derecede olması gereken lezyonlar tanımlanmış ve değerlendiren kişiye oldukça bağlı sonuçlar elde edildiği görülmüştür. 2009 yılında Uluslararası IgA Nefropatisi Çalışma Grubu ve Renal Patoloji Topluluğu, ortak yaptığı bir çalışma sayesinde kanıta dayalı histolojik sınıflandırma yaklaşımına öncülük eden Oxford Klasifikasyonu'nu literatüre sunmuştur (1,6). Çalışma 8 ülkeden elde edilen 206 erişkin, 59 pediatrik hasta üzerinde yapılmış olup, 3 patolog tarafından glomerüller, tübülointerstisyel ve vasküler lezyonlar tarafsız olarak değerlendirilmiş; her hasta en az 3 yıl takip edilmiştir. Bu çalışmaya günlük protein kaybı 0,5 g olan hastalar, eGFR (tahmini glomerüler filtrasyon hızı) düzeyi 30 ml/dk altında olan hastalar, takip süresi 1 yılın altında olanlar ve bu süreçte son dönem böbrek yetmezliğine ulaşan hastalar dahil edilmemiştir. 4 yıllık bir çalışma sonrasında tekrarlanabilir ve klinik olarak anlamlı histolojik tanımlamalar ve skorlamalar elde edilmiştir; mesangial hiperselülarite (M0, <50% glomerül; M1, >50% glomerül), endokapiller proliferasyon (E0, yok; E1 var), segmental glomeruloskleroz (S0, yok; S1, var) ve tübüler atrofi / interstisyel fibrozis (T0, yok ya da < korteksin %25'i ; T1, korteksin %26-50'si; T2, korteksin >%50'si). Bu parametreler MEST skorlamasını oluşturmaktadır. M, S ve T skorları renal fonksiyon kaybının yüzdesini ve renal sağkalımı öngörmeye

birbirlerinden bağımsız olarak anlamlı bulunmuşlardır. Kullanılan klinik parametreler başlangıç proteinüri ve eGFR değeri ile takipteki ortalama arterial basınç ve proteinüri değerleri olmuştur. E skoru ise steroid/immünsupresif tedavi almayan hastalarda bağımsız olarak anlamlı bulunmuştur (14, 15). MEST skorunun prognostik önemi 7000'den fazla Asya, Kuzey Amerika ve Avrupalı hastalar üzerinde yapılan 20'den fazla çalışma ile doğrulanmış ve sonuç olarak T skorunun klinik gidişatı öngörmede en güçlü değer olduğu sonucuna varılmıştır. 13 Avrupa ülkesinden 1147 hasta üzerinde yapılan Oxford Klasifikasyon'unu Doğrulama Çalışması'nda, orjinal çalışmada dışlanan hastaların, çıkarsanan sonuçlar doğrultusunda test edilmesi ile anlaşılmış ki düşük proteinüri hastaların daha az sıklıkta MEST lezyonları olmakta ve 5 yıllık renal sağkalımları %90'a ulaşmaktadır. Düşük eGFR'ye sahip hastaların ise yüksek başlangıç proteinüriye sahip yaşlı hastalar olduğu ve daha sık M, S ve T1/T2 lezyonlarına sahip hastalar olmalarının yanı sıra 5 yıllık renal sağkalımlarının %50'lerde olduğu sonucuna varılmıştır. Oxford çalışmasının eleştirilebilecek bir özelliği hastaların tedavisiz izlenmiş olmaması; elbette ki proliferatif lezyonları olan hastaların immünsupresif tedavi almış olmasıdır. Endokapiller proliferasyonu ve kresentleri olan hastalarda klinik gidişin kötü olmamasının nedeni bu lezyonların immünsupresif tedaviye iyi yanıt veriyor olmalarıdır. Aynı şekilde VALİGA çalışmasında görülmüş ki mesangial hiperselülariteye sahip başlangıçta düşük proteinüri hastalar ve pediatrik yaş grubundaki hastalar üzerindeki çalışmalarda M1'in düşük renal sağkalım ve yükselen proteinüri ile ilişki olduğu bulunmuş; ayrıca M1'in en güçlü GFR inişi ile ilişkili parametre olduğu sonucuna varılmıştır. Endokapiller hipersülarite ve kresent lezyonlarında olduğu gibi mesangial hiperselülaritenin de renal sağkalımı öngörme özelliği steroid tedavisi tarafından baskılanmıştır (15, 16).

Oxford konferansının 2014 yılında düzenlenmesinden sonra üzerinde daha çok çalışılması gereken alanlar üzerine çalışma grupları oluşturulmuştur. Bunlardan bir tanesi olan kresent çalışma grubunun yaptığı çalışmalar sonucu 2016 yılında Oxford klasifikasyonunda yeniliğe gidilerek kresent varlığının da kriterler arasına konması gerektiği sonucuna varılmıştır. Tedavi almayan hastalarda görülmüş ki herhangi bir kresent varlığı kötü renal sağkalım ile ilişkili iken %25'in üzerinde kresent

varlığı tedaviden bağımsız olarak kötü gidiş ile ilişkilidir. Böylelikle C0: fibroselüler/selüler kresent yok; C1: en az bir tane %25'ten az fibroselüler/selüler kresent mevcut; C2: %25 ya da %25'ten fazla fibroselüler/selüler kresent mevcut olarak tanımlanarak Oxford klasifikasyonuna eklenmiş ve MEST-C şeklinde revize edilmiştir (Resim 1). Segmental skleroz çalışma grubu ise tüm segmental sklerozları özelliklerine göre yeniden değerlendirerek görmüş ki; tip lezyonları ve podosit hipertrofisi; primer podositopati özellikleri olan hastalarda başlangıç proteinürisi daha fazla olmakta ve renal sağkalım daha kötü olmaktadır. Biyopsi raporlarında S1 demenin yanısıra sklerozun özellikleri hakkında bilgi vermek steroidle yanıt veren bu özellikler için tedavide yönlendirici olabilmektedir (15, 17).

Sonuç olarak Oxford klasifikasyon çalışmaları IgA nefropatisi tanılı biyopsi raporlarında ifade edilmesi gereken parametreleri ve lezyonların tanımlamalarını ortaya koymuş; yanı sıra tedavi edilmediğinde hastalığa progresif özellik katan lezyonları ve immünsupresif tedaviye yanıt veren lezyonları tanımlamıştır (15).



Şekil 4. MEST-C; A) Segmental skleroz (MTC), B) Mesangial hiperselülarite ve endokapiller proliferasyon (H&E), C) Selülar kresent ve endokapiller proliferasyon (PAS), D) Tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis (MTC).

2.1.7 Tedavi

IgA nefropatisi tanılı hastalarda tedavi, böbrek fonksiyonlarına (GFR), proteinüri ile hipertansiyon varlığına ve proliferatif lezyonların olup olmamasına bağlı değişkenlik gösterir. Minör idrar bulgusu olan, normal kan basıncına ve GFR'a sahip hastalarda 2 yıllık aralıklarla klinik izlem yeterli olmaktadır. Bunun dışında kalan hastalar için tedavi seçenekleri sınırlı olmasının yanı sıra spesifik nitelikte değildir. Böbrek fonksiyonlarını korumak için ana hedef proteinüriyi azaltmaktır. Tedavi seçenekleri Renin-Anjiotensin Sistemi (RAS) blokajı ile kan basıncını düşürmek ve proteinüriyi azaltmak ve gerekli durumlarda immüsupresyondur. Bunu yanın sıra diyetten tuzun kısıtlanması, kan lipit düzeylerinin düşürülmesi, sigara kullanımının kesilmesi ve non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar ile birlikte diğer nefrotoksik ajanlardan kaçınmak gibi genel yaklaşımlar da uygulanmaktadır (2).

2012 KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) klinik uygulama kılavuzu, glomerulonefritlerde kanıta dayalı tedavi önerilerini belirlemeyi ve eksik olan alanların ortaya çıkarılmasını amaçlamıştır. Kılavuzda yer alan tedavi önerileri iki seviyeye ayrılmıştır. Seviye 1 olan tedaviler tavsiye edilmekte iken, seviye 2 olan tedaviler önerilmektedir. Yanı sıra kanıta dayalı olma düzeyleri de kalitesine göre yüksek (A), orta (B), düşük (C) ve çok düşük (D) olmak üzere derecelendirilmiştir. Kılavuza göre günde 1 gr'dan az proteinürisi olan hastalarda kan basıncı hedefi 130/80 mm-Hg'dan düşük iken; günde 1gr'dan fazla proteinürisi olan hastalarda kan basıncı hedefi 125/75 mm-Hg'dan düşüktür. Kan basıncı regülasyonunda tercih edilen ilaçlar RAS blokajı yapan anjiotensin-dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACEI) ve anjiotensin reseptör blokajı (ARB) yapan ilaçlardır. Bunun nedeni yapılan randomize klinik çalışmalarda proteinüriyi azalttıklarının görülmüş olmasıdır. Proteinürisi 1 gr'ın üzerinde olan hastalarda uzun süreli ACEI ve ARB'lerin kullanılması önerilmektedir.

Gerekirse tedavi, kan basıncı kontrol edilerek proteinüriyi günde 1 gr'ın altında tutacak şekilde kuvvetlendirilmelidir (Derece 1B).

Randomize klinik çalışmalar sonucunda 2012 KDIGO, kortikosteroid tedavisinin GFR 50ml/dk/1,73 m² olan ve gerekli destekleyici tedaviyi 3-6 ay boyunca almalarına rağmen günlük proteinüri seviyesi 1gr'ın altına düşmeyen hastalarda 6 ay boyunca verilmesini önermiştir (Derece 2C). Diğer immüsupresif ajanlardan siklofosfamidin ancak %50'den fazla glomerülde kresent görülmesi durumunda kortikosteroid tedavisi ile birlikte verilmesi önerilmiştir (Derece 2D). Mikofenolat mofetil için veriler yetersiz olmakla birlikte azatiopürin tedavisinden ek fayda sağlanamamıştır.

IgA nefropatisi nedeniyle ileri dönem kronik böbrek yetmezliğinde ve kresentik olmayan glomerulonefrit formlarında kombine immüsupresif tedavinin faydası görülmemiştir.

Balık yağı 3-6 aylık optimize destekleyici tedaviye rağmen 1 gr'ın üzerinde proteinüri olan hastalarda potansiyel fayda sağlayabilmektedir. Kullanımı hastaya kalmış olan balık yağları hiçbir zaman steroid tedavisinin yerini alamaz.

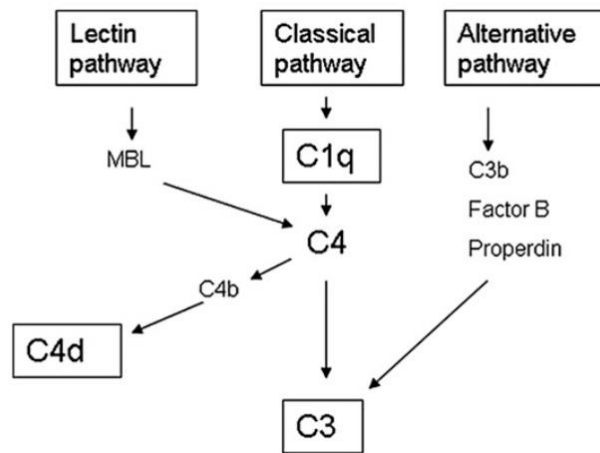
Tonsillektomi önerilmemektedir; ancak tekrarlayan tonsillit ataklarına denk gelen makroskopik hematüri atakları varsa düşünülebilir (12).

2.2. C4d

IgA nefropatisinde alternatif kompleman ve mannoz bağlayıcı lektin yollarının aktivasyonuna bağlı doku hasarının olduğu bilinmektedir. Kompleman sistemi mikrobiyal patojenlere karşı hem doğal hem de adaptif immün sistemde görev alan plazma proteinlerini içermektedir. Bu proteinler plazma içerisinde inaktif formda bulunurken aktive oldukları zaman proteolitik enzimlere dönüşerek diğer kompleman proteinlerini yıkar ve enzimatik bir kaskadın oluşumuna yol açar. Bu kaskaddaki kritik basamak C3'ün yıkımı ile oluşan C3 konvertaz enziminin oluşumudur ki; bu üç yolak ile meydana gelebilir; klasik, alternatif ve mannoz bağlayıcı lektin yolağı. Klasik yolak C1q'nun immün kompleks üzerine fikse olması ile aktive olur iken; alternatif yolak direk mikrobiyal yüzey proteinleri aracılığı ile C3'teki tioester bağlarının hidrolizi ve

faktor B, faktör D ve properdin'nin katılımı sonucu C3'ün aktivasyonu ile başlar. Mannoz bağlayıcı lektin yolağı, mannoz bağlayıcı lektin ve fikolinin, mikroorganizmalar üzerindeki karbonhidrat gruplarına bağlanması ile mannoz bağlayıcı lektin ilişkili serin proteazların (MASP) aktivasyonu ve sonuç olarak C4 ve C2'nin parçalanması ile C3'ün oluşumuyla başlar. Her üç yolak sonucunda da oluşan nihai molekül membran atak kompleksi (MAK) olarak adlandırılan C5b-9'dur (18). MAK çekirdeksiz hücrelerde ölüme yol açarken; çekirdekli hücrelerde hücre aktivasyonu ve doku hasarına neden olur. Bu molekül aracılığı ile kompleman yolağını aktive eden yabancı patojen ya da konakçı üzerinde sitotoksik etki meydana gelir (18, 19).

C4d klasik ve mannoz bağlayıcı lektin yolaklarında C4 yıkımı sonucu ortaya çıkan bir ürün (şekil 4) olup, biyolojik olarak aktif değildir. Tioester bağları aracılığı ile immün komplekslerin biriktiği bölgeye komşu hücre yüzeylerine kovalent bağlarla bağlanır ve kompleman aktivasyonuna işaret eder (18, 20). Renal transplant hastalarında doku hasarı ve donör spesifik antikorlar eşliğinde peritübüler kapillerlerde C4d pozitifliği antikor aracılı akut rejeksiyonda tanısaldır. Burada C4d molekülü klasik kompleman yolağının aktivasyonu sonucu ortaya çıkar. C4d boyaması 2 yol ile uygulanabilir; donmuş dokularda monoklonal antikorlar kullanılarak indirekt immüno Floresan ile tespit edilirken, parafine gömülü dokularda polikovalen C4d antikorları aracılığıyla immünohistokimyasal olarak tespit edilir (9). İmmüno Floresan incelemenin immünohistokimyasal incelemeden daha sensitif olduğu bilinmektedir (11). Ancak Espinosa ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada her iki yöntemin de uygulanması sonucu dokuda C4d varlığı ile ilgili %87 uyum saptanmıştır (21).



Şekil 5. C4d klasik ve lektin yollarının aktivasyonu ile oluşabilir. C1q saptanmayan hastalarda klasik kompleman yolak aktivasyonu dışlanabilir. MBL, Mannose-binding lectin. (21) no'lu referanstan aynen alınmıştır.

IgA nefropatisinde, immünfloresan incelemelerde %75 hastada gözlenen IgA'ya eşlik eden C3 ve properdin, hastalığın patogenezinde majör yolak olan alternatif kompleman yolağının aktivasyonuna işaret ederken; %25-30 hastada izlenen, IgA ve C3 ile birlikte MBL, fikolin, MASP ve C4d birikimi ise hastalığında patogenezinde minör yolak olan mannoz bağlayıcı lektin yolağının aktivasyonuna işaret etmektedir (22, 23). Lektin molekülü poligA1 molekülleri ile etkileşime girmektedir (24). Bu molekül O bağı oligosakkaridler ile etkileşime girmemektedir. Bu bilgiye bağı olarak aslında eksik galaktozile IgA1 moleküllerinin mannoz bağlayıcı lektin yolağını nasıl aktive ettiği ve neden sadece bazı IgA nefropatili hastalarda bu yolağın uyarıldığı bilinmemekle birlikte galaktozilasyonu normal olan IgA1 moleküllerinin bu yolağı uyarmadığı; ancak eksik galaktozile IgA1 moleküllerinin bu yolağı uyardığı bilinmektedir (19, 22). Roos ve arkadaşları tarafından yapılan, mannoz bağlayıcı lektin yolak aktivasyonunun IgA nefropatili hastalarda daha şiddetli renal hasarla ilişkili olduğunu gösteren çalışmada, aberan O bağı glikozilasyonu olan IgA1 moleküllerinin lektin tarafından tanınır hale geliyor olabileceğinden söz edilmektedir(24). Segarra ve arkadaşları tarafından yapılan, erken dönem IgA nefropatili hastalarda mesangial C4d birikimini araştıran bir çalışmada IgA nefropatili hastalara uygulanan tekrarlayan biyopsilerde varolan C4d moleküllerinin zaman

içerisinde yok olmadığı ancak negatif iken pozitif olabildiği izlenmiştir. Bu da aslında mannoz bağlayıcı lektin yolağının uyarılmasının durağan bir süreç yerine dinamik bir süreci temsil ettiğini göstermektedir (22).

IgA nefropatisi, kiniği çok çeşitlilik gösteren bir glomerülonefrit olması nedeniyle glomerüler filtrasyon hızında azalma, günde 1 gr'ın üzerinde devamlılık gösteren proteinüri ve glomerüler skleroz ya da interstisyel fibrozis gibi son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemeyi ileri dönemde öngören bağımsız faktörler dışında bu klinik ve histolojik senaryolar gelişmeden erken dönemde prognozu öngören parametreler geliştirilmeye açık bir glomerüler hastalıktır. Bu parametrelerden biri son dönemlerde açığa çıkarılan glomerüler (çoğunlukla mesangial ya da perikapiller; bazı çalışmalarda peritübüler kapillerler ve tübüllerde de gösterilmiş) C4d birikimidir (11, 18, 22). Mannoza bağlayıcı lektin yolağının IgA nefropatili hastaların prognozuna olumsuz etkisi ilk olarak Roos ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gösterilmiştir ve bu çalışmada mannoz bağlayıcı lektin ve fikolin molekülüne ek olarak C4d'nin de mesangial alanda biriktiği gözlenmiştir (24). İlk olarak İspanyol Glomerüler Hastalıklar Çalışma Grubu tarafından yapılan bir çalışmada C4d'nin son dönem böbrek yetmezliği gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olduğu ortaya çıkartılmıştır (21). Yapılan diğer çalışmalarda da C4d'nin, renal fonksiyonlar bozulmadan erken dönemde mesangial birikiminin gösterilmesinin, renal fonksiyonların kötüye gitmesi anlamında bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir. C4d mesangial birikimi, çalışmalarda değişkenlik göstermekle birlikte, histolojik olarak daha şiddetli hasar (mesangial hiperselülarite, endokapiller proliferasyon, segmental sklerozis ve interstisyel fibrozis/tübüler atrofi), klinik olarak da biyopsi anında düşük GFR, daha yüksek kreatinin ve daha yüksek proteinüri ile ilişkilidir. Takiplerde ise GFR'da daha fazla düşüş, daha uzun süre yüksek proteinüri varlığı, kan kreatinin düzeyinde daha fazla artış ile karakterize daha şiddetli böbrek hasarına ve daha çok tekrarlayıcı biyopsiler ile daha şiddetli immünespresif tedaviye işaret etmektedir (11, 18, 22).

2.3. ADAM10 (ADAM Metallopeptidase Domain 10)

IgA nefropatisi, patogenezi bağlamında cevaplanmayı bekleyen birçok soru içermektedir. Yanı sıra erken dönemde prognozu öngörmek adına tanımlanmış C4d molekülü dışında başka bir biyobelirteç bulunmamaktadır (3, 22). Son dönemde IgA nefropatili hastaların idrarlarının proteomik analizi ile incelenmesi sonucunda hastalığın diğer glomerüler hastalıklardan ayrımında, patogenizini aydınlatmada, prognozunu öngörmeye ve hedefe yönelik tedavide kullanımda aday olabilecek proteinler tanımlanmıştır. Proteomik analizi, herhangi bir biyolojik sistemde (hücre, doku, organ, biyolojik sıvı vs.) yer alan proteinlerin (proteom) belli bir zamanda tanımlanması ve niceliksel ölçümüdür. Bu bağlamda yapılan bir çalışmada IgA nefropatili hastaların idrarlarının proteomik analizi ile incelenmesi ve bu proteinlerin biyolojik yollardaki yerlerinin tanımlanması sonucu dokuda immünohistokimyasal olarak test edilmeye aday proteinler bulunmuştur. Bu proteinlerden biri disintegrin ve metalloproteinaz bölgesi içeren protein 10'dur. Bu proteini kodlayan gen "ADAM10"dir (3). Proteaz fonksiyonu olan bu protein; adezyon molekülleri, büyüme faktörleri, hücre yüzey reseptörleri ve ligandlarının yıkımından sorumludur. Notch sinyal yolağında hücre yüzey reseptörü olan Notch ve Notch ligandlarının (Jagged ve Delta) yıkımında rol oynamaktadır (7). "ADAM10" podositlerde ifadelenmekte olup Notch sinyal yolağı vasıtasıyla glomerüler hastalıkların patogeneziinde yer almaktadır (3). Notch sinyal yolağı böbreğin embriyolojik gelişiminde rol oynayan ve sağlıklı matür böbrekte glomerüler aktivasyonu beklenmeyen hücre-hücre iletişim yolağıdır. Notch (Notch1-4) ve ligandlarının (Jagged 1 ve 2, Delta 1,3 ve 4) bağlanması Notch molekülünün bir seri proteolitik yıkımı ("ADAM10"ın de içinde bulunduğu) ile aktif intraselüler bölge oluşmakta ve bu bölge nükleusa sinyal götürmektedir. Nükleusta transkripsiyonel düzenleyici bölgelere bağlanarak hedef genlerin (*Hes* ve *Hey* genleri) transkripsiyonunu sağlamaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda podositlerde aktive olan Notch sinyal yolağının proteinüri ve glomerüloskleroz gelişiminde etkisi olduğu bulunmuştur (25). Normal kontroller ile kronik glomerüler hastalığa sahip hastalar üzerinde Gutwein ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Western Blot ve

immünfloresan yöntemlerinin kullanılması ile podositlerde “ADAM10” ekspresyonunun bulunduğu ve kronik glomerüler hastalığa sahip hastaların idrarında “ADAM10” düzeyinin arttığı farkedilmiştir. L1 adezyon molekülü “ADAM10”ın substratı olup böbreğin dallanma morfogenezinde rol oynamaktadır. Bu molekül transmembran formda bulunmakta ve “ADAM10”ın enzimatik aktivitesi sonucu 200kDa’luk çözülebilir forma dönüşmektedir. Farklı enzimatik yıkımlar sonrasında L1 adezyon molekülünden farklı formlar meydana gelmektedir. L1 adezyon molekülü ve “ADAM10” böbreğin gelişimsel süreçlerinde rol almakta olup L1 adezyon molekülü olmayan fare modellerinde ciddi renal malformasyonlar ve nörolojik defektler olduğu görülmüştür. “ADAM10” olmayan fare modellerinde embriyonik gelişimin 10. gününde epitelyal dokulardaki majör defekte sekonder farenin öldüğü gözlenmiştir. L1 adezyon molekülü distal tübüller ve toplayıcı kanalların gelişiminde yön gösterici rol oynamaktadır. Bu çalışmadan önceki çalışmalarda L1’in sadece tübül membranında eksprese edildiği gösterilmiş olup bu çalışma ile podositlerde eksprese edildiği ve 200kDa’luk çözülebilir formun akut tübüller nekroza sahip hastalarda bulunduğu ve sonuç olarak distal nefron hasarına işaret ettiği bulunmuştur. IgA nefropatili, Lupus nefritli ve granülomatozisli polianjit tanılı hastaların idrar incelemelerinde sağlıklı kontrollere göre “ADAM10” molekülünün arttığı dikkati çekmiş olup L1 adezyon molekülünde bir değişiklik farkedilmemiştir (7). Ayrıca Waters ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada gelişen podositlerde ektopik Notch aktivasyonunun glomeruloskleroza yol açtığı bulunmuştur (26). “ADAM10”ın enzimatik aktivasyonu CXC kemokin ligandı 16 (CXCL16) üzerinde de mevcuttur. CXCL16 podosit membranında yer alan ve “ADAM10” tarafından enzimatik yıkımına bağlı çözülebilir formda da yer alan bir proteindir. CXCL16 okside-LDL’nin hücre içine alınmasını sağlayan bir “scavenger” (çöpçü) reseptör görevi görmektedir. Hiperlipidemili hastalarda okside-LDL mesangial hücreler, endotel hücreleri ve podositler üzerinde hasar yapıcı etkisi mevcuttur. Okside-LDL’nin hücre içine alınmasına sekonder endotel hasarı, mesangial hücre ve ekstraselüler matriks artışı, podosit hasarı ve podosit hasarı sonucunda da glomeruloskleroz meydana gelmektedir. Wang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada podositlerin membranında bulunan

CXCL16'nın okside-LDL düzeyi ve maruz kalma süresine bağlı olarak okside-LDL'yi hücre içine aldığı gösterilmiştir. Bu duruma interferon-gamma artırıcı etki gösterirken ADAM10'nin CXCL16'nın çözülebilir formunu artırarak azaltıcı etki gösterdiği anlaşılmıştır. CXCL16'nın çözülebilir formu CXCR6 (CXC kemokin reseptör 6) pozitif T hücrelerinin bu bölgeye göçüne neden olmaktadır (8). Schramme ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada CXCL16'nın mesangial hücrelerin yüzeyinde de olduğu gösterilmiştir. Oluşturdukları bir varsayıma göre CXCL16 mesangial hücre apoptozu sırasında hücreden dışarı salınmakta ve mesangial hücre yüzeyinde bulunan CXCR6 reseptörüne bağlanarak mesangial hücre göçü ve proliferasyonu üzerinde etkili olmaktadır. İnflamatuar sitokinlerin etkisi altında CXCL16 ADAM10 tarafından parçalanarak CXCL16'nın çözülebilir formu ortaya çıkmakta ve CXCR6 pozitif T hücreleri bu bölgeye göç etmektedir. Bu bilgiler ışığında inflamasyonun eşlik ettiği mesangial hücre ve matris artışı ile giden glomerüler hastalıklarda ADAM10 ve CXCL16 önemli rol oynamaktadır (6).

2.4. WT1 (Wilm's Tumor 1)

WT1 geni 11. kromozomun kısa kolunda yer almakta olup N terminalinde DNA'ya bağlanmaktan sorumlu 4 tane "zinc finger" motifi içeren bir proteini kodlamaktadır. Kodlanan bu protein ürogenital sistem yanı sıra mezoderm kökenli birçok dokunun (dalak, gonadlar, adrenal bezler, kardiyak damarlanma sistemi, mezotelyal yüzeyler) embriyonik gelişiminde görev almaktadır (27-31). Şu ana kadar 36 tane izoformu tanımlanmıştır. Bu izoformlar sayesinde farklı hücrelerde ve farklı deneysel modellerde birbirine zıt olan görevleri mevcuttur; bulunduğu dokuya göre tümör baskılayıcı ya da protoonkogen niteliğinde fonksiyonları olabilmektedir. DNA'ya bağlanarak ilgili olduğu proteinlerin transkripsiyon regülasyonunu yönetmektedir. Farklı izoformların DNA bağlama kapasitesinde ve bölgesindeki değişkenlikler fonksiyon çeşitliliği oluşmaktadır. Örneğin nefrin, nestin, podokalsin gibi genlerin transkripsiyonunda artışa neden olmakta iken; insülin benzeri büyüme faktör (IGF-I) reseptörü, PDGF-A (*platelet derived growth factor A-chain*) ve TGF- β gibi proteinlere ait genlerin transkripsiyonel düzeyde baskılanmasından sorumludur. WT1'in DNA'ya bağlanarak yönettiği transkripsiyonel düzenleyici görevi, protein kinaz A ve protein kinaz C gibi fosforilleyici enzimler tarafından yönetilmektedir. Bu enzimler tarafından spesifik bölgelerinin fosforilasyonu WT1'in DNA'ya bağlanmasını engellemektedir. Aynı zamanda RNA metabolizmasında da görev almaktadır (29, 32, 33). İfadelenmesi öncelikle böbrek gelişiminin birçok aşamasında düzenleniyor olsa da erişkin yaşam boyunca da böbreklerde podositlere sınırlı olarak nükleer ekspresyonunu korumaktadır. Embriyolojik gelişim basamaklarında da nükleer ekspresyonu dışında hücrede farklı bir kompartmanda ekspresyonuna rastlanmamıştır (34). Bir miktar endojen WT1 proteininin sitoplazmada olabildiği izlenmiş olmasına rağmen bunun geçmişte genellikle boyanma artefaktı olduğu düşünülmüştür. Şimdilerde sıçan modellerinde ve diferansiye embriyonik kök hücrelerde WT1 proteininin %10-25 oranında sitoplazmik olduğu ve aktif olarak sitoplazma ve nükleus arasında gidip geldiğini destekleyen bulgular mevcuttur. Ying Ye ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada WT1'i nükleusa yönlendiren nükleer lokalizasyon sinyali bölgesine denk gelen fosforilasyonun WT1'in nükleusa gitmesini

engellediği ve buna bağlı sitoplazmada kaldığı sonucuna ulaşılmıştır. Yani WT1'in transkripsiyonel düzenleyici fonksiyonu hem fosforilasyonuna sekonder DNA'ya bağlanması engellenerek hem de nukleer kompartmana geçişi engellenerek yönetilmektedir. Sitoplazmik komponentinin tanımlanmasında bağlı olarak WT1'in translasyonda da görev alabileceği düşünülmüştür (29, 33). Sitoplazmik WT1'in fonksiyonunu tanımlamaya yönelik bir çalışma Martina Niksic ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada bahsedildiği üzere WT1'in nukleus ve sitoplazma arasında gidip geldiği anlaşılmıştır. WT1 ribonukleoproteinlerle ilişki içinde olup hem RNA metabolizmasında işlev görmekte hem de işlevsel kompleks polizomlarda yer alıp translasyonda fonksiyon görmektedir. Bu çalışmada WT1'in sitoplazmaya geçişinin ribonukleoprotein kompleksleri içinde mRNA'lara bağlanarak olduğundan sözedilmiştir. Buraya kadar anlaşıldığı üzere WT1, ilgili olduğu proteinlerin regulasyonunu hem transkripsiyonel düzeyde, hem de RNA metabolizmasında ve translasyonel kontrolde yer alarak sağlamaktadır (30). WT1 bunlarla beraber mezenkimal-epitelyal, epitelyal-mezankimal dönüşümden ve hücre döngüsünün regülasyonundan da sorumludur. WT1, nefron gelişiminin başlangıcında mezenkimal-epitelyal dönüşümden sorumlu iken diğer organların gelişiminde epitelyal-mezankimal dönüşümden sorumlu olduğu bilinmektedir. Böbrek gelişiminde hücreleri hücre döngüsünden çıkartmaya zorlayarak diferansiasyona yönlendirirken, diğer organların gelişiminde hücre proliferasyonunun korunmasında yer almaktadır. Hücre döngüsünün ana kontrol yolağında yer alan p53 proteininin WT1 tarafından stabilize edildiğini Maheswaran ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada öne sürmüştür; fakat bununla ilgili mekanizmalar halen daha açıklanmayı beklemektedir (35). Burdan yola çıkarak baktığımızda WT1 ekspresyonu izlenen erişkin tümörlerinin genellikle epitelyal olduğunu, bunların epitelyal-mezankimal dönüşüme uğrayabildiğini ve bunun da kötü prognozla ilişkili olduğunu bilmekteyiz. Bunun tam tersi olarak Wilm's tümörü mezenkimal hücrelerden köken almakta ve normalde WT1'in bu mezenkimal hücreleri epitelyal diferansiasyona yönlendirmesi gerekirken bu hücrelerin mezenkimal neoplastik formda kaldığı izlenmektedir (29). Literatürden anlaşıldığı üzere WT1'in fonksiyonel çeşitliliğinden ve belli noktalarda belli bölgelere

yönlendirilmesinden “*alternative splicing*” ile çok sayıda izoform varlığı, post-transkripsiyonel düzeyde spesifik miRNA’lar ve posttranslasyonel modifikasyonlar (foforilasyon) ve bu değişikliklere bağlı yönlendirilen hücre içindeki lokalizasyonu sorumludur. Bu mekanizmalar ve gen düzeyinde mutasyonların sayesinde WT1 fonksiyonunda değişime / kayba bağlı çeşitli hastalıkların ve tümör oluşumlarının patogenezi de açıklanabilmektedir.

WT1’in böbrek hastalıkları patogenezindeki rolü ile ilgili olarak birkaç çalışma mevcuttur. Gebeshuber ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada fokal segmental glomerulosklerozlu hastalarda WT1’i posttranskripsiyonel olarak azalmasının glomeruloskleroz gelişimine öncülük ettiği ifade edilmiştir (36). WT1’deki mutasyonlara sekonder steroide dirençli Denys-Drash ve Frasier sendromları meydana gelmektedir. Bu sendromlarda ortak olarak glomeruloskleroz erken dönemlerden itibaren oluşmaktadır (28, 29, 33). WT1’in ekspresyonunun azalmasına sekonder mesangial skleroz ve glomerulonefrit geliştiği de bilinmektedir (32). WT1 ekspresyonunun azalması aynı zamanda steroide dirençli nefrotik sendromların oluşumuna öncülük etmektedir; bazı çalışma grupları tarafından bu durum WT1’deki nokta mutasyonları ile ilişkilendirilmiştir (28). Kato ve arkadaşları 2010 yılında sepsiste izlenen proteinürinin patogenezi aydınlatmak amaçlı yaptıkları bir çalışmada, WT1’in nükleer lokalizasyondan sitoplazmik kompartmana geçişinin bu dönemde bakılan nefrin mRNA düzeylerindeki azalma ile korelasyon gösterdiğini bulmuştur. Sepsis esnasında oluşan sitokin rüzgarı aracılığıyla WT1’in sitoplazmaya geçtiği görülmüştür. Sitoplazmaya geçen WT1 görevini yerine getirememekte ve buna bağlı transkripsiyonel düzeyde nefrin gen ürünündeki azalma albuminüri oluşumuna neden olmaktadır. WT1’in sitoplazmaya yönlendirilerek fonksiyonunun yönetilmesi, steroide dirençli nefrotik sendromlu hastalarda dirençli olmayanlara göre WT1’in sitoplazmik kompartmanda daha çok bulunduğunu ifade eden Zapata-Benavides ve arkadaşlarının çalışmasında da vurgulanmıştır (28, 37).

2.5. AMAÇ

Biz bu çalışmada IgA nefropatili hastaların böbrek biyopsilerinde C4d, ADAM10 ve WT1'in ekspresyonunu ve klinik, laboratuvar ve histopatolojik bulgular aracılığı ile bu belirteçlerin prognostik öneme sahip olup olmadıklarını araştırmayı hedefledik. Çok değişken klinik, morfoloji ve gidişat gösterebilen IgA nefropatili hastalarda yeni parametrelerin tanımlanması hem patogenezin daha iyi anlaşılması, hem erken dönemde prognozu öngörmede katkı sağlaması, hem de tedavi yönünde yeni açılımlar sağlaması adına önemlidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışılan Populasyon

Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2001-2018 yılları arasında tanı almış erişkin IgA nefropatili hastalar retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmaya en az 6 ay klinik takibi olan, tanı anında son dönem böbrek yetmezliği olmayan ve böbrek nakli olmayan hastalar ile C4d immünohistokimyasal boyamasında en az 5 glomerül içeren olgular dahil edilmiştir. Böbrek biyopsilerinde IgA nefropati tanısı immünofloresan incelemede mesangial alanda dominant ya da kodominant IgA boyanması ile konulmuştur.

Tüm hastalardan aydınlatılmış onam alınmıştır. Çalışma protokolü Hacettepe Üniversitesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışma Helsinki Bildirisindeki etik standartlara uygun olarak yürütülmüştür.

3.2. Tanı Anındaki ve Takip Sürecindeki Klinik Değişkenler

Biyopsi/tanı anında hastaların yaş, cinsiyet, kan kreatinin(mg/dl), eGFR (ml/dk/1,73 m²) ve 24 saatlik idrar proteinüri (mg/gün) ya da 24 saatlik idrar toplanamayan hastalarda spot idrar proteinüri (mg/g kreatinin) düzeyleri kaydedilmiştir. Takip süresi biyopsi anı ile son klinik kontrol arasında geçen zaman olarak hesaplanmıştır. Böbrek fonksiyon testlerine (BFT) göre (proteinüri, kreatinin ve eGFR takiplerine göre) hastalar klinisyenimiz tarafından stabil, iyileşmiş ve kötüleşmiş olarak gruplandırılmış ve son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyen hastalar belirlenmiştir. Son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyen hastaların takibi son döneme girdikleri zamanda noktalanmıştır. Aldıkları tedaviye göre RAAS (Renin-anjiyotensin-aldosteron sistem) inhibitörleri kullananlar, RAAS ve steroid tedavisi alanlar ve steroid dışı immüno-supresif tedavi alanlar olarak gruplandırılmıştır.

3.3. Klinik Tanımlamalar

Serum kreatinin düzeyleri Jaffe metodu ile saptanmıştır. eGFR, CKD-EPI (The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) formülüne dayanarak

hesaplanmıştır. Proteinüri düzeyleri, 24 saatlik idrar toplanmış hastalarda günlük protein kaybı ile değerlendirilirken, biyopsi anında ya da kontrole geldiklerinde 24 saatlik idrar toplanamayan hastalarda spot idrar mg protein/gr kreatinin düzeyi ile değerlendirilmiştir. Son dönem böbrek yetmezliği tanı anında ya da takip sürecinde eGFR'ın 15 ml/dk/1,73m² ve altına düşmesi olarak tanımlanmıştır. Renal sağkalım süresi tanı anından son dönem böbrek yetmezliğine kadar geçen süre olarak hesaplanmıştır. Şiddetli proteinüri 1 gr/gün üzerindeki proteinüriyi ifade etmektedir. Erken dönem hastalardaki C4d ve ADAM10 durumunun belirlenebilmesi için eGFR'ı >60 olan hastalar üzerinde çalışılmıştır.

3.4. Histopatolojik, İmmü Floresan ve İmmünohistokimyasal çalışmalar

Tüm biyopsiler tanı anında rutin hematoksilin-eozin (H&E), PAS (periodic acid Schiff), PAMS (periodic acid methenamine silver), JMS (Jones methenamine silver), MTC (Masson trikrom) ve kongo kırmızısı ile değerlendirilmiştir.

İmmü floresan çalışmalarda donmuş dokulardan elde edilen kesitlere IgG, IgA, IgM, C3, C1q, kappa hafif zincir ve lambda hafif zincir ile direkt boyama yapılmıştır.

Hastalığın histopatolojik şiddeti Oxford klasifikasyonunda ifade edilen mesangial hiperselülarite, endokapillar proliferasyon, segmental sklerozis, tübüler atrofi/interstisyel fibrozis ve selülar/fibroselülar kresent lezyonları ile değerlendirilmiştir. Oxford klasifikasyonunun 2016 revizyonunda %50'den fazla glomerülde mesangial hiperselülarite (mesangial alanda >3 mesangial hücre) varlığı M1, %50'den az glomerülde mesangial hiperselülarite varlığı ya da hiç olmaması M0; endokapillar proliferasyon varlığı E1, yokluğu E0; segmental skleroz varlığı S1, yokluğu S0; tübüler atrofi/interstisyel fibrozis korteksin %25'i ve altında ise T0, %26-50 arasında ise T1, >%50'den ise T2; selülar/fibroselülar kresent yokluğu C0, en az bir glomerülde, glomerüllerin %25 ya da daha azında kresent varlığı C1 ve >%25 glomerülde kresent varlığı C2 olarak ifade edilmiştir. Mesangial hiperselülarite şiddetine göre hafif, orta ve şiddetli olarak kategorize edilmiştir. Hafif ise bir segmentte 3-6 mesangial hücre, orta-şiddetli ise 6'dan fazla mesangial hücre varlığı

anlaşılmaktadır. Biyopsiler bu klasifikasyona göre değerlendirilmiştir. Segmental skleroz yüzdesi non-obsolesan glomerüllere oranla hesaplanmış olup %25 ve daha az, %25-50 arası ve %50'den fazla olarak gruplandırılmıştır. Ayrıca aktivite bulgusu olan glomerüllerde fibrinoid nekroz varlığı da kaydedilmiştir.

Biyopsilere C4d ve ADAM10/WT1 immünohistokimyasal çalışmaları uygulanmıştır. Hastaların klinik ve laboratuvar verileri hakkında bilgisi olmayan bir uzman ve bir araştırma görevlisi patolog tarafından değerlendirilmiştir. C4d ve ADAM10/WT1 boyaması Leica autostainer cihazı ile formalin fikse parafine gömülü dokuların 2 µm'lik kesitlerine uygulanmıştır. EDTA (*Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*) ile 30 dakika antijen açığa çıkartma işlemi ardından 1/25 dilüe anti-C4d tavşan monoklonal primer antikoru (Klon A24-T; Biocare) uygulanmıştır. C4d boyama sonuçları yerleşimlerine göre glomerüllerde perimesangial, periferal ve segmental skleroz bölgeleri olarak kaydedilmiştir. Boyanma glomerüllerin %50'sinden fazlasında ise diffüz, azında ise fokal; boyanan glomerülün %50 ve fazlasında ise global, azında ise segmental olarak tanımlanmıştır.

ADAM10 boyaması WT1 ile ikili boyama şeklinde yapılmıştır. Sitrat ile 10 dk antijen açığa çıkartma işleminden sonra 1/500 dilüe anti-ADAM10 fare monoklonal antikoru (Klon 11G2; Abcam) uygulanmıştır. WT1 boyaması için EDTA ile 20 dakika antijen açığa çıkartma işleminden sonra 1/50 dilüe edilmiş WT1 fare monoklonal antikoru (Klon WT49; Leica) kullanılarak yapılmıştır. ADAM10 için DAB (3,3'-Diaminobenzidine) kullanılırken WT1 için AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole) kullanılmıştır. WT1 antikorunun podositlerle pozitif nükleer reaksiyon verdiği bilinmektedir. Bu sayede membranöz ifadelenmesi olduğu bilinen ADAM10 antikorunun podositlerde eksprese edilip edilmediğinin anlaşılması amaçlanmıştır. Sonuçlar yerleşimine göre tübüler (kortekste ya da medullada olması kaydedilmiştir) ve glomerüler olarak kaydedilmiş; boyadığı hücre grubunun %50 ve fazlasında ise diffüz, azında ise fokal olarak değerlendirilmiştir. WT1'in podositleri nükleer boyama şiddeti semikantitatif 1+, 2+ ve 3+ olarak değerlendirilmiştir. Yanı sıra nükleer boyanmaya ek olarak sitoplazmik şiddetli boyanması olanlar da kayıt altına alınmıştır.

3.5. İstatistik Analiz

128 hastaya ait ptolojik veriler ve 89 hastaya ait klinik veriler Hacettepe Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda "IBM-SPSS statistics 22" medikal istatistik paket programına aktarılmıştır. Tanımlayıcı istatistiklerden, kategorik değişkenler için sayı ve yüzde değerleri kullanılır iken sayısal değişkenler için ortanca, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri kullanılmıştır. Nitel değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde Yates düzeltmeli Pearsen ki-kare testi, Fisher'ın kesin testi ve Pearson ki-kare testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen bağımsız nicel değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyişi öngörmek için oluşturulan model, çoklu lojistik regresyon analizi ile incelenmiştir. Sağ kalım sürelerinin hesaplanmasında Kaplan Meier analizi kullanılarak sağ kalım eğrileri çizilmiş, log-rank testi ile sağ kalımlar ve çeşitli diğer değişkenler arasındaki ilişkiler tek değişkenli olarak incelenmiştir. Bütün kullanılan istatistiksel testler için, yanılma düzeyi (α) 0,05 olarak seçilmiş ve 0,05'den küçük P değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Tanı Anındaki ve Takip Sürecindeki Bulgular

IgA nefropatisi tanılı 128 hasta analiz edilmiştir. 128 hastanın 83'ü (%64,8) erkek, 45'i (%35,2) kadındır. Tüm hastaların tanı anındaki ortalama yaşı 37 (16-76)'dir. 128 hastadan 104'üne ait eGFR değeri mevcut olup bunların ortalama değeri 58,68 (6,77-139)'dir. 50 hastanın eGFR değeri 60'ın üzerindedir. 128 hastadan 119'una ait tanı anındaki günlük (mg/gün) ya da spot idrar (mg protein/g kreatinin) proteinüri değerleri mevcut olup bunların ortalama değeri 2080,00 (97,11-22121)'dir. Proteinüri değerleri bulunan hastaların 95'i (%79,83) tanı anında şiddetli proteüriye sahiptir.

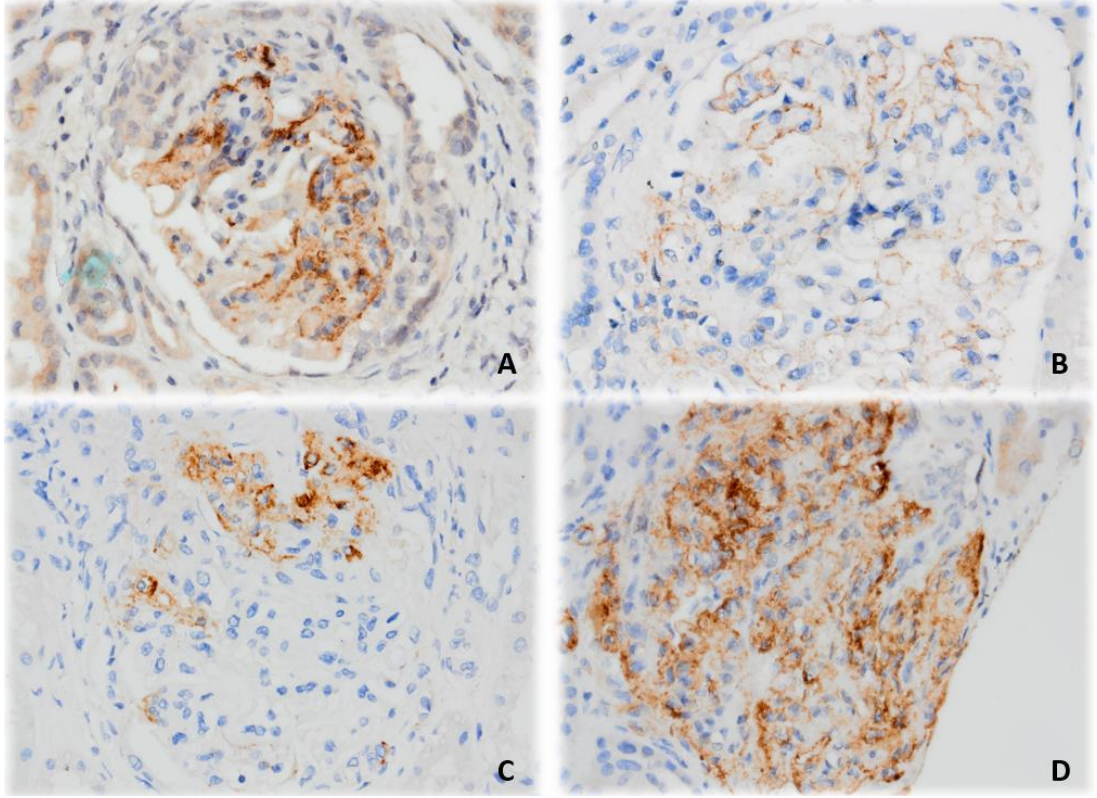
128 hastadan 89'unun klinik takibi mevcuttur. 89 hastanın ortalama takip süresi 44 (6-203) aydır. Bu hastaların 88'i (%98,87) RAAS inhibitörleri kullanmıştır. 89 hastadan 3'üne ait steroid kullanımı ve ek immünespresif tedavi durumu bilinmemektedir. Geri kalan 86 hastadan 62'si (%72,1) RAAS inhibitörlerine ek olarak steroid tedavisi de almıştır. Steroid kullananların 35'i (%40,7) ek immünespresif tedaviye (azatiyopürin, siklofosamid, siklosporin A, kalsinörin inhibitörü, mikofenolat mofetil) ihtiyaç duymuştur. 24 (%26,96) hastada BFT'de kötüleşme izlenmiştir. 91 hastanın 19'unda (%20,9) eGFR'da %50 ve fazlası düşüş gerçekleşmiştir.

128 hastanın tümü tanı anında Oxford klasifikasyonuna göre değerlendirilmiştir. 67 (%52,34) hastada mesangial hiperselülarite ve matriks artışı mevcut olup 41'inde (%61,19) orta-şiddetlidir. 54 hastada (%42,18) endokapiller proliferasyon mevcut iken, 119 (%92,96) hastada segmental skleroz mevcut olması ise en çok rastlanan patolojik bulgu olarak tespit edilmiştir. Segmental skleroz 47 (%39,49) hastada %50'nin üzerindedir. Tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis 80 (%62,50) hastada %25 veya daha az, 36 (%28,12) hastada %26-50 ve 12 (%9,37) hastada %50'nin üzerindedir. 41 (%32,03) hastada en az bir tane %25 ve altında selüler/fibroselüler kresent mevcut iken, 13 (%10,15) hastada %25'in üzerinde selüler/fibroselüler kresent mevcuttur. 20 (%15,62) hastada fibrinoid nekroz izlenmiştir. Böbrek fonksiyon testlerinde kötüleşme ile korelasyon gösteren histopatolojik parametreler segmental skleroz oranı (**Pearson ki-kare testi p=0.007**)

ve tübüler atrofi/interstisel fibrozis (**Pearson ki-kare testi p=0.012**) oranı iken mesangial hiperselülarite (**Yates düzeltilmeli Pearson ki-kare testi p=0.070**), endokapiller proliferasyon (**Yates düzeltilmeli Pearson ki-kare testi p=0.903**) ve selüler/fibroselüler kresent yüzdesi (**Pearson ki-kare testi p=0.882**) ile ilişkili bulunmamıştır.

4.2. C4d pozitif ve Negatif Hastaların Karşılaştırılması

Hastaların tümüne Cd4 immünohistokimyasal çalışması uygulanmış 63 (%49,21) biyopside boyanma izlenmiştir. C4d boyaması 26 (%41,26) biyopside diffüz niteliktedir. 32 (%50,79) biyopside sadece perimesangial/mesangial, 9 (%14,28) biyopside sadece periferal, 11 (%17,46) hastada periferal ve perimesangial bölgede boyanma saptanırken, 11 (%17,46) biyopside segmental sklerozlara çökmüş görünümde (Resim 2). İstatistik çalışmaları sayesinde yalnızca perimesangial/mesangial bölgedeki C4d boyaması pozitif olarak kabul edilmiştir. Buna göre C4d pozitif hasta sayısı 32 (%25) iken negatif hasta sayısı 96 (%75)'tir.



Şekil 6. C4d boyanma lokalizasyonları; A) perimesangial/mesangial, B) periferal, C) segmental skleroza çökmüş, D) perifeal ve mesangial/perimesangial

Oxford klasifikasyonunda yer alan değişkenlerden %25'in üzerinde segmental skleroz ve kresent/fibroselüler kresent varlığı ile C4d pozitifliği arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur. Tek başına segmental skleroz var ya da yok olarak incelendiğinde anlamlı ilişki bulunmaz iken **(Fisher'in kesin testi p=0.449)** segmental skleroz varlığı <%25, %26-50 ve >%50 olarak gruplandırıldığında Cd4 pozitif hastalarda giderek artan oranda (%25, %31.25 ve %40.62) segmental skleroz izlenmiş ve özellikle %25'ten fazla segmental skleroz varlığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur **(Pearson ki-kare testi p=0.028)**. Mesangial hiperselülarite, endokapiller proliferasyon, tübüler atrofi / interstisyel fibrozis ve fibrinoid nekroz ile mesangial/perimesangial C4d varlığı arasında anlamlı ilişki bizim serimizde mevcut değildir. C4d pozitif ve negatif hastaların biyopsi anındaki patolojik özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. Mesangial/Perimesangial C4d Birikimine Göre Hastaların Biyopsi Anındaki Patolojik Özellikleri

Değişkenler	Tüm hastalar içerisindeki n (%)	C4d+ hastalar içerisindeki n (%)	C4d- hastalar içerisindeki n (%)	p değeri
Oxford Klasifikasyonu				
M1	67 (52.34)	18 (56,25)	49 (51.04)	0.759 ¹
E1	54 (42.18)	13 (40.62)	41 (42.7)	1.000 ¹
S1	119 (92.96)	31 (96.8)	88 (75)	0.449 ²
<%25	56 (43.75)	8 (25)	48 (50)	0.028 ^{3*}
%26-%50	30 (23.43)	10 (31.25)	20 (20.83)	
>%50	33 (25.78)	13 (40.62)	20 (20.83)	
TA/IF				0.074 ³
<%25	80 (62,50)	16 (50)	64 (66.6)	
%26-%50	36 (28,12)	14 (43,75)	22 (22.91)	
>%50	12 (9,37)	2 (6,25)	10 (10.41)	
C				0.037 ^{3*}
C1	41 (32,03)	8 (25)	33 (34.75)	
C2	13 (10,15)	7 (21.87)	6 (6.25)	
Fibrinoid nekroz	20 (15.62)	7 (21.87)	13 (13.54)	0.399 ¹

*İstatistiksel olarak anlamlı

C4d + hastalar: İmmünohistokimyasal olarak perimesangial/mesangial C4d pozitif boyanması olan hastalar

Cd4 - hastalar: İmmünohistokimyasal olarak perimesangial/mesangial C4d pozitif boyanması olmayan hastalar

M: Mesangial Hiperseülarite, E: Endokapiller proliferasyon, S: Segmental Skleroz, TA/IF: Tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis, C: Kresent

Tüm değişkenler nitel olup sayı (n) ve yüzde olarak ifade edilmiştir

¹ Yates düzeltmeli Pearson ki-kare testi, ² Fisher'in kesin testi, ³ Pearson ki-kare testi

C4d pozitif hastalar negatif hastalara göre daha yaşlıdır (**Mann Whitney U testi p=0.032**). C4d pozitif hastaların tanı anındaki proteinüri değerleri C4d negatif hastalara göre daha yüksektir ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır (**Mann Whitney U testi p=0.017**). Hastaların tanı anındaki kreatinin, eGFR değeri ve aldığı tedavi biçimi ile C4d arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Takip sürecinde C4d pozitif hastalarda C4d negatif hastalara göre böbrek fonksiyon testlerinde kötüleşme (**Yates**

düzeltilmeli Pearson ki-kare testi p=0.072) ve eGFR değerlerinde %50 ve fazlası düşme (**Fisher'in kesin testi p=0.237**) daha çok izlenmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Bunların aksine C4d pozitif hastalarda negatif olanlara göre daha fazla son dönem böbrek yetmezliğine ilerleme kaydedilmiş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (**Fisher'in kesin testi p=0.030**). C4d pozitif ve negatif hastaların klinik olarak biyopsi anı ve takip sürecindeki özellikleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Mesangial/Perimesangial C4d Birikimine Göre Hastaların Biyopsi Anı ve Takip Sürecindeki Klinik Özellikleri

Değişkenler	Tüm hastalar	C4d+ hastalar	C4d- hastalar	p değeri
Yaş	37 (16-76)	32 (16-56)	38 (18-76)	0.032 ^{2*}
Erkek/Kadın	1.8:1	1.4:1	2:1	0.593 ¹
Proteinüri (tanı anı g/gün veya mg/g kreatinin)	2080 (97,11-22121)	3041 (457.01-6802.58)	1841 (97.11-2121)	0.017 ^{2*}
eGFR (tanı anı ml/dk/1.73 m ²)	58.68 (6.77-139)	56(8.15-131)	61 (6.77-139)	0.394 ²
Takip süresi (ay)	44(6-203)	44(4-137)	41.5 (6-203)	0.955 ²

*İstatistiksel olarak anlamlı

Tüm değişkenler nicel olup median değer ile üst ve alt değerler verilmiştir

C4d + hastalar: İmmünohistokimyasal olarak perimesangial/mesangial C4d pozitif boyanması olan hastalar

Cd4 - hastalar: İmmünohistokimyasal olarak perimesangial/mesangial C4d pozitif boyanması olmayan hastalar

eGFR: Tahmini glomerüler filtrasyon hızı

¹ Yates düzeltilmeli Pearson ki-kare testi, ² Mann-Whitney U testi

Tablo 2 (Devam). Mesangial/Perimesangial C4d Birikimine Göre Hastaların Biyopsi Anı ve Takip Sürecindeki Klinik Özellikleri

Değişkenler	Tüm hastalar n (%)	C4d+ hastalar içerisindeki n (%)	C4d- hastalar içerisindeki n (%)	p değeri
Şiddetli proteinüri ^a	95 (79.83)	27 (90)	68 (76.4)	0.180 ¹
RAAS tedavisi	88 (98,87)	23 (100)	65 (98.48)	1.000 ²
Steroid tedavisi	62 (72,1)	16 (72.72)	46 (71.8)	1.000 ¹
Ek immünsupresif tedavi ^b	35 (40,7)	9 (40.9)	26 (40.6)	1.000 ¹
BFT'de bozulma	24 (26.96)	10 (43.47)	14 (21.21)	0.072 ¹
Son dönem böbrek yetmezliği ^c	11 (12.35)	6 (26.08)	5 (7.57)	0.030 ^{2*}
eGFR'da %50 ve fazlası düşüş	19 (20.9)	7 (30.43)	12 (17.64)	0.237 ³

*İstatistiksel olarak anlamlı

C4d + hastalar: İmmünhistokimyasal olarak perimesangial/mesangial C4d pozitif boyanması olan hastalar

Cd4 - hastalar: İmmünhistokimyasal olarak perimesangial/mesangial C4d pozitif boyanması olmayan hastalar

RAAS: Renin-Anjiyotensin-Aldosteron sistemi, BFT: Böbrek Fonksiyon Testi

^a Şiddetli Proteinüri: Tanı anında 1gr/gün'den fazla proteinürisi olan hastalar

^b Ek immünsupresif tedaviler: azatiyopürin, siklofosfamid, siklosporin A, kalsinörin inhibitörü, mikofenolat mofetil

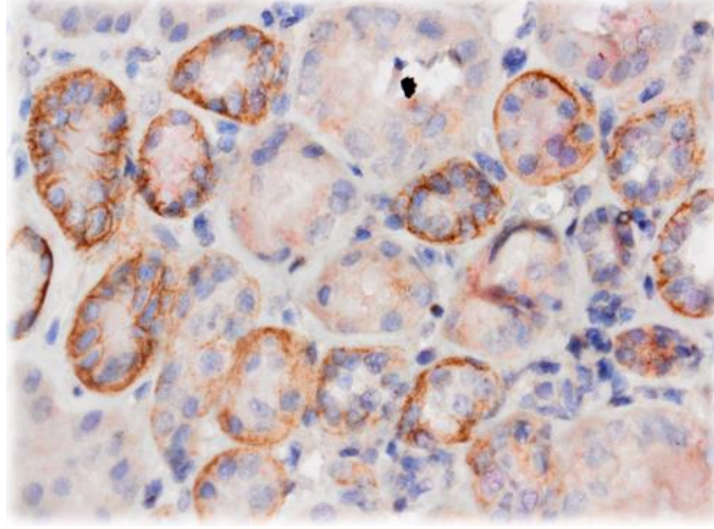
^c Son dönem böbrek yetmezliği: eGFR değerinin 15ml/dk/1.73m² ve altına düşmesi ya da kronik dializ ihtiyacı olması

¹ Yates düzeltilmeli Pearson ki-kare testi, ² Fisher'in kesin testi, ³ Pearson ki-kare testi

4.3. ADAM10 pozitif ve negatif hastaların karşılaştırılması

ADAM10 / WT1 boyaması 128 hastaya da yapılmış olup 125 hastadan sağlıklı sonuç alınmıştır. ADAM10 çalışmasında glomerüllerde boyanma saptanmamış olup yalnızca distal tübül epitel hücrelerinde boyanma izlenmiştir (Resim 3). Boyanan tübüller kortikal ve medüller olarak ayrılmıştır ancak; tüm iğne biyopsi örneklerinde korteks mevcut olup medulla örnekleri bulunmadığı için standardizasyonu sağlamak adına kortekste pozitif sonuç alınanlar ve alınmayanlar olarak gruplandırılmıştır. Kortikal bölgede pozitif sonuç alınan biyopsi sayısı 15 (%11,90)'tir. Bunların 7'sinde (%46,66) diffüz boyanma saptanırken 8'inde (%53,33) fokal boyanma mevcuttur. ADAM10 pozitif boyanan ve negatif boyanan biyopsiler arasında patolojik ve

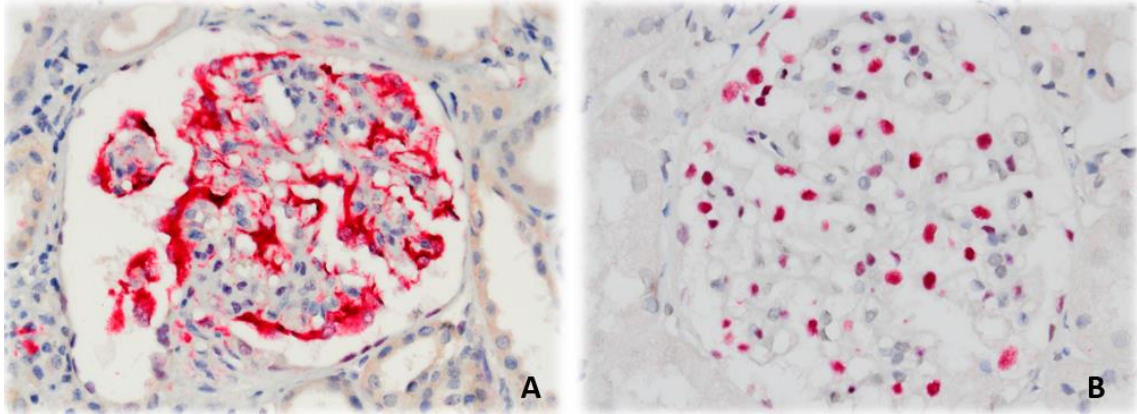
laboratuvar kriterler açısından ya da hastaların klinik gidişi ile ilgili anlamlı fark bulunamamıştır.



Şekil 7. ADAM10 ile distal tübül epitel hücrelerinde membranöz boyanma

4.4. WT1 Analiz Sonuçlarının Klinik Korelasyonu

Podositlerde WT1 boyaması 125 hastanın 24'ünde (%19,02) 3+, 33'ünde (%26,14) 2+, 54'ünde (%42,2) 1+'tir. Ayrıca nükleer boyanmaya ek olarak şiddetli (3+) sitoplazmik boyanma izlenen 14 (%11,2) biyopsi örneği kaydedilmiştir (Resim 4). Bu 14 vakada WT1 ile yoğun sitoplazmik boyanma nedeniyle nükleer boyanmanın şiddetini yorumlamak mümkün olmamıştır. Bu hastaların 9'unun takibi mevcuttur. WT1 ile sitoplazmik boyanma olmayan hastalara göre bu hastalarda son dönem böbrek yetmezliğine gidiş, böbrek fonksiyon testlerinde kötüleşme ve GFR'da %50 ve fazlası düşüş daha çok izlenmiştir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte daha fazla gözlem sayısı ile korele çıkabileceği düşünülen sonuçlar elde edilmiştir. Buna ait sonuçlar Tablo 3'te özetlenmiştir. WT1'in sitoplazmik boyanması ile hiçbir patolojik ya da laboratuvar parametre arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmamıştır.



Şekil 8. WT1 boyanma lokalizasyonları; A) Sitoplazmik, B) Nükleer

Tablo 3. WT1 Boyamasına Göre Hastaların Takip Sürecindeki Klinik Özellikleri

Değişkenler	Tüm hastalar n (%)	WT1 ile sitoplazmik boyanan biyopsiler içerisindeki n (%)	WT1 ile sitoplazmik boyanmayan biyopsiler içerisindeki n (%)	p değeri
BFT'de kötüleşme	24 (26.96)	5 (55.55)	18 (23.07)	0.051 ¹
eGFR'da %50 ve fazlası düşüş ^a	19 (20.9)	4 (44.44)	14 (17.5)	0.078 ¹
Son dönem böbrek yetmezliği ^b	11 (12.35)	3 (33.3)	7 (8.97)	0.064 ¹

eGFR: Tahmini glomerüler filtrasyon hızı, BFT: Böbrek Fonksiyon Testi

Tüm değişkenler nitel olup değerler sayı (n) ve % olarak verilmiştir

^a ml/dk/1.73 m²

^b Son dönem böbrek yetmezliği: eGFR değerinin 15ml/dk/1.73m² ve altına düşmesi ya da kronik dializ ihtiyacı olması

¹ Fisher'in kesin testi

C4d pozitif boyanan hastalarda negatiflere göre WT1 ile daha fazla sitoplazmik boyanma izlenmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (**Fisher'in kesin testi p=0.040**). İki boyamaya ait sonuçlar Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4. C4d ve WT1 Boyamasının Karşılaştırması

	WT1 ile sitoplazmik boyanan biyopsiler n (%)	WT1 sitoplazmik boyanmayan biyopsiler n (%)
C4d+ biyopsiler	7 (23.3)	23 (76.7)
C4d - biyopsiler	7 (7.4)	88 (92.6)

C4d + hastalar: İmmünohistokimyasal olarak perimesangial/mesangial C4d pozitif boyanması olan hastalar

C4d - hastalar: İmmünohistokimyasal olarak perimesangial/mesangial C4d pozitif boyanması olmayan hastalar

Tüm değişkenler nitel olup sayı (n) ve yüzde olarak ifade edilmiştir

4.5. Renal Sağkalım Analizi

11 (%12,35) hasta son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemiştir. Bu 11 hastadan 4'üne böbrek nakli yapılmıştır. Bu hastalardaki ortalama renal sağkalım süresi $94,45 \pm 43,33$ aydır. 5, 10 ve 15 yıllık renal sağkalım oranları sırasıyla %86.5, %80.8 ve %78.6'dır. Son dönem böbrek yetmezliğine gidişi etkileyen değişkenler araştırılmıştır. Buna göre tanı anındaki kreatinin ve eGFR değerleri ile son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş arasında istatistiksel anlamlı ilişki saptanmıştır. Son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyenlerde biyopsi anında proteinüri median değeri ilerlemeyenlere göre yüksek olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Yanı sıra ek immüno-supresif tedavi alanlarda istatistiksel anlamlı olarak daha çok son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş kaydedilmiştir. Patolojik özelliklerden mesangial hiperselülarite, segmental sklerozun %50'nin üzerinde olması ve C4d pozitifliği ile son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon mevcuttur. Son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyen hastalarda ilerlemeyenlere göre daha fazla sayıda WT1 ile sitoplazmik boyanma kaydedilmiştir; fakat gözlem sayısının yetersizliği nedeniyle istatistiksel anlamlı sonuç elde edilememiştir. Bu bulgular Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5. Son Dönem Böbrek Yetmezliğine Gidişi Etkileyen Faktörler

Değişkenler	Son dönem böbrek yetmezliğine ^a ilerleyenler	Son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemeyenler	p değeri
Proteinüri	2200 (300-5266.56)	1868.94 (97.11-16802.58)	0.857 ²
eGFR	38 (24-83)	72 (15.51-139)	0.003 ^{2*}
Mesangial hiperselülarite	10 (%90.9)	41 (%52.56)	0.021 ^{1*}
Segmental skleroz (>%50)	6 (%54.54)	13 (%16.66)	0.010 ^{1*}
Ek immünsupresif tedavi ^b	8 (%88.9)	27 (%35.06)	0.003 ^{1*}
C4d pozitifliği ^c	6 (%54.54)	17 (%21.79)	0.030 ^{1*}
WT1 ile sitoplazmik boyanma izlenen biyopsiler	3 (%30)	6 (%7.79)	0.064 ¹

*İstatistiksel olarak anlamlı

Nicel değişkenler için median değer ile üst ve alt değerler verilmiştir

Nitel değişkenler için değerler sayı (n) ve % olarak verilmiştir

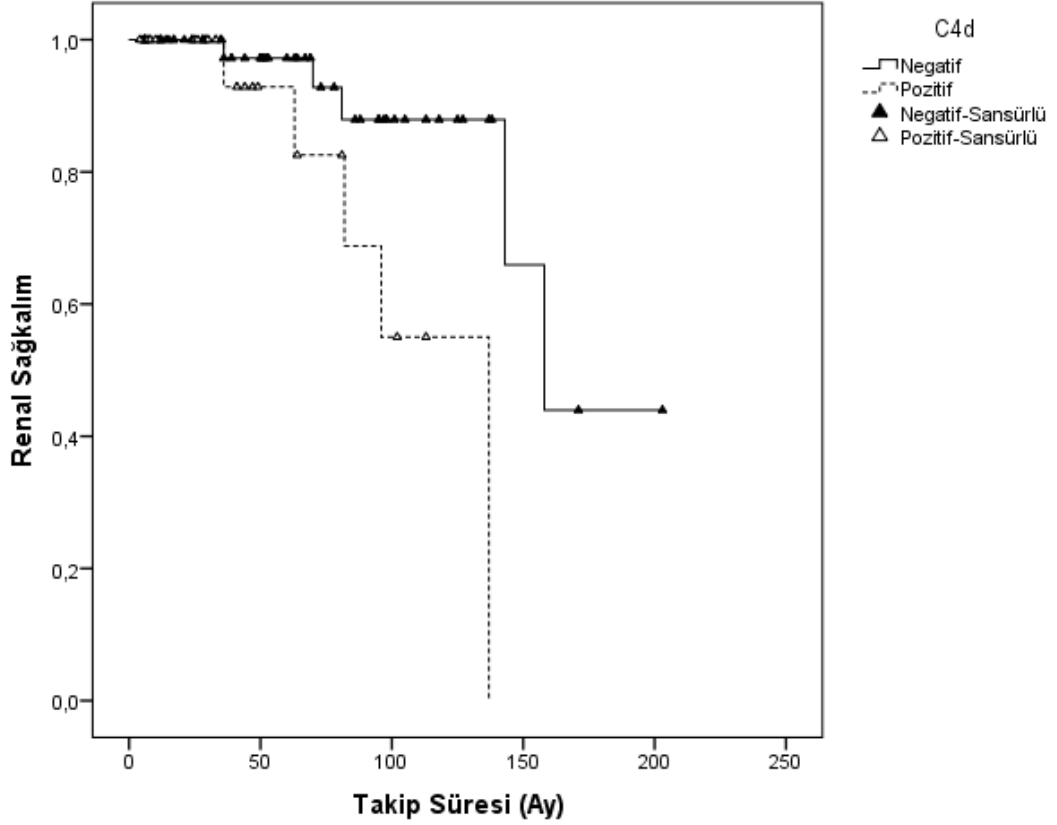
^a Son dönem böbrek yetmezliği: eGFR değerinin 15ml/dk/1.73m² ve altına düşmesi ya da kronik dializ ihtiyacı olması

^b Ek immünsupresif tedaviler: azatiyopürin, siklofosfamid, siklosporin A, kalsinörin inhibitörü, mikofenolat mofetil

^c C4d + hastalar: İmmünohistokimyasal olarak perimesangial/mesangial C4d pozitif boyanması olan hastalar

¹ Fisher'in kesin testi, ² Mann-Whitney U testi

Son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemiş 11 hastadan C4d pozitif olanlarda ortalama renal sağkalım süresi 91.83±40.35 iken C4d negatif olanlarda 97.6±51.33'tür. C4d pozitif hastalarda 5., 10. ve 15. yıllardaki renal sağkalım oranı sırasıyla %78.2, %73.9 ve %69.5 iken C4d negatif hastalarda bu oranlar sırasıyla %90.9, %84.8, %83.3'tür. Bu durum şekil 5'te izlenen Kaplan-Meier sağkalım eğrisi ile gösterilmiştir.



Şekil 9. C4d durumuna göre Kaplan-Meier renal sağkalım eğrisi; C4d pozitif hastalarda C4d negatif olanlara göre renal sağkalım süresinin daha kısa olduğunu göstermektedir (Log Rank $p=0.005$). “Sansür” son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemeyen hastaları ifade etmektedir.

Son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş ile ilişkili olan patolojik değişkenler çoklu lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiş olup bu değişkenlerle oluşturulan model son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyişi %93.1 başarı oranı ile öngörmektedir. Çoklu lojistik regresyon analizinde son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyişi öngörmede istatistiksel olarak anlamlı patolojik değişkenler mesangial hiperselülarite, segmental sklerozun %50 üzerinde olması ve sitoplazmik WT1 pozitifliği iken C4d model içinde anlamlı bulunmamıştır. Analiz sonuçları tablo 6’da özetlenmiştir.

Tablo 6. Çoklu Lojistik Regresyon Analizi

		B	S.E.	Wald	df	Sig.	Exp(B)
Step 1 ^a	M	2,574	1,165	4,887	1	,027*	13,124
	C4d	,793	,893	,788	1	,375	2,209
	Segmental skleroz	2,654	,973	7,432	1	,006*	14,209
	WT1	2,753	1,135	5,882	1	,015*	15,691
	Constant	-5,662	1,362	17,293	1	,000	,003

*İstatistiksel olarak anlamlı

M: Mesangial hiperselülarite: %50'den fazla glomerülde mesangial alanda 3'ten fazla mesangial hücre olması

C4d: Mesangial/perimesangial C4d pozitifliği

Segmental skleroz: %50 üzerinde segmental skleroz olması

WT1: Sitoplazmik WT1 boyaması

4.6. Erken Dönem Hastalarda C4d ekspresyonu

Tanı anındaki eGFR değeri 60 ml/dk/1.73m²'den fazla olan hastalarda C4d immünohistokimyasal boyamasının son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyişi ve klinik kötü gidişi öngörmedeki yeri incelenmiş; fakat tarif edilen kriteri karşılayan toplam 50 hasta bulunmuş olup gözlem sayısının yetersizliği nedeniyle ileri inceleme yapılamamıştır.

5. TARTIŞMA

IgA nefropatili hastalarda klinik gidiş ve uzun dönem renal sağkalım, hastalar arasında oldukça değişkenlik göstermektedir. Prognozu belirleyen parametrelerden biri aktive olan kompleman yolak çeşididir. İlk olarak Roos ve arkadaşları tarafından alternatif kompleman yolağına ek olarak mannoz bağlayıcı lektin yolak aktivasyonunun daha şiddetli renal hasar ile ilişkili olduğu bulunmuştur (24).

Biz bu çalışmada klasik ve mannoz bağlayıcı lektin kompleman yolak aktivasyonuna işaret eden C4d immünohistokimyasal belirtecinin (18, 20, 22, 23) bizim IgA nefropatili hasta serimizdeki durumunu araştırmayı ve renal sağkalım ile potansiyel ilişkisi olabilecek diğer belirteçlerden ADAM10 ve WT1 molekülünün immünohistokimyasal olarak incelenmesini amaçladık. İmmünofloresan çalışmalarda C1q pozitifliği olmadığından C4d pozitifliği mannoz bağlayıcı lektin yolağının yansıması olarak kabul edilmiştir.

IgA nefropatili hastaların büyük bir kısmında alternatif kompleman yolağı aktive olur iken %25-30'unda mannoz bağlayıcı lektin yolağı aktive olur ve bu yolağın aktivasyonuna işaret eden moleküller mannoz bağlayıcı lektin, fikolin, MASP ve C1q yokluğundaki C4d'dir (22, 23). Bizim serimizde de bu yolağın aktivasyonunu gösteren C4d pozitifliği literatür ile uyumlu olarak %25 oranında izlenmiştir. İncelediğimiz seride C4d pozitif hastaların olmayanlara göre istatistiksel anlamlı olarak daha yaşlı, tanı anında daha yüksek proteinüri değerine sahip, daha fazla oranda selüler/fibroselüler kresente ve %25'in üzerinde segmental skleroza sahip olduklarını gördük. Nihai olarak ise C4d pozitif hastaların olmayanlara oranla daha fazla son dönem böbrek yetmeliğine ilerlediğini ve C4d pozitif hastaların renal sağkalım süresinin olmayanlara kıyasla daha kısa olduğunu gördük.

Bizim serimizde de Oxford klasifikasyonunda olduğu gibi böbrek fonksiyon testlerindeki kötüleşme ile birbirinden bağımsız olarak korele olan parametreler segmental sklerozun %25'in üzerinde olması ve tübüler atrofi/interstisyel fibrozis oranı iken son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyişi öngörmede korele olan parametreler ise mesangial hiperselülarite ve segmental sklerozun %50'nin üzerinde

olmasıdır (14, 17). M1 lezyonları böbrek fonksiyon testlerinde kötüleşme olan hastalarda daha fazla olmasına rağmen isitatsitikselsel olarak anlamlı bulunamamıştır; anlamlılık sınırında kalmıştır.

Literatürdeki çalışmalarda C4d immünhistokimyasal pozitifliği için farklı tanımlamalar bulunmaktadır. Bu durum çalışmalar arası kıyas yapılmasını güçleştirmektedir, sonuçlarda değişkenliğe neden olmaktadır. Çoğu çalışmada glomerüllerde mesangial alana sınırlı boyanma pozitif kabul edilirken (9-11, 22, 38-40); Baek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada mesangial alana ek olarak periferel ve hem periferel hem de mesangial boyanmalar pozitif kabul edilmiştir (23). Maeng ve arkadaşları ile Faria ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda glomerüllere ek olarak tübüler boyanmalar da dahil edilmiştir (20, 41). Nasri ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise glomerüllerdeki eser boyanma bile lokalizasyon bağımsız olarak pozitif kabul edilmiştir (21). Glomerülerde mesangial alanlara sınırlı boyamayı pozitif kabul eden çalışmaların bir kısmında C4d tarafından boyanan glomerüllerin tüm glomerüllere oranına göre pozitiflik tanımlanmıştır (9, 10, 20, 38-41). Biz çalışmamızda, son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş ile anlamlı korelasyon göstermesi nedeniyle, 2017 yılında WągroWska-DanileWicz ve arkadaşları ile 2018 yılında Segarra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi (11, 22) fokal ve segmental pozitiflik de dahil olmak üzere non-obsolesan glomerüllerdeki mesangial/perimesangial alana sınırlı boyanmayı pozitif olarak kabul ettik. Diğer paternde (periferel kapiller boyanma, hem periferel hem de mesangial/perimesangial ya da segmental sklerozlara çöken) boyanmaların son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş ile anlamlı korelasyon göstermediğini gördük. C4d immünhistokimyasal boyaması değerlendirilirken yalnızca boyanıp boyanmamanın değerlendirilmesinden ziyade boyanan glomerüler kompartmanın dikkatlice incelenmesi gerektiği sonucuna vardık. Fakat bu konuda literatürdeki çalışmalarda farklılık olması rutin kullanım amaçlı C4d pozitiflik kriterlerini tanımlayacak ve standardize edecek daha ileri araştırmaları gerekli kılmaktadır.

C4d immünhistokimyasal boyanma sonuçları Oxford klasifikasyonunda yer alan parametrelerle karşılaştırıldığında yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar elde

edilmiştir. Segarra ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma ile Fabiano ve arkadaşları tarafından pediatrik bir populasyon üzerinde yapılan çalışmada bu parametreler ile C4d pozitifliği arasında ilişki bulunmamıştır (9, 22). Kronisite bulgularından olan glomerüloskleroz varlığı ile C4d pozitifliği arasında korelasyon Nasri ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada global glomerüloskleroz ile gösterilmiş iken Espinosa ve arkadaşları ile Şahin ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada segmental skleroz varlığı ile gösterilmiştir (10, 21, 38, 39). Bizim çalışmamızda yalnızca segmental skleroz var/yok şeklinde bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmez iken segmental skleroz, non-obsolesan glomerüllere oranına göre değerlendirildiğinde C4d pozitif hastalarda negatiflere göre daha fazla sayıda %25'in üzerinde segmental skleroz saptanmıştır ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır. Bu durum %25 altındaki segmental sklerozun non-spesifik olarak birçok nedene bağlı gelişmiş olabilme olasılığını, daha ileri düzeyde hasarın ise hastalık ile ilişkili olma olasılığının bir yansıması olarak yorumlanabilir. Bir diğer kronisite bulgusu olan tübüler atrofi/interstisyel fibrozis ile C4d pozitifliği arasında korelasyon Oxford parametreleri ile C4d sonuçları arasında karşılaştırma yapan dokuz çalışmadan altısında saptanırken üçünde anlamlı ilişki bulunmamıştır (9-11, 21-23, 38-40). Bizim çalışmamızda da tübüler atrofi/interstisyel fibrozis açısından C4d pozitif ve negatif hastalar arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Yalnızca Baeka ve arkadaşları tarafından pediatrik populasyon üzerinde yapılan çalışmada mesangial hiperselülarite varlığı C4d pozitifliği ile anlamlı korelasyon göstermiştir (23). Aktivite bulgularından endokapiller proliferasyon, Heybeli ve arkadaşları ile Wągrowska-Danilewicz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda C4d pozitifliği ile anlamlı korelasyon göstermiştir (11, 40). Kresent varlığı literatürde izlenen çalışmalardan Segarra ve arkadaşları tarafından erken dönem IgA nefropatili hastalar üzerinde yapılan çalışma ile Heybeli ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada kayıt altına alınmıştır. C4d pozitifliği ve selüler/fibroselüler kresent varlığı arasında iki çalışmada da anlamlı ilişki bulunmamıştır (22, 40). Bizim çalışmamızda, C4d pozitif hastalarda, glomerüllerin %25'inden fazlasında kresent varlığı negatiflere göre daha fazladır ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlıdır.

Literatürden izlendiği kadarıyla C4d durumu ile histopatolojik olarak IgA nefropatisinin prognozunu öngörmek amacıyla kullanılan Oxford klasifikasyonuna ait parametreler arasındaki ilişkiye yönelik tutarlı sonuçlar mevcut olmamakla birlikte kronisite bulguları olan tübüler atrofi/interstisyel fibrozis ve segmental skleroz C4d ile en çok korelasyon gösteren parametrelerdir.

Espinosa ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da C4d pozitif hastaların negatiflere göre daha yaşlı hastalar olduğu sonucuna varılmıştır. Böbrek fonksiyon testleri ile C4d immünohistokimyasal çalışmaları arasındaki korelasyonu incelediğimizde Espinosa ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptığı çalışma hariç (10) diğer çalışmalarda, bizim çalışmamızda da bulduğumuz gibi biyopsi anında C4d pozitif hastalarda istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek proteinüri değerleri (24 saatlik proteinüri ya da spot idrar proteinüri) mevcuttu (9, 11, 21-23, 39, 40). İzlenen çalışmaların bir kısmında C4d pozitif hastalarda tanı anında istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek serum kreatinin değerleri mevcut iken tahmini glomerüler filtrasyon hızları buna paralel olarak daha düşüktür (10, 11, 39). Segarra ve arkadaşları tarafından GFR değeri 80 ve üzerinde olan erken dönem hastalar üzerinde yapılan çalışmada hastaların erken dönem olması nedeniyle C4d pozitif ve negatif hastalar arasında kreatinin ve eGFR değerleri açısından anlamlı fark bulunmaz (22) iken pediatrik hastalar üzerinde çalışan Baeka ve arkadaşları ile Fabiano ve arkadaşları da bizim çalışmamızda olduğu gibi tanı anındaki eGFR değerleri açısından C4d pozitif ve negatif hastalar arasında anlamlı fark bulamamıştır (9, 23). C4d pozitifliği ile en sık istatistiksel olarak anlamlı korelasyon gösteren laboratuvar değeri proteinüridir.

C4d durumuna göre uygulanan tedavi biçimleri arasındaki farklılık incelendiğinde Espinosa ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmada bizim çalışmamıza paralel olarak anlamlı farklılık bulunmaz iken (38), Baek ve arkadaşları, Fabiano ve arkadaşları ile Segarra ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda C4d pozitif hastalarda negatiflere oranla istatistiksel olarak anlamlı daha fazla immüno-supresif tedavi kullanımı izlenmiştir (9, 22, 23).

Son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyişi tahmin etmek adına bununla ilişkili parametreler incelendiğinde literatürde izlenen çalışmalarda C4d pozitif hastalarda negatiflere göre istatistiksel olarak anlamlı daha fazla son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş kaydedilmiş; çoklu regresyon analizleri ile de test edilmiş ve C4d pozitifliğinin son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyişi öngörmek için kullanılabilecek bir immünohistokimyasal belirteç olduğu sonucuna varılmıştır (9, 10, 22, 38, 39, 41). Bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak C4d pozitif hastalarda son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla izlenmiştir. Oxford klasifikasyonuna ait parametrelerden son döneme ilerleyişi öngörmede anlamlı bulunanlar Espinosa ve arkadaşlarının yaptığı iki çalışmada da glomeruloskleroz varlığı ve tübüler atrofi/interstisyel fibrozis skorunun T2 olması iken Faria ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada yalnızca %25'in üzerinde tübüler atrofi/interstisyel fibrozis olmasıdır (10, 38, 41). Biz literatürdeki sonuçlardan farklı olarak %50'den fazla mesangial hiperselülarite ve %50'den fazla segmental skleroz varlığını son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş ile istatistiksel olarak korele bulduk. Biyopsi anındaki proteinürinin yüksek olması da bu çalışmaların hepsinde ortak olarak son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş ile ilişkili bulunmuştur (9, 10, 22, 38, 39, 41).

Yapılan beş çalışmada çoklu Cox regresyon modeli ile son dönem böbrek yetmezliği ile ilişkili olan parametreler incelenmiş bu çalışmaların tümünde C4d ile yine anlamlı ilişki bulunmuştur (9, 22, 38, 39, 41). Bu çalışmalardan Espinosa ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışma ile Segarra ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada başlangıç proteinürinin yüksek olması çoklu Cox regresyon analizi ile son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyişi öngörmek adına anlamlı bulunurken (22, 38); Fabiano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1gr/gün'ün üzerindeki başlangıç proteinüri değeri ile anlamlı sonuç elde edilmiştir (9). Biz çalışmamızda son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyişi çoklu lojistik regresyon analizi ile inceledik. Kurduğumuz modelde histopatolojik parametreler yer almakta olup bunlar mesangial hiperselülarite, segmental sklerozun %50'nin üzerinde olması, C4d pozitifliği ve WT1'in sitoplazmik pozitifliğidir. Model içerisinde son dönem böbrek yetmezliğine gidişi istatistiksel anlamlı olarak öngören parametreler mesangial hiperselülarite,

segmental sklerozun %50'nin üzerinde olması ve WT1'in sitoplazmik pozitifliğidir. C4d ile model içinde anlamlı korelasyon elde edilememiştir.

C4d pozitif ve negatif hastaları renal sağkalım açısından incelediğimizde sağkalım analizi yapan tüm çalışmalarda ve bizim çalışmamızda C4d pozitif hastaların negatif olanlara göre renal sağkalım süresi istatistiksel anlamlı olarak daha kısadır. Bu çalışmaların tümünde renal sağkalım süresi eGFR'ın 15 ml/dk/1.73m²'nin altına düşmesi ya da dializ ihtiyacı olmasına kadar geçen süre olarak tanımlanırken yalnızca Fabiano ve arkadaşları tarafından pediatrik populasyon üzerinde yapılan çalışmada eGFR başlangıç değerinin %50 ve daha fazla düştüğü ana kadar geçen zaman olarak tanımlanmıştır (9, 10, 38, 39, 41).

Böbrek fonksiyonları görece daha iyi olan erken dönem hastalarda C4d immünohistokimyasal çalışmasının prognozu öngörmedeki başarısını araştırmak amacıyla hastalarımızı ayırtırdığımızda yeterli sayıda örneklemimiz olmaması nedeni ile sağlıklı sonuçlara ulaşamadık. Segarra ve arkadaşları tarafından biyopsi anındaki eGFR değeri 80 ml/dk/1.73m² ve üzerinde olan hastalar üzerinde yapılan çalışmada görülmüşki C4d pozitifliği erken dönemde mevcut olup prognoza etki etmektedir (22). Bu sonuç da IgA nefropati tanısı almış erken dönem hastaların tedavi yönetimleri ve patogenezi açısından oldukça faydalı bilgi sağlamaktadır. Bu çalışmadan anlıyoruz ki mannoz bağlayıcı lektin yolak aktivasyonu böbrek hasarlanması sonucunda değil de hastalığın başlangıcında immün depozitlerin mesangial alana çökmesi ile birlikte başlamaktadır; ancak neden sadece hastaların %25'inde olmakta olduğu hala açıklanmayı beklemektedir.

IgA nefropatisinin patogenezinde tanımlanan antijen-antikor kompleks aracılı kompleman aktivasyonuna bağlı glomerüler hasarlanma yanı sıra glomerüloskleroz ve proteinüri ile giden kronik glomerüler hastalıkların patogenezinde tanımlanan Notch sinyal yolak aktivasyon durumunu dolaylı olarak incelemek istedik (25). Bu amaçla değerlendirdiğimiz böbrek biyopsilerini ADAM10 belirteci ile immünohistokimyasal olarak inceledik. Çalışmamız ADAM10 molekülünü, IgA nefropatili hastalarda immünohistokimyasal olarak inceleyen ilk çalışmadır. Murea ve arkadaşları ile Waters ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda glomerüloskleroz ve

proteinüri ile giden kronik glomerüler hastalıklarda podositlerde ifadelendiği bilinen bu belirtecin, WT1 ile birlikte yaptığımız ikili boyama ile podosit olduğunu teyid ettiğimiz hücrelerde boyanmasını görmediğimiz gibi glomerüler hiçbir komponentte boyanma görmedik (25, 26). Bu durum diğer çalışmalardaki immünfloresan saptama yöntemine karşın bizim immünohistokimya yöntemini kullanmış olmamız ile ilişkili olabilir veya IgA nefropatili hastalarda Notch sinyal yolağında belki de ADAM10 molekülü dışında farklı proteolitik enzimler rol almaktadır. Bu sonuç Notch sinyal yolağında yer alan fonksiyonel moleküllerin spesifik glomerüler hastalıklarda daha detaylı araştırılmasını gerektirmektedir. ADAM10 molekülünün L1 adezyon molekülü aracılığı ile distal tübül ve toplayıcı kanal morfogenezinde yer aldığı bilinmektedir. Bizim çalışmamızda ADAM10 belirteci ile tübül epitel hücrelerinde ekspresyon izlenmiş olup izlenen tübül epitel hücrelerindeki ekspresyon proksimal tübüllerde mevcut olmayıp bunlar dışında kalan distal tübül ve/veya toplayıcı kanal epitel hücrelerine sınırlıdır. ADAM10 molekülünün bazı biyopsilerde daha yaygın ifadelenmesinin tübül kaybı ile ilişkisini anlamak amacıyla ADAM10 sonuçları ile tübül atrofisi/interstisyel fibrozis gösteren biyopsiler arasındaki ilişkiyi incelediğimizde anlamlı bir korelasyon göremedik. Dahası diğer Oxford klasifikasyon parametreleri, laboratuvar veriler (serum kreatinin, günlük ya da spot proteinüri ve eGFR) ve C4d immünohistokimyasal sonuçları ile ADAM10 tübül epitel boyanma sonuçları arasında da anlamlı bir ilişki bulamadık.

WT1'in nokta mutasyonları ya da posttranskripsiyonel olarak ifadelenmesinin azalmasının glomerüloskleroza yol açtığı bilinmektedir (28, 32, 36). Podosit iç mimarisinin devamlılığında sorumlu nefrin ve podokalsin proteinlerinin transkripsiyonel düzeyde ifadelenmesini artıran WT1'in (37) ifadelenmesinin azalması muhtemelen bir çeşit podosit disfonksiyonuna ya da kaybına neden olmakta ve bu durum skleroz ile sonuçlanmaktadır. WT1'in fonksiyonel olarak baskılanmasının göstergesi olarak literatürde sitoplazmik lokalizasyonu ifade edilmiştir (28, 29, 33, 37). Literatürde WT1'in farklı klonları ile immünohistokimyasal olarak tümör dokularındaki ekspresyonu araştırılmış (31); ancak kronik glomerüler hastalıklarda WT1'in glomerüllerdeki immünohistokimyasal ifadelenmesine yönelik çalışmaya

rastlanmamıştır. Biz yaptığımız bu çalışmada immünohistokimyasal olarak WT1 ile çoğunlukla nükleer ekspresyon görmemizin yanı sıra sitoplazmik ekspresyona da rastladık. WT1'in farklı klonları ile farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu çalışmada WT1 fare monoklonal antikoru WT49 klonu kullanılmış olup Tsuta ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada bu klon ile çeşitli tümörlerde yalnızca nükleer boyanma bulunmuştur. İzlenen sitoplazmik boyanmaların non-spesifik endojen biotin boyanması olmadığı EnVision pozitif immünohistokimyasal saptama yöntemi kullanıldığı için ekarte edilmiştir (42). Çalışmamızda sitoplazmik şiddetli boyanma izlenen hastalarda sitoplazmik boyanma olmayanlara kıyasla daha fazla son dönem böbrek yetmezliğine ilerleyiş kaydedilmiş olmasına rağmen bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır; ancak anlamlılık sınırına çok yakın olduğu dikkati çekmiştir (**Fisher'in kesin testi $p=0.064$**). Yanı sıra sitoplazmik şiddetli boyanma izlenen hastalarda sitoplazmik boyanma olmayanlara kıyasla daha fazla sayıda böbrek fonksiyon testlerinde kötüleşme olan hasta mevcuttur; fakat bu sonuç da anlamlılık sınırına çok yakın olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildir (**Fisher'in kesin testi $p=0.051$**). Bunlarla birlikte kötü prognoz ile ilişkili bulduğumuz C4d pozitif hastalarda istatistiksel anlamlı olarak daha fazla sayıda WT1 ile sitoplazmik boyanma izlenmiştir (**Fisher'in kesin testi $p=0.040$**). Bu sonuçtan yola çıkarak mannoz bağlayıcı lektin yolağı aktivasyonunun WT1'in sitoplazmik alana taşınması veya bu alanda sınırlandırılmasına neden olabileceği hipotezi ortaya atılabilir. Bu ilişkinin aydınlatılması için deneysel çalışmalar tasarlanması gerekmektedir. WT1 ile sitoplazmik boyanma izlenen hastalarda WT1 fonksiyonlarında bir çeşit ifadenme azalması olduğunu düşünecek olursak bunun bir çeşit podosit fonksiyon bozukluğuna yol açması beklenir. Ancak podosit fonksiyon bozukluğunu dolaylı olarak gösterecek olan proteinüri varlığını WT1 ile sitoplazmik boyanması olan ve olmayan hastalarda kıyasladığımızda tanı anındaki proteinüri değerleri ile anlamlı sonuç elde edemedik. Dahası WT1 fonksiyon bozukluğu ile ilişkilendirilen ve podosit hasarına bağlı oluşabilen segmental glomerüloskleroz ile sitoplazmik boyanması olan ve olmayan hastalarda arasında da anlamlı fark bulamadık. Sitoplazmik WT1'in glomerüloskleroz ve proteinüri ile ilişkili olmaması WT1'in bağımsız bir potansiyel prognostik belirteç

olduğunu ortaya koymaktadır ve belki podositopati dışı bir mekanizmaya işaret etmektedir. Son dđnem bđbrek yetmezliğine ilerleyenlerde ve bđbrek fonksiyon testlerinde kđtđleřmesi olan hastalarda neden daha fazla sitoplazmik WT1 ekspresyonu olduğunu literatürde yer alan mekanizmalarla net olarak aıklayamadık. Bu alışma, IgA nefropatisinin patogenezinde WT1'in sitoplazmik transferinin veya sitoplazmada hapsolmasının da yer alabileceğini ve bu hastalarda klinik gidişin daha kđtđ olduğunu gđsterme anlamında ilk çalışma niteliğindedir. Bu konuda gđzlem sayıları artırılarak çeşitli glomerüler hastalıklarda yapılacak moleküler temelli alışmalar WT1'in kronik glomerüler hastalıkların patogenezindeki yerini tanımlamak ve hangi yolaklarla ilişkisi olduğunu bulmak adına yararlı olacaktır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sonuçlar:

1) MannoZ bağlayıcı lektin yolak aktivasyonu ve bunun dolaylı bir göstergesi olan glomerüler C4d pozitifliği IgA nefropatili hastalarda daha kötü prognozla ilişkilidir.

2) ADAM10 belirtecini IgA nefropatili hastalarda immünohistokimyasal olarak glomerüler ekspresyonu saptanmamıştır. Tübüler ekspresyonunun tübül hasarı ya da diğer patolojik ve klinik parametrelerle korelasyonu görülmemiştir.

3) WT1 proteini IgA nefropatisinin patogeneğinde yer almaktadır. IgA nefropatili hastalarda WT1'in sitoplazmik ekspresyonu diğer parametrelerden bağımsız olarak kötü prognozla ilişkilidir.

Öneriler:

1) IgA nefropatili hastalarda Oxford klasifikasyonunda yer alan parametreler hastaların klinik sürecini yönlendirme anlamında fayda sağlayacağından biyopsi raporlarında ayrıntılı olarak tarif edilmelidir.

2) IgA nefropatili hastalarda gerek prognozu ön görme açısından, gerekse ileride ortaya çıkabilecek potansiyel tedaviler açısından tanı anında immünohistokimyasal olarak C4d boyanması rutin olarak yapılıp yapılmaması tartışılmalıdır. Mezangial/perimezangial boyanmanın pozitif olarak değerlendirilmesi en doğru gibi gözükmele beraber C4d pozitifliğinin kriterlerinin net tanımlanması ve standardizasyonu için daha ileri çalışmalar yapılmalıdır.

3) IgA nefropatili hastalarda tanı anında immünohistokimyasal olarak WT1 boyanması yapılması ve sitoplazmik pozitiflik olduğu takdirde kötü prognozla ilişkili olduğundan bunun belirtilmesi düşünülmelidir. Sitoplazmik WT1 boyanmasının altında yatan mekanizmaların aydınlatılması için çalışmalar düzenlenmelidir.

4) ADAM10 molekülünün glomerüler ekspresyonu olup olmadığı immünohistokimya dışı yöntemlerle de araştırılmalıdır. Tübüler ekspresyonu ve bunun anlamı açısından daha çok hastalı serilerde araştırma yapılmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Al Hussain T, Hussein MH, Al Mana H, Akhtar M. Pathophysiology of IgA nephropathy. *Advances in anatomic pathology*. 2017;24(1):56-62.
2. Lai KN, Tang SC, Schena FP, Novak J, Tomino Y, Fogo AB, et al. IgA nephropathy. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2:16001.
3. Krochmal M, Cisek K, Filip S, Markoska K, Orange C, Zoidakis J, et al. Identification of novel molecular signatures of IgA nephropathy through an integrative-omics analysis. *Scientific reports*. 2017;7(1):9091.
4. Robert T, Berthelot L, Cambier A, Rondeau E, Monteiro RC. Molecular insights into the pathogenesis of IgA nephropathy. *Trends in Molecular Medicine*. 2015;21(12):762-75.
5. Kojima S, Koitabashi K, Iizuka N, Okamoto K, Arito M, Sato T, et al. Proteomic analysis of whole glomeruli in patients with IgA nephropathy using microsieving. *American journal of nephrology*. 2014;39(1):36-45.
6. Schramme A, Abdel-Bakky MS, Kämpfer-Kolb N, Pfeilschifter J, Gutwein P. The role of CXCL16 and its processing metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 in the proliferation and migration of human mesangial cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;370(2):311-6.
7. Gutwein P, Schramme A, Abdel-Bakky MS, Doberstein K, Hauser IA, Ludwig A, et al. ADAM10 is expressed in human podocytes and found in urinary vesicles of patients with glomerular kidney diseases. *Journal of biomedical science*. 2010;17(1):3.
8. Wang L, Sun S, Zhou A, Yao X, Wang Y. oxLDL-induced lipid accumulation in glomerular podocytes: role of IFN- γ , CXCL16, and ADAM10. *Cell biochemistry and biophysics*. 2014;70(1):529-38.
9. Fabiano RCG, de Almeida Araújo S, Bambirra EA, Oliveira EA, e Silva ACS, Pinheiro SVB. Mesangial C4d deposition may predict progression of kidney disease in pediatric patients with IgA nephropathy. *Pediatric Nephrology*. 2017;32(7):1211-20.
10. Espinosa M, Ortega R, Gómez-Carrasco JM, López-Rubio F, López-Andreu M, López-Oliva MO, et al. Mesangial C4d deposition: a new prognostic factor in IgA nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2008;24(3):886-91.
11. Wągrowaska-Danilewicz M, Danilewicz M. The utility of glomerular C4d immunostaining in renal biopsies in patients with immunoglobulin A nephropathy. a clinicopathological study. *Polish Journal of Pathology*. 2017;68(2):148-52.
12. Magistroni R, D'Agati VD, Appel GB, Kiryluk K. New developments in the genetics, pathogenesis, and therapy of IgA nephropathy. *Kidney international*. 2015;88(5):974-89.
13. Monteiro RC. Recent advances in the physiopathology of IgA nephropathy. *Nephrologie & therapeutique*. 2018;14:S1-S8.

14. of the International AWG, Network IN, Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, et al. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. *Kidney international*. 2009;76(5):546-56.
15. Soares MF, Roberts IS, editors. *Histologic classification of IgA nephropathy: past, present, and future*. Seminars in nephrology; 2018: Elsevier.
16. Herzenberg AM, Fogo AB, Reich HN, Troyanov S, Bavbek N, Massat AE, et al. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy. *Kidney international*. 2011;80(3):310-7.
17. Trimarchi H, Barratt J, Cattran DC, Cook HT, Coppo R, Haas M, et al. Oxford classification of IgA nephropathy 2016: an update from the IgA nephropathy classification working group. *Kidney International*. 2017;91(5):1014-21.
18. Chandra P. C4d in Native Glomerular Diseases. *American journal of nephrology*. 2019;49(1):81-92.
19. Daha MR, van Kooten C. Role of complement in IgA nephropathy. *Journal of nephrology*. 2016;29(1):1-4.
20. Maeng Y-I, Kim M-K, Park J-B, Cho C-H, Oh H-K, Sung WJ, et al. Glomerular and tubular C4d depositions in IgA nephropathy: relations with histopathology and with albuminuria. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2013;6(5):904.
21. Nasri H, Ahmadi A, Rafieian-kopaei M, Bashardoust B, Nasri P, Mubarak M. Association of glomerular C4d deposition with various demographic data in IgA nephropathy patients; a preliminary study. *Journal of nephropathology*. 2015;4(1):19.
22. Segarra A, Romero K, Agraz I, Ramos N, Madrid A, Carnicer C, et al. Mesangial C4d deposits in early IgA nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2018;13(2):258-64.
23. Baek HS, Hoon Han M, Jin Kim Y, Hyun Cho M. Clinical Relevance of C4d Deposition in Pediatric Immunoglobulin A Nephropathy. *Fetal and pediatric pathology*. 2018;37(5):326-36.
24. Roos A, Rastaldi MP, Calvaresi N, Oortwijn BD, Schlagwein N, van Gijlswijk-Janssen DJ, et al. Glomerular activation of the lectin pathway of complement in IgA nephropathy is associated with more severe renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(6):1724-34.
25. Murea M, Park J-K, Sharma S, Kato H, Gruenwald A, Niranjana T, et al. Expression of Notch pathway proteins correlates with albuminuria, glomerulosclerosis, and renal function. *Kidney international*. 2010;78(5):514-22.
26. Waters AM, Wu MY, Onay T, Scutaru J, Liu J, Lobe CG, et al. Ectopic notch activation in developing podocytes causes glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(6):1139-57.
27. Asfahani RI, Tahoun MM, Miller-Hodges EV, Bellerby J, Virasami AK, Sampson RD, et al. Activation of podocyte Notch mediates early Wt1 glomerulopathy. *Kidney international*. 2018;93(4):903-20.
28. Zapata-Benavides P, Arellano-Rodríguez M, Bollain-y-Goytia JJ, Franco-Molina MA, Rangel-Ochoa GA, Avalos-Díaz E, et al. Cytoplasmic localization of WT1 and

- decrease of miRNA-16-1 in nephrotic syndrome. *BioMed research international*. 2017;2017.
29. Hohenstein P, Hastie ND. The many facets of the Wilms' tumour gene, WT1. *Human molecular genetics*. 2006;15(suppl_2):R196-R201.
 30. Niksic M, Slight J, Sanford JR, Caceres JF, Hastie ND. The Wilms' tumour protein (WT1) shuttles between nucleus and cytoplasm and is present in functional polysomes. *Human molecular genetics*. 2003;13(4):463-71.
 31. Nakatsuka S-i, Oji Y, Horiuchi T, Kanda T, Kitagawa M, Takeuchi T, et al. Immunohistochemical detection of WT1 protein in a variety of cancer cells. *Modern pathology*. 2006;19(6):804.
 32. Guo J-K, Menke AL, Gubler M-C, Clarke AR, Harrison D, Hammes A, et al. WT1 is a key regulator of podocyte function: reduced expression levels cause crescentic glomerulonephritis and mesangial sclerosis. *Human molecular genetics*. 2002;11(6):651-9.
 33. Ye Y, Raychaudhuri B, Gurney A, Campbell C, Williams B. Regulation of WT1 by phosphorylation: inhibition of DNA binding, alteration of transcriptional activity and cellular translocation. *The EMBO journal*. 1996;15(20):5606-15.
 34. Mundlos S, Pelletier J, Darveau A, Bachmann M, Winterpacht A, Zabel B. Nuclear localization of the protein encoded by the Wilms' tumor gene WT1 in embryonic and adult tissues. *Development*. 1993;119(4):1329-41.
 35. Englert C, Vidal M, Maheswaran S, Ge Y, Ezzell RM, Isselbacher KJ, et al. Truncated WT1 mutants alter the subnuclear localization of the wild-type protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(26):11960-4.
 36. Gebeshuber CA, Kornauth C, Dong L, Sierig R, Seibler J, Reiss M, et al. Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1. *Nature medicine*. 2013;19(4):481.
 37. Kato T, Mizuno S, Kamimoto M. The decreases of nephrin and nuclear WT1 in podocytes may cause albuminuria during the experimental sepsis in mice. *Biomedical Research*. 2010;31(6):363-9.
 38. Espinosa M, Ortega R, Sánchez M, Segarra A, Salcedo MT, González F, et al. Association of C4d deposition with clinical outcomes in IgA nephropathy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2014;9(5):897-904.
 39. Sahin OZ, Yavas H, Taslı F, Gibyeli DG, Ersoy R, Uzum A, et al. Prognostic value of glomerular C4d staining in patients with IgA nephritis. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2014;7(6):3299.
 40. Heybeli C, Unlu M, Yildiz S, Çavdar C, Sarioglu S, Camsari T. IgA nephropathy: association of C4d with clinical and histopathological findings and possible role of IgM. *Renal failure*. 2015;37(9):1464-9.
 41. Faria B, Henriques C, Matos A, Daha M, Pestana M, Seelen M. Combined C4d and CD3 immunostaining predicts immunoglobulin (Ig) A nephropathy progression. *Clinical & Experimental Immunology*. 2015;179(2):354-61.
 42. Tsuta K, Kato Y, Tochigi N, Hoshino T, Takeda Y, Hosako M, et al. Comparison of different clones (WT49 versus 6F-H2) of WT1 antibodies for immunohistochemical diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2009;17(2):126-30.