

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MEMBRANÖZ NEFROPATİLİ HASTALARDA
ANTİ-FOSFOLİPAZ A2 RESEPTÖR ANTİKORLARININ
TANISAL VE PROGNOSTİK DEĞERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Mustafa Erdem SARP

TRABZON-2023

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MEMBRANÖZ NEFROPATİLİ HASTALARDA
ANTİ-FOSFOLİPAZ A2 RESEPTÖR ANTİKORLARININ
TANISAL VE PROGNOTİK DEĞERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Mustafa Erdem SARP

Tez Danışmanları

Prof. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU

Doç. Dr. Irmak BARAN

TRABZON-2023

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezi hazırlamam da emeği geçen, her türlü sorunuma çözüm üretmeye çalışan ve onlarla çalışmaktan onur duyduğum çok değerli hocalarım ve tez danışmanlarım Prof. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU ve Doç. Dr. Irmak BARAN'a;

Uzmanlık eğitimimde yanımda olan, meslek hayatıma katkıları olan ve onları tanımaktan mutluluk duyduğum Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı eski başkanı Prof. Dr. Faruk AYDIN ve şimdiki başkanı Prof. Dr. Celal Kurtuluş BURUK'a; Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ, Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Prof. Dr. İlknur TOSUN, Doç. Dr. Esra ÖZKAYA ve Dr. Öğr. Üyesi Metin SANCAKTAR'a;

Asistanlığım sürecinde onlarla çalışmaktan ve meslektaş olmaktan gurur duyduğum asistan arkadaşlarım ve tüm mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına, desteklerini unutmayacağım arkadaşlarım Dr. Serranur ALTUN SARP, Dr. Merve ÖZDERYA, Dr. Yasemin ALTUN, Dr. Enis TOPÇU ve Uzm. Dr. Yaşar Faik İSKEFYELİ'ye; ayrıca tezin istatistik kısmında yardımcı olan Dr. Sümeyra YILDIZ'a;

Tez çalışmamda bilgilerinden yararlandığım ve Nefroloji bölümünden numune toplama konusunda bana yol gösterici olan Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Nefroloji Bilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Rukiye Kübra KAYNAR'a;

Tez çalışmamı Prof. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU yönetiminde TTU-2023-10605 kodlu proje ile destekleyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne;

Hayatımda olması benim en büyük şansım olan, sevgisini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim, tezin başlangıcından sonuna kadar her an yanımda olan eşim Serranur ALTUN SARP'a, bugünlere gelmemde beni destekleyen ve beni yetiştiren Filiz-Bayram SARP'a, iyi ki benim kardeşim dediğim Enes SARP'a ve tüm aileme teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa Erdem SARP/Kasım-2023

ÖZET

Amaç: Membranöz nefropati (MN), yetişkin insanlarda nefrotik sendromun en sık sebebidir. Böbrek biyopsisi, MN tanısında altın standart yöntem olmakla birlikte, ağrı ve kanama gibi riskler içeren invaziv bir işlemdir. Son yıllarda, fosfalipaz A2 reseptörü (PLA2R) antikoru, umut vaat eden tanısal bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada, MN'li hastalarda PLA2R antikorunun tanısal, prognostik değerinin ve iki farklı *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) test kitinde en uygun eşik değerlerin araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bölümünde, Haziran 2022-Haziran 2023 tarihlerinde, primer membranöz nefropati (PMN), sekonder membranöz nefropati (SMN), MN dışı nefrotik sendrom tanısı ile takip edilen 74 hasta ve 15 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Anti-PLA2R antikor düzeyleri, iki farklı ticari ELISA kiti (Euroimmun, Lübeck, Almanya ve MyBioSource, San Diego, California, ABD) ile değerlendirilmiştir. Klinik biyokimya test sonuçları hastane kayıtlarından elde edilmiştir.

Bulgular: Euroimmun ELISA kitinde, üreticinin önerisi olan 20 RU/ml eşik değerinde duyarlılık %30 ve özgüllük %100 olarak saptanmıştır. Euroimmun ELISA kiti ile bulunan konsantrasyon değerlerinin receiver operating characteristic (ROC) eğrisi analizine göre eşik değeri 1,19 RU/ml olarak bulunmuştur; testin duyarlılığı %66,6 ve özgüllüğü %72,7 olarak saptanmıştır. Eşik değer 2 RU/ml kullanıldığında ise duyarlılık %46,6'ya yükselirken, özgüllük %100 olarak kalmıştır. MyBioSource ELISA kiti ile bulunan konsantrasyon değerlerinin ROC eğrisi analizine göre bir eşik değeri saptanamamıştır. Euroimmun ELISA kitinde, antikor pozitif hastaların negatif hastalara göre, daha yüksek ortalama proteinüri ($p=0,015$) ve daha düşük ortalama albümin ($p=0,010$) düzeylerine sahip olduğu bulunmuştur. Anti-PLA2R antikor pozitif PMN'li hastalar da, negatif hastalara göre ortalama hemoglobinin ($p=0,030$) ve hematokrit ($p=0,039$) değerleri daha düşük saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda, Euroimmun ELISA kitinde üreticinin önerdiği eşik değer kullanıldığında, pozitif sonucun daha yararlı olduğu ve biyopsi ihtiyacını kaldırdığı, negatif sonucun ise biyopsi ile doğrulanması gerektiği saptanmıştır. Her iki test kitinde de optimal eşik değerin belirlenmesi için daha fazla sayıda hasta ile daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Antikor pozitifliğinin yüksek proteinüri düzeyiyle ve düşük hemoglobin/hematokrit değerleri ile ilişkili olması; MN'nin kronik böbrek yetmezliğine ilerlemesi ile ilişkili olabilir ve antikorun prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini gösterebilir.

ABSTRACT

Objective: Membranous nephropathy (MN) is the most common cause of nephrotic syndrome in adults. Although kidney biopsy is the gold standard method in the diagnosis of MN, it is an invasive procedure that involve risks such as pain and bleeding. In recent years, phospholipase A2 receptor antibody (anti-PLA2R) has been identified as a promising diagnostic biomarker. This study aimed to investigate the diagnostic and prognostic value of anti-PLA2R antibody in patients with MN by using two different commercial Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) kits, and to determine the most optimal cut-off values.

Materials and Methods: This study included 74 patients who were followed up with a diagnosis of primary membranous nephropathy (PMN), secondary membranous nephropathy (SMN) or non-MN nephrotic syndrome at Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Nephrology, between June 2022-June 2023. 15 healthy individuals were also included. Anti-PLA2R antibody levels were assessed with two different commercial ELISA kits (Euroimmun, Lübeck, Germany and MyBioSource, San Diego, California, USA). Clinical biochemistry test results were obtained from hospital records.

Results: When the Euroimmun ELISA kit was used at a cut-off of 20 RU/ml in accordance with the manufacturer's recommendations, sensitivity was detected 30% and specificity was 100%. When receiver operating characteristic (ROC) analysis was performed, the cut-off value of the Euroimmun ELISA kit for our study was found to be 1.19 RU/ml. When this cut-off value was used, the sensitivity of the test was found to be 66.6% and the specificity was 72.7%. When the cut-off value of 2 RU/ml was used, sensitivity was increased to 46.6% and specificity remained 100%. Such a cut-off value could not be determined with the ROC curve analysis of the concentration values determined by the MyBioSource ELISA kit. In the Euroimmun ELISA kit, antibody-positive patients were found to have higher mean proteinuria ($p=0.015$) and lower mean albumin ($p=0.010$) levels than negative patients. Average hemoglobin ($p=0.030$) and hematocrit ($p=0.039$) values were found to be lower in anti-PLA2R antibody positive patients who have PMN compared to negative patients.

Conclusion: In this study, it has been determined that when the cut-off value recommended by the manufacturer is used in the Euroimmun ELISA kit, a positive result is more useful and eliminates the need for biopsy, while a negative result should be confirmed by biopsy. Further studies are needed to determine the optimal cut-off value for both test kits. Antibody positivity was found to be associated with high proteinuria levels and low hemoglobin/hematocrit values; it may be associated with the progression of MN to chronic renal failure and may indicate that this antibody can be used as a prognostic biomarker.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Membranöz nefropati	2
2.1.1. Genel bilgiler	2
2.1.2. Patogenez	2
2.1.3. Histopatoloji	7
2.1.4. Etiyoloji	7
2.1.5. Primer membranöz nefropati	9
2.1.6. Sekonder membranöz nefropati	9
2.1.7. Epidemiyoloji	9
2.1.8. Tanı	10
2.2. Fosfolipaz A2 reseptör otoantikoru	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Etik kurul onayı	17
3.2. Çalışmanın özellikleri	17

3.2.1. Çalışmaya dahil edilen gruplar	17
3.2.2. Çalışmaya kabul edilme/edilmeme ölçütleri	17
3.3. Örneklerin toplanması-saklanması-stoklanması	18
3.4. Örnekleri çalışma yöntemi	18
3.5. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya)	19
3.5.1. Test prensibi	19
3.5.2. Test kitinin içeriği	19
3.5.3. Kit dışında kullanılan malzemeler	19
3.5.4. Anti-PLA2R IgG ELISA çalışma basamakları	20
3.6. Anti-PLA2R IgG ELISA (Mybiosource, San Diego, California, ABD)	22
3.6.1. Test prensibi	22
3.6.2. Test kitinin içeriği	22
3.6.3. Kit dışında kullanılan malzemeler	22
3.6.4. Anti-PLA2R IgG ELISA çalışma basamakları	23
3.7. Verilerin istatistiksel analizi	24
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA	36
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	46
7. KAYNAKLAR	48
8. EKLER	57

KISALTMALAR DİZİNİ

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ALT: Alanin Aminotransferaz

ANA: Anti Nükleer Antikor

ANCA: Anti-Nötrofil Sitoplazmik Antikor

BUN: Blood Urea Nitrogen

CA: California

CTLD: C Tipi Lektin Benzeri Alan

CysR: Sistein Bakımından Zengin Alan

eGFR: Tahmini Glomerüler Filtrasyon Hızı

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FNII: Fibronektin Tip II

FSGS: Fokal Segmental Glomerüloskleroz

GBM: Glomerüler Bazal Membran

GVHD: Graft-Versus-Host Disease

HBV: Hepatit B Virüsü

HBYS: Hastane Bilgi Yönetim Sistemi

HCV: Hepatit C Virüsü

HDL: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

HIV: Human Immunodeficiency Virus

HRP: Horseradish Peroxidase

IFT: İmmü Floresan Testi

Ig: İmmunoglobulin

IST: İmmünoşüpresif Tedavi

KTÜ: Karadeniz Teknik Üniversitesi

LDL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

MDH: Minimal Değişiklik Hastalığı

MN: Membranöz Nefropati

MPGN: Membranoproliferatif Glomerülo nefrit

NPD: Negatif Prediktif Değer

NSAİİ: Non-steroidal Antiinflatuar İlaçlar

OD: Optik Dansite

PLA2R: Fosfolipaz A2 Reseptörü

PMN: Primer Membranöz Nefropati

PPD: Pozitif Prediktif Değer

ROC: Receiver Operating Characteristic

RU: Relative Units

SLE: Sistemik Lupus Eritematozus

SMN: Sekonder Membranöz Nefropati

SPSS: Statistical Package for the Social Science

THSD7A: Thrombospondin type-1 domain-containing 7A

TNF: Tümör Nekroz Faktör

WB: Western Blot

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. PMN'nin başlıca nedenleri	8
Tablo 2. SMN'nin başlıca nedenleri	8
Tablo 3. Nefrotik sendromun MN dışı nedenleri	8
Tablo 4. MN'nin prognozunu ve tedavisini belirlemede yararlı belirteçler	15
Tablo 5. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinde, hastaların ve sağlıklıların, anti-PLA2R antikoru pozitif ve negatif sonuçlarının yüzdesi	27
Tablo 6. Hastaların ve sağlıklı gönüllülerin, çalışılan iki kit için, anti-PLA2R antikoru sonuçlarının ortalama değerleri	28
Tablo 7. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinin, farklı eşik değerlerde duyarlılığı, özgüllüğü, ppd ve npd'i	29
Tablo 8. Hastaların anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testine göre antikor sonuçlarının glomerüler hastalıkla ilişkili parametrelere göre karşılaştırılması	30
Tablo 9. Proteinüri düzeyi ve proteinüri üzerine etki eden faktörlerin tüm hastaları içeren analizleri	32
Tablo 10. PMN'li hastalarda, anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testine göre temel klinik parametrelerin sonuçları	33
Tablo 11. Hastaların, tanılarına göre temel klinik parametrelerin sonuçları	34
Tablo 12. Anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi kullanılarak yapılan çalışmalarda, farklı eşik değerlerde, testin duyarlılık, özgüllük, ppd ve npd'lerinin sonuçları	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. MN'nin sınıflandırması	3
Şekil 2. PLA2R ve THD7A özellikleri	4
Şekil 3. PMN'nin gelişimine neden olan mekanizma	5
Şekil 4. PLA2R ile ilişkili MN'de otoantikor kaynaklı oluşan patogenezin şeması	6
Şekil 5. MN'li hastada morfolojik bulgular	7
Şekil 6. PMN için tanı ve tedavi algoritması	10
Şekil 7. PLA2R'nin şematik gösterimi	11
Şekil 8. PLA2R ve THSD7A'nın epitoplarının şematik gösterimi	12
Şekil 9. Anti-PLA2R antikoruna için kalibrasyon eğrisi (Euroimmun (Lübeck, Almanya) anti-PLA2R ELISA kiti)	21
Şekil 10. Anti-PLA2R antikoruna için kalibrasyon eğrisi (MyBioSource (San Diego, CA, ABD) anti-PLA2R ELISA kiti)	24
Şekil 11. Hastaların tanılarına göre dağılımı	26
Şekil 12. Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kiti ROC eğrisi analizi	28
Şekil 13. MyBioSource ELISA (San Diego, CA, ABD) kiti ROC eğrisi analizi	29
Şekil 14. Hastaların anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi sonuçları ve proteinüri gruplarına göre oluşan yüzdelerin grafiği	31

1.GİRİŞ

Membranöz nefropati (MN), böbrek glomerülünün patolojik olarak tanımlanmış bir bozukluğudur. Bazal membranın dış kısmında immün kompleksler oluşur ve glomerüler kapiller duvarı kalınlaşır (1). MN'nin patofizyolojisinin anlaşılması için yapılan araştırmalar sonucunda önemli birçok antijen keşfi olmuştur (1-4). M-tipi fosfalipaz A2 reseptörü (PLA2R), MN'de en sık hedeflenen otoantijendir. PLA2R'ye karşı oluşan anti-PLA2R antikorlarının, primer membranöz nefropati (PMN) tanısındaki, duyarlılığı ve özgüllüğü yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (1, 2).

PMN hastalarında tanı koymada, tedaviyi izlemede ve hastalığın prognozunu belirlemede anti-PLA2R antikoru kullanılmaktadır. Anti-PLA2R antikorunun, PMN tanısı için önemli bir biyobelirteç olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Serolojik testlerin, MN tanısında kullanılan altın standart tanı testi olan biyopsinin yerini alabileceği düşünülmektedir (1, 5-7).

Serum anti-PLA2R antikorlarında değişiklikler, proteinüri düzeyindeki değişikliklerden önce saptanabildiğinden; anti-PLA2R antikorlarının hastanın tedaviye yanıtını izlemede faydalı bir araç olduğu düşünülmektedir (1). Anti-PLA2R antikorlarının ölçümüne yönelik immünfloresan testi (IFT) ve *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) bulunmaktadır. IFT'inin, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksektir. Ancak niceliksel değerlendirmeye olanak sağlamaz. ELISA testi ise antikor miktarının belirlenmesi için yapılan çalışmalarda daha sık kullanılmaktadır (1, 2).

Çalışmamıza, Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Nefroloji Bölümünde; Haziran 2022-Haziran 2023 tarihleri arasında PMN, sekonder membranöz nefropati (SMN) ve MN dışı nefrotik sendrom tanısı ile takip edilen 74 hasta ve 15 sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir. Çalışmamızda, iki farklı ticari ELISA kiti kullanarak anti-PLA2R antikoru düzeylerinin ve pozitiflik oranlarının saptanması ve bu kitlelere göre en uygun eşik değerlerin belirlenmesi amaçlanmıştır. Aynı zamanda bu antikoron hastalık aktivitesi ve prognostik parametrelerle ilişkisi de değerlendirilmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Membranöz nefropati

2.1.1. Genel bilgiler

MN, her yaşta görülebilen glomerüler bir hastalıktır. Erişkin insanlarda en sık nefrotik sendrom sebebidir. MN, immün komplekslerin birikimine bağlı olarak glomerüler kapiller duvarın kalınlaşması ile gerçekleşir. Otoimmün bir hastalıktır (1).

2.1.2. Patogenez

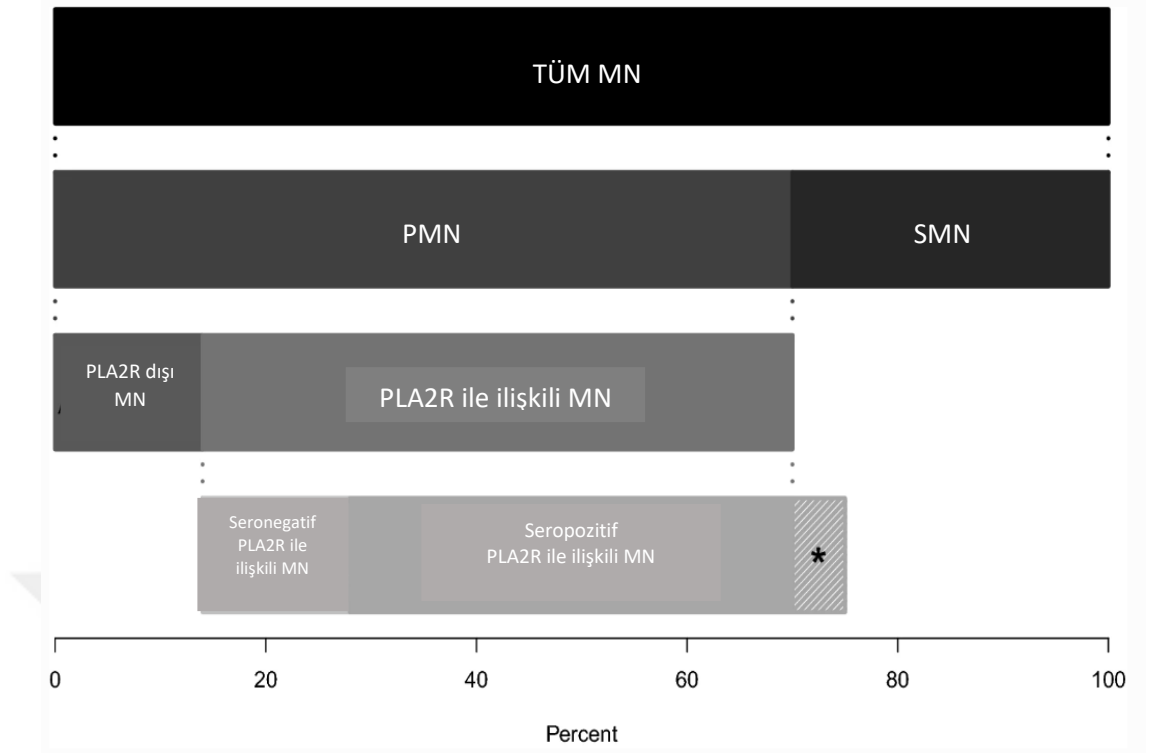
MN'nin patogenezi için ilk kanıtın 1959'da Heymann nefriti modeline dayandığı görülür. Bu model MN için podosit yüzeyine eksprese edilen antijen olarak megalinin tanımlanmasına katkı sağlamıştır (2).

Yapılan çalışmalar sonucunda MN'li hastalarda katyonik bovin serum albümin, aldoz redüktaz, süperoksit dismutaz ve nötral endopeptidaza karşı gelişmiş otoantikorların varlığı saptanmıştır (3,4).

Uzun süren çalışmalar sonucunda 2009 yılında PLA2R antijeni tanımlanmıştır. Bu keşif, MN'nin tanı ve tedavi değerlendirmesi yönünden ve klinik yönetiminde devrim yaratmıştır. Araştırmalar hız kesmeden devam etmektedir; Nöral epidermal büyüme faktörü benzeri-1, Ekzostotin 1-2, Kontaktin-1, Semaphorin-3B, Nöral hücre adezyon molekülü-1 gibi podosit antijenlerini hedefleyen, MN ilişkili antikorlar da bulunmuştur. PMN'de Nöral epidermal büyüme faktörü benzeri-1, Semaphorin-3B, Nöral hücre adezyon molekülü-1 antijenleri; SMN'de Ekzostotin 1-2, Nöral hücre adezyon molekülü-1 antijenleri tanımlanmıştır (2).

PLA2R, mannoz reseptör protein ailesine aittir ve 185 kDa'lık bir glikoproteindir. PLA2R'ye karşı gelişen antikorlar daha çok immunoglobulin (Ig) G4 alt tipine aittir. Biyopside diğer IgG alt sınıflarının varlığının saptanması SMN'yi akla getirir. IgG4 alt tipi komplemanı aktive etme konusunda sınırlı bir yeteneğe sahip olduğu için immün birikimler içinde C3'ün varlığı açıklanamamıştır (5,6).

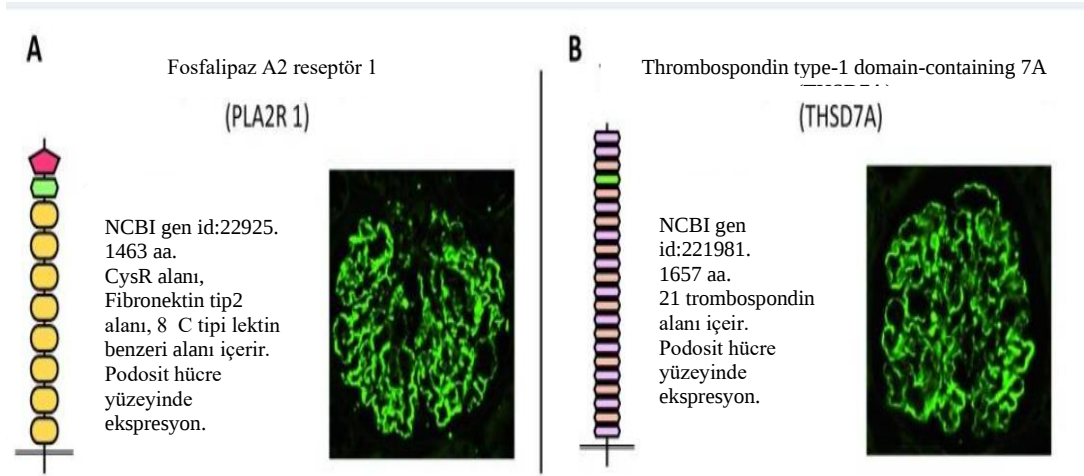
PLA2R ile ilişkili MN, PMN'nin yaklaşık %80'ini temsil etmektedir. PMN ise biyopsi ile tanı konulmuş MN'lerin yaklaşık %70-75 'ini temsil ettiğinden; PLA2R ilişkili MN, hastalığın yaklaşık olarak %55'ine karşılık gelir (Şekil 1) (7).



Şekil 1. MN'nin sınıflandırması (7)

* Seropozitif PLA2R ile ilişkili MN vakalarının çok büyük bir kısmı PMN hastalığının içindedir ancak çok nadir SMN olarak tanımlanan raporlar da vardır.

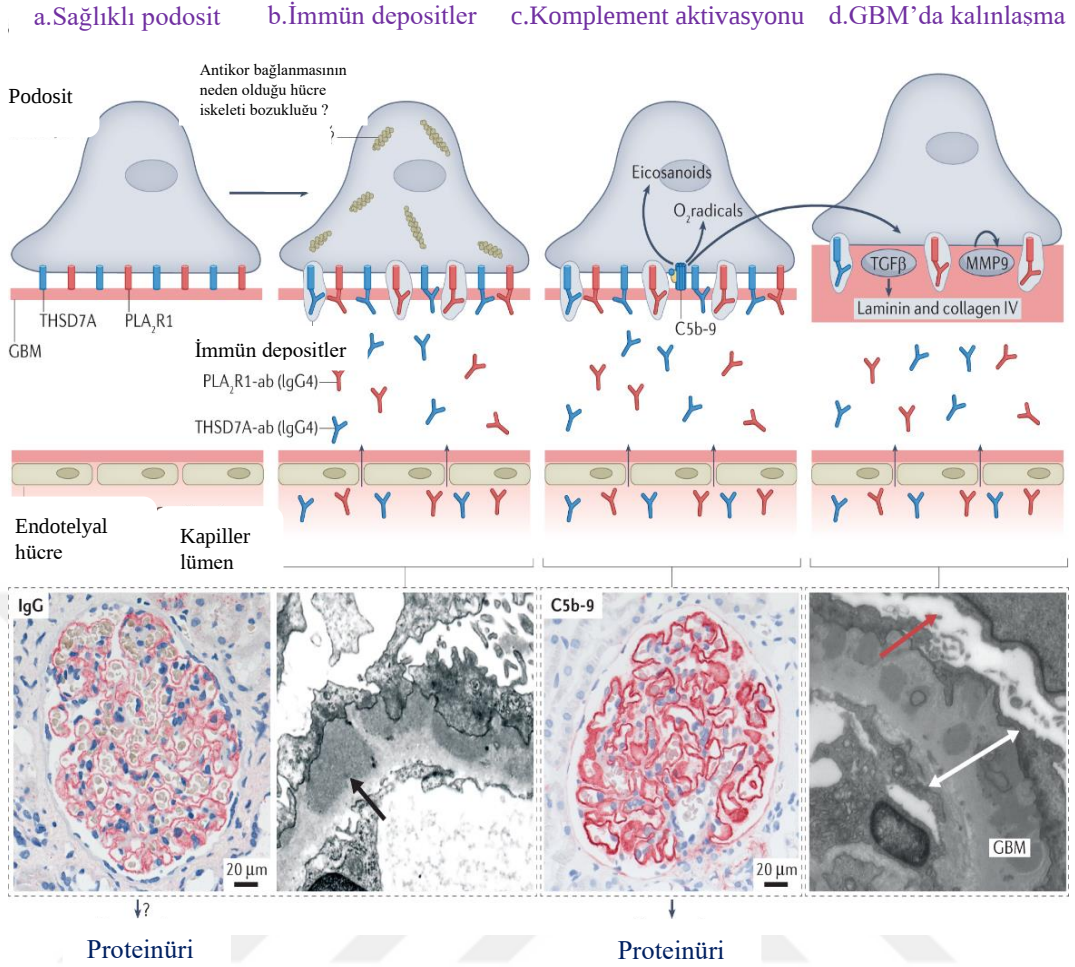
Tomas ve arkadaşları (8), 2014 yılında anti-thrombospondin type-1 domain-containing 7A (THSD7A) antikorunu, PMN'de gelişen bir otoantikor olarak göstermişlerdir. PMN'li hastalarının %2,5-5'inde THSD7A'ya karşı antikorlar saptamışlardır. Bu da, anti-PLA2R antikoru seronegatif olanların %8-14'üne karşılık gelmektedir. THSD7A, podositler tarafından eksprese edilen 250 kDa'luk bir glikoproteindir. THSD7A da PLA2R gibi, baskın olarak IgG4 antikor yanıtını tetikleyen bir transmembran glikoproteindir (6) (Şekil 2).



Şekil 2. PLA2R ve THD7A özellikleri (6)

Anti-THSD7A ve anti-PLA2R antikorları ile gelişen MN vakaları, PMN vakalarının yaklaşık olarak %75-85'ini oluşturur. Vakaların geri kalan %15-25'lik kısmının ise henüz tanımlanmayan farklı otoantijenleri içerebildiği düşünülmektedir (8).

MN, glomerüler filtrasyon bariyerinin subepitelyal boşluğunda immün komplekslerin birikimi ile karakterizedir. Uzun süredir yapılan çalışmalarda MN'nin gelişiminde etkili olan mekanizmalar araştırılmaktadır ama net bir sonuca varılamamıştır. Özellikle immün tolerans kaybı, kompleman aktivasyonu, IgG4 yönüne doğru immünitinin kaymasının nedenleri araştırılmaktadır. PMN, subepitelyal aralıkta PLA2R ve THSD7A antijenlerine karşı IgG4 temelli otoantikorların birikimiyle karakterizedir (Şekil 3). SMN ise, başka bir hastalık varlığında gelişen (örn. Sistemik lupus eritematozus (SLE) gibi) MN olarak tanımlanmıştır. SMN'de IgG1 ve IgG3 temelli antikorlar daha sık saptanır (9).

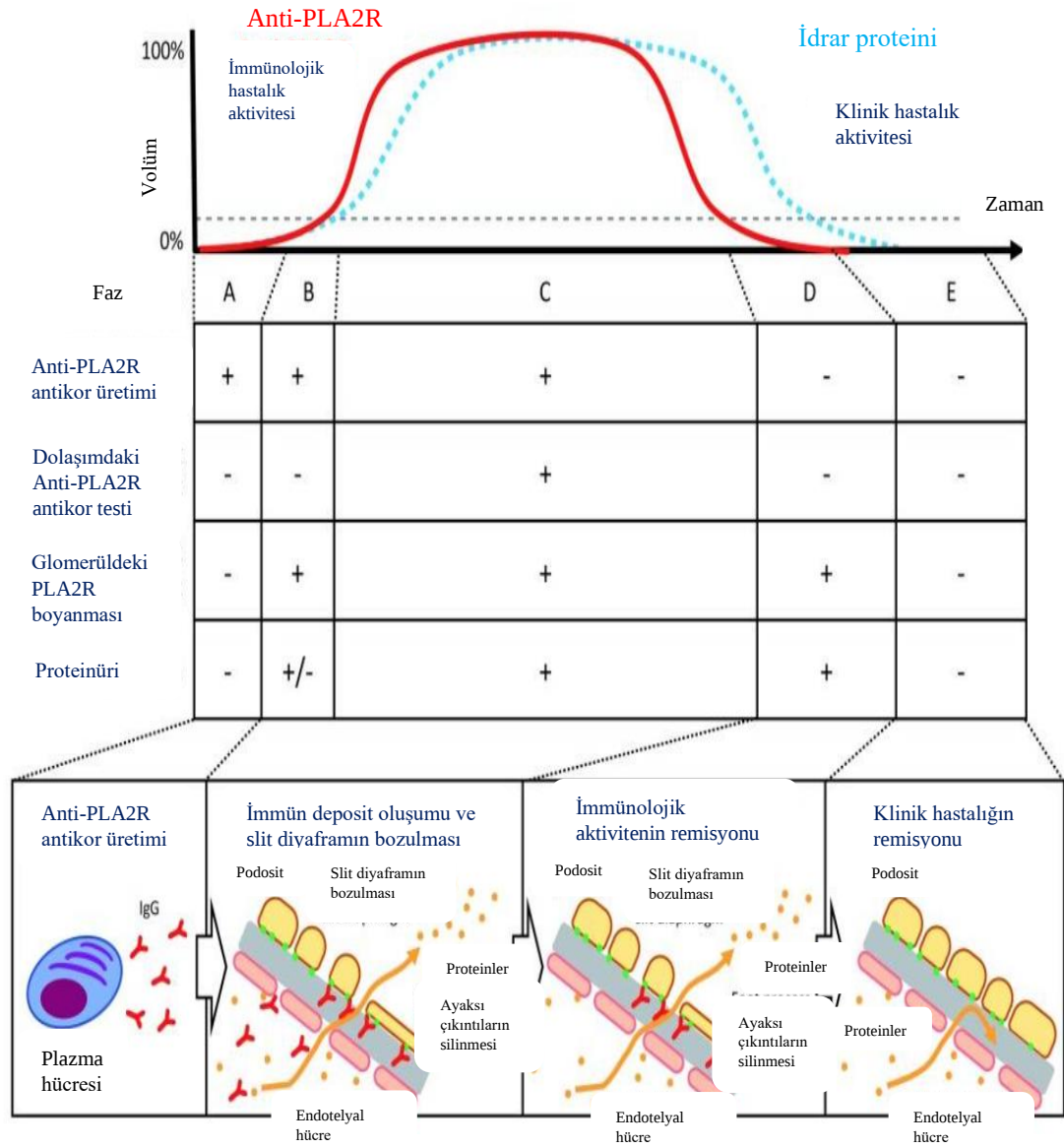


Şekil 3. PMN'nin gelişimine neden olan mekanizma (9)

Not: Glomerüler bazal membran (GBM), kompleman 5b-9 (C5b-9), immünoglobulin G (IgG), transforming growth factor beta (TGFβ), matrix metalloproteinase 9 (MMP9).

Şekil 3a'da podozit hücrelerinde eksprese edilen PLA2R ve THSD7A antijenleri gösterilmiştir. Şekil 3b'de ise, PMN hastalıklarında PLA2R ve THSD7A'ya karşı dolaşımda antikorlar oluştuğunda, subepitelyal aralıktaki antijenlere bağlanarak oluşturdukları antijen-antikor kompleksleri gösterilmiştir. Şekil 3a'nın altındaki görüntü, anti-PLA2R antikoru pozitif MN'li bir hastadan alınan böbrek biyopsisi örneğinde, IgG için immünohistokimyasal boyamasını gösterir. Şekil 3b'nin altındaki elektron mikroskopi görüntüsü ise subepitelyal aralıkta immün kompleks birikimini gösterir. Şekil 3c'de immün kompleks birikimlerinin kompleman aktivasyonuna yol açması gösterilmiştir. Şekil 3c'nin altındaki görüntü, anti-PLA2R antikoru pozitif MN'li bir hastadan alınan böbrek biyopsisinde, C5b-9 (Membran Atak Kompleksi) için immünohistokimyasal boya ile boyanmasını gösterir. Tüm bunların sonucunda, Şekil 3d'nin altındaki elektron mikroskobu görüntüsünde ise gösterildiği gibi glomerüler

bazal membran (GBM) kalınlaşması gerçekleşir. Glomerüler filtrasyon bariyeri bozulup idrarda protein kaçağı başlar.



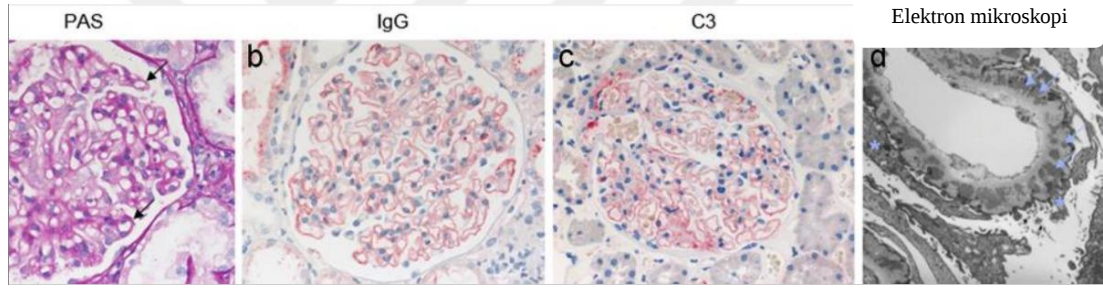
Şekil 4. PLA2R ile ilişkili MN'de otoantikor kaynaklı oluşan patogenezin şeması (6)

PLA2R ile ilişkili MN'de, plazma hücreleri PLA2R'ye karşı antikor üretmeye başlar (Faz A). Daha sonra bu antikorlar podositlere bağlanır ve proteinüri gelişir. Bu aşamada dolaşımda hiç antikor bulunmaz veya yalnızca düşük seviyelerde antikor tespit edilir (Faz B). Proteinüri artmaya başlar ve serumda antikorlar saptanır seviyeye ulaşır (Faz C). Hastalık gerilemeye başladıktan sonra ise antikor üretimi durur ve antikor glomerüllerden değil dolaşımdan kaybolur (Faz D). Podosit hasarı düzelir ve remisyon fazında proteinüri saptanmaz (Faz E) (Şekil 4).

2.1.3. Histopatoloji

MN'nin tanısında standart tanı böbrek biyopsisi ile konulur. “2021 Kidney Disease: Improving Global Outcomes” klavuzunda son çalışmalar ışığında, MN tanısı ile uyumlu klinik ve serolojik prezentasyona sahip hastalarda tanıyı doğrulamak için böbrek biyopsisinin gerekmebileceği belirtilmiştir (10).

MN, ışık mikroskopisinde glomerüler kapiller duvarının diffüz kalınlaşması olarak görüntü verir. Hastalığın ilk evrelerinde bu görüntü belirgin değildir. Zamanla GBM'da birikimde bir artış olur ve gümüş metaminle iyi boyanan dikensi çıkıntılar oluşur. İmmünohistokimyasal boyalar ise Ig'ler ve kompleman bileşenleri için bir pozitiflik verir. Elektron mikroskopisinde ise subepitelyal kısımda, GBM'ın dış kısmında dens deposit birikimi ve podositlerin ayakları çıkıntılarında silinme belirgindir (Şekil 5) (5, 11, 12).



Şekil 5. MN'li hastada morfolojik bulgular (11)

Not: Periyodik asit-Schiff (PAS), immünooglobulin G (IgG), kompleman 3 (C3).

Şekil 5a'da kalınlaşmış GBM, Şekil 5b-c'de ise immünohistokimyasal boyama sonucunda antikorların ve C3'ün birikimi gösterilmiştir. Şekil 5d, GBM'nın subepitelyal kısmında podosit ayakları uzantılarının silinmesi ile dens depositleri olan kalınlaşmış bir GBM elektron mikroskopi görüntüsü bulunmaktadır.

2.1.4. Etiyoloji

Erişkin yaştaki MN'li hastaların yaklaşık %75 kadarı primer (idiyopatik) olarak kabul edilmektedir. MN hastalarını, primer ve sekonder olarak klinikte ayırmak zordur. Hastanın dolaşımında oluşan anti-PLA2R ve/veya anti-THSD7A antikorları gösterildiğinde, o hastalar PMN yönünde değerlendirilir. Hastalığın sebepleri

belirlenip daha sonra belirlenen bu sebepler ortadan kalktığında nefrotik sendrom tablosu düzelirse, o hastalar SMN olarak kabul edilir (12-14).

Tablo 1. PMN'nin başlıca nedenleri (13, 15)

Primer Membranöz Nefropati
PLA2R veya THSD7A antijenlerine karşı oluşan antikorlar
İdiopatik (tanımlanmayan antijene karşı oluşan antikorlar)

Tablo 2. SMN'nin başlıca nedenleri (13-15)

Sekonder Membranöz Nefropati
Otoimmün hastalıklar: SLE (Sınıf V), tip 1 diabetes mellitus, romatoid artrit, Hashimoto hastalığı, anti-glomerül bazal membran hastalığı, Sjögren sendromu, ANCA-pozitif vaskülitler gibi otoimmün hastalıklar, psoriasis, IgG4 ile ilişkili hastalık
İnfeksiyonlar: Hepatit B virüsü, hepatit C virüsü, HIV, sifiliz, malarya, lepra, tüberküloz
İlaçlar: NSAII, penisilamin, busilamin, altın tuzları, anti-TNF tedavisi, tiopronin, kaptopril, klopidoğrel, hidrokarbon
Malignite: akciğer, kolon, mide, meme, prostat, böbrek malignitleri, lösemiler, non-Hodgkin lenfoma
Böbrek tutulumlu monoklonal gamopati
Hematopoetik hücre nakli/GVHD
Böbrek nakli sonrası rekürren MN
Sarkoidoz (nadir)

Not: Anti-nötrofil sitoplazmik antikor (ANCA), human immuno deficiency virüs (HIV), non-steroidal antiinflatuar ilaçlar (NSAII), tümör nekroz faktör (TNF), graft-versus-host disease (GVHD).

Tablo 3. Nefrotik sendromun MN dışı nedenleri (16,17)

Membranöz Nefropati Dışı Nefrotik Sendromlar	
Minimal Değişiklik Hastalığı	Diyabetik Nefropati
Fokal Segmental Glomerüloskleroz	Amiloidoz
Membranoproliferatif Glomerülonefrit	Sistemik Lupus Eritematozus

2.1.5. Primer membranöz nefropati

PMN, podositlerdeki antijenlere karşı oluşan antikorların sebep olduğu nefrotik bir hastalıktır (12). PMN hastalarında, ödem, hipoalbüminüri, hiperlipidemi ve nefrotik düzeyde proteinüri ($>3,5$ g/gün) en sık görülen klinik belirtilerdir (15). PMN hastalarında, PLA2R ve/veya THSD7A antijenlerine karşı antikorlar saptanması tanıya yardımcı olur (13). Anti-THSD7A ve anti-PLA2R antikorları ile gelişen MN vakaları, PMN'nin büyük bir yüzdesini oluşturur. MN hastalarında, yeni antijenler ile ilgili çalışmalar devam etmektedir (11).

2.1.6. Sekonder membranöz nefropati

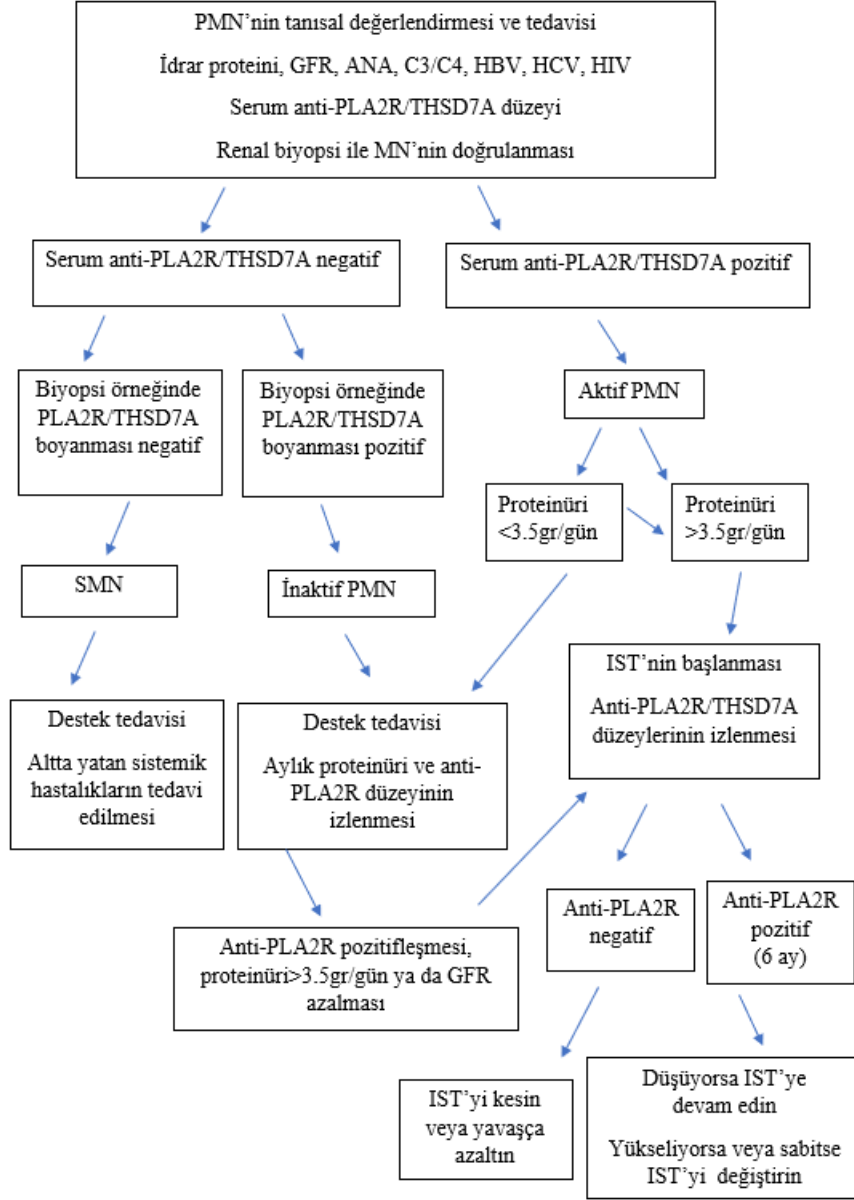
SMN, MN tablosuna sebep olan bir etiyolojinin bulunduğu nefrotik bir hastalıktır (13). SMN hastalarında klinik tablo, PMN hastaları ile benzerdir ancak tedavi farklı olabilir. Bu yüzden ayırıcı tanı kritik öneme sahiptir. Dolaşımdaki antikorların saptanması ve böbrek biyopsisinin analizi, tanının belirlenmesine yardımcı eder. SMN'ye sebep olan patolojik olayların tanımlanması önemlidir çünkü etiyolojik faktörlerin ortadan kaldırılması hastalığın remisyonunu ya da tedavisini sağlayabilir. SMN'nin etiyolojisinde özellikle viral enfeksiyonlardan, hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu yaygın görülür. İlaç maruziyetine bağlı, SMN hastalığı da nadir değildir. Otoimmün hastalıklar görüldüğünde, SMN her zaman akla getirilmelidir. Malignitelerle de, SMN hastalığının nedensel ilişkisi araştırılmalıdır (14).

2.1.7. Epidemiyoloji

MN, yetişkinlerde nefrotik sendromun en sık sebebidir. Özellikle beyaz ırk, erkek cinsiyet ve 40-60 yaşlarındaki hastalarda daha sıklıkla görülür. Pediyatrik yaş grubunda ise nefrotik sendromlu hastaların yaklaşık %5'inde böbrek biyopsisinde MN görülür ve genelde diğer hastalıklarla (Örneğin; HBV, SLE, malignite, ilaç toksisitesi) ile ilişkilidir. Yıllık MN insidansı Kuzey Amerika'da milyonda 10-12, Avrupa'da ise milyonda 2-17 arasındadır (1,15,18).

2.1.8. Tanı

Nefrotik sendromun bulguları proteinüri, hipoalbuminemi ve ödem olarak bilinmektedir. Yetişkin hastalar bu bulgular ile geliyorsa, MN düşünülmelidir (13).



Şekil 6. PMN için tanı ve tedavi algoritması (15)

Not: Glomerüler filtrasyon hızı (GFR), anti nükleer antikor (ANA), kompleman 3/4 (C3/4), hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV), human immuno deficiency virüs (HIV), immünosüpresif tedavi (IST).

MN teşhisinde böbrek biyopsisinin gerekli olduğu bilinen bir gerçektir. Yapılan çalışmalarda, anti-PLA2R antikorlarını gösteren serolojik testlerin özgül

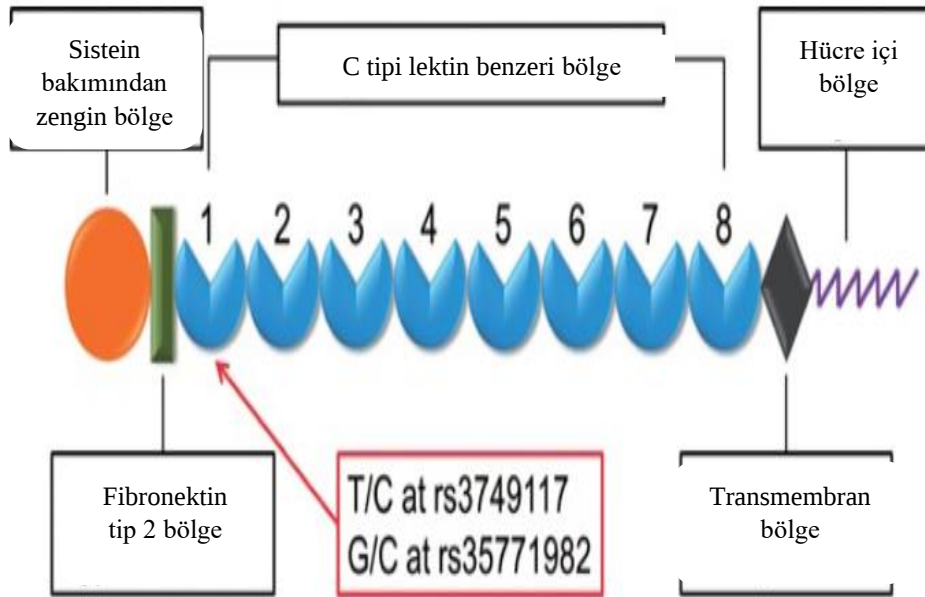
olduğu bildirilmiştir. Böbrek biyopsisi yapılması için kontrendikasyonlar varsa, serolojik testler ile MN tanısına yaklaşılabılır (15,19,20). Anti-PLA2R antikor pozitifliği son zamanlarda MN tanısında çok önem kazanmıştır (1,2).

Yapılan çalışmalarda, MN dışı nefrotik sendromlu hastalarda anti-PLA2R antikoru pozitifliği görülmediğinden, tanıda anti-PLA2R antikor pozitifliği nefrotik sendromun diğer sebeplerini (Minimal değişim hastalığı (MDH), fokal segmental glomerüloskleroz (FSGS), membranoproliferatif glomerülonefrit (MPGN) gibi) dışlamamızı sağlar (21-23).

2.2. Fosfolipaz A2 reseptör otoantikoru

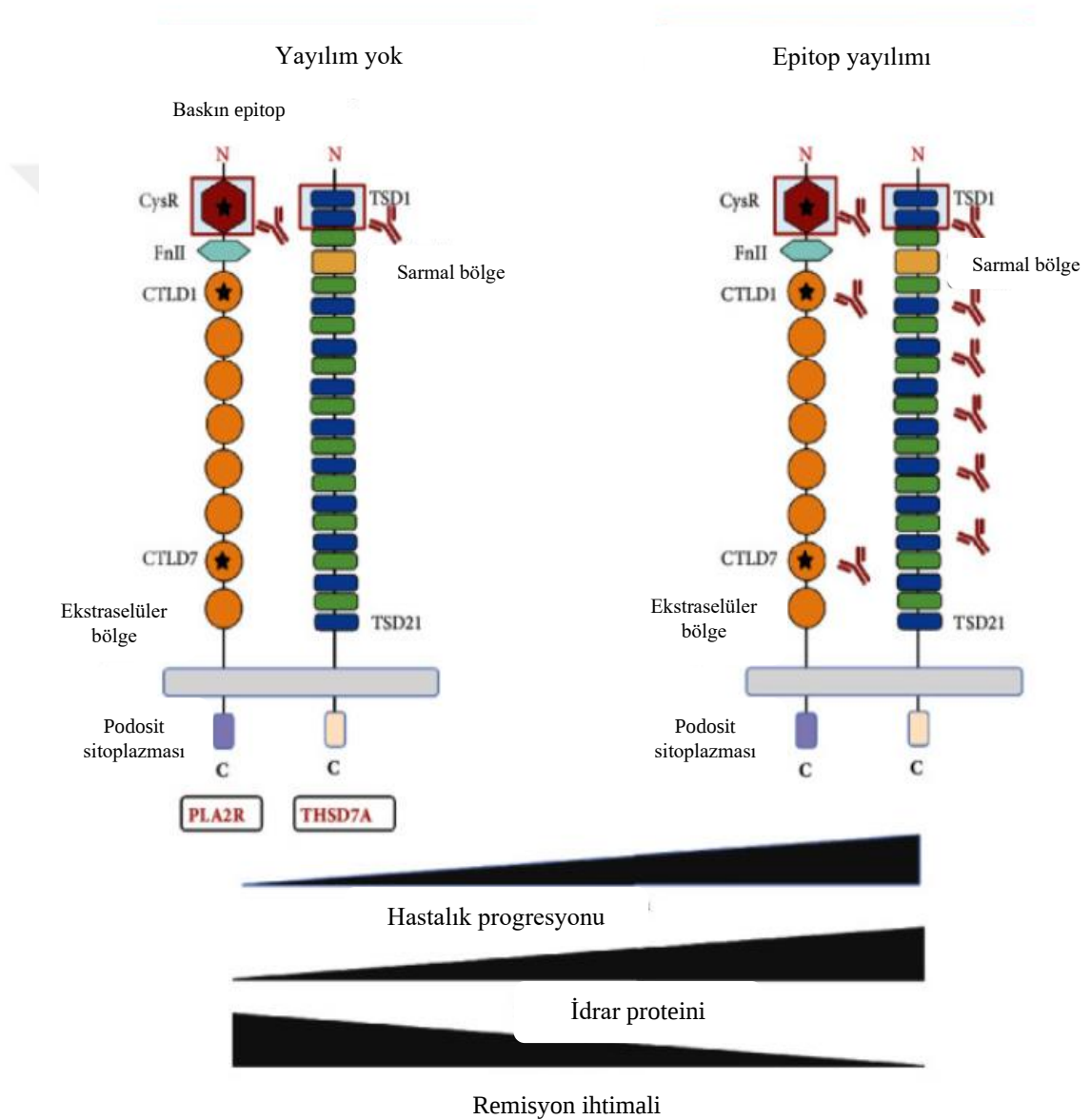
PLA2R, PMN'de keşfedilen ilk antijendir. On farklı bölgeden oluşur, sitoplazmik alanı kısa, hücre dışı kısmı ise daha geniş olan PLA2R, C-tipi lektin ailesinden bir proteindir (24,25).

PLA2R, bir N-terminal sistein bakımından zengin bölge (CysR), bir fibronectin tip II (FNII) bölge, sekiz C tipi lektin benzeri bölge (CTLD), transmembran bölge ve kısa bir hücre içi C terminali kuyruğundan oluşan membran reseptörüdür (Şekil 7) (25-27).



Şekil 7. PLA2R'nin şematik gösterimi (25)

Anti-PLA2R antikorları tarafından tanınan üç farklı bölgedeki epitoplar tanımlanmıştır; CysR, CTLD1 ve CTLD7. Yapılan bir çalışmada hastalığın, CysR'ye karşı anti-PLA2R antikoru aktivitesine sahip hastalarda, CTLD1 ve CTLD7'ye karşı anti-PLA2R antikoru aktivitesi olan hastalara kıyasla daha iyi prognozla seyrettiği gösterilmiştir. Primer baskın epitopun CysR olduğu varsayılmaktadır (Şekil 8) (28, 29).



Şekil 8. PLA2R ve THSD7A'nın epitoplarının şematik gösterimi (29)

PLA2R'nin podositte hangi rolde görev aldığı tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmalarda reseptörün fibroblastlarda replikatif yaşlanmayı sağladığı, ayrıca memeli epitelinde tümör baskılayıcı olarak görev yaptığı iddia edilmiştir (30, 31).

İlk olarak Beck ve arkadaşları (32) tarafından, Western Blot (WB) yöntemi ile anti-PLA2R antikoru saptanmıştır. Ancak bu yöntem rutinde çok sayıda numune çalışan laboratuvarlar için uygun değildir. Bu zorlukların üstesinden gelebilmek için HEK293 hücreleri kullanılarak anti-PLA2R antikorunu ölçmek için IFT'i geliştirilmiştir. Hofstra ve arkadaşları (32) ise antikor konsantrasyonunu belirleyebilmek için in-house ELISA testini geliştirmişlerdir. Daha sonrada aynı prensip kullanılarak ticari ELISA testleri geliştirilmiştir. MN'li hastaların tanısında, indirekt immünfloresans antikor ve ELISA testleri yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (32).

MN'de standart tanının böbrek biyopsisi ile konulduğu bilinmektedir. Ancak biyopsi girişimsel, maliyetli ve kendine özgü riskleri olan bir işlemdir. Yapılan meta-analiz çalışması sonucunda, biyopsi sonrasında transfüzyona ihtiyaç oranı %0,9 olarak belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada da üçüncü derece kanama oranı %0,3 ve ölüm riski %0,02 olarak bildirilmiştir. Ayrıca bu hastaların duruma göre 8-24 saat gözlenme ihtiyaçları vardır (32-34).

Literatürde, PMN'li hastalarda anti-PLA2R antikorlarının tanısallığı doğru olduğu değişkendir. Çalışılan populasyonlarda receiver operating characteristic (ROC) eğrisi analizine göre uygun eşik değerin belirlenmesi ile testin duyarlılığı artmaktadır (35-37). Anti-PLA2R antikor ölçümleri için rutinde en sık kullanılan ELISA testi olarak bilinir. Laboratuvarlarda daha çok numune çalışılabilirdiği, objektif ve kantitatif sonuç elde edildiği için uygun bir testtir (19, 38, 39).

MN hastalığı için anti-PLA2R antikorunun özgüllüğü çok yüksektir (40). Anti-PLA2R antikorları, diğer böbrek veya sistemik hastalıkları olan hastalarda veya sağlıklı bireylerde gösterilememiştir. Son yıllarda, anti-PLA2R antikorunun kullanılmaya başlanması, renal ven trombozu veya akciğer embolisi gibi antikoagülan tedavi gerektiren yaşamı tehdit eden komplikasyonları olan veya yaşlı hastalarda biyopsinin yapılmasına gerek kalmayacağı düşüncesini ön plana çıkarmıştır (19, 41, 42).

Yapılan çalışmalarda, PLA2R antijeni ve anti-PLA2R antikorları birlikte değerlendirildiğinde, pozitiflik oranlarının birbirlerinden farklı olduğu bildirilmiştir. Anti-PLA2R antikorları, düşük olabilir veya saptanamayabilir ve daha sonra serokonversiyon meydana gelebilir (43-46).

PMN ve SMN hastalarının ayırıcı tanısında anti-PLA2R antikoru klinik açıdan önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda SMN hastalarında da, anti-PLA2R antikoru sonucunun tanıda önemli olduğu belirtilmiştir (47-50).

Yapılan çalışmalar ışığında, serum anti-PLA2R antikor seviyelerinin hastalığın ilerleme riskini düşük, orta ve yüksek olarak sınıflandırmada kullanılabileceği düşünülmektedir. Bu sınıflandırma, immünsupresif tedavinin (IST) gerekliliği ya da destekleyici tedavi verilmesi konusunda yol gösterici olacaktır. Serum anti-PLA2R antikor seviyeleri hem MN'nin prognozunu hem de tedavisini belirleme de faydalıdır (39).

Anti-PLA2R antikor titresinin seri ölçümü, IST'si için bir kılavuz görevi görür. Anti-PLA2R antikor düzeyinde 6 aylık takipte %90'dan fazla azalma görülmesi IST'sinin kesilmesine; %50-90 azalma IST'sine devam edilmesine; %50'den az azalma ise modifiye IST kullanılmasına delalet eder (19).

Tablo 4. MN'nin prognozunu ve tedavisini belirlemede yararlı belirteçler (39)

	İLERLEME RİSKİ		
	Düşük	Orta	Yüksek
	3 ila 6 aylık bir gözlem süresi boyunca 3 kriterden en az 2'si mevcut olmalıdır:		
Böbrek fonksiyonu	Gözlem süresi boyunca normal veya kararlı (<%25 azalma) eGFR	Gözlem süresi boyunca normal veya kararlı (<%25 azalma) eGFR	Gözlem süresi boyunca herhangi bir zamanda başka nedenlerle açıklanmayan eGFR'de $\geq$ %25 azalma
Proteinüri	Gözlem süresinin sonunda <4 g/gün	Gözlem süresinin sonunda 4 ile 8 g/gün arasında	Gözlem süresinin sonunda >8 g/gün veya persistan nefrotik sendrom
Serum anti-PLA2R antikor seviyeleri (sadece anti-PLA2R antikor pozitif MN'li hastalarda)	Seri titreler sürekli olarak düşüktür (ELISA ile <50 RU/mL olarak tanımlanır) veya gözlem süresi boyunca $\geq$ %25 azalır.	Seri titreler <150 RU/mL ve sabit veya <%25 artar.	Seri titreler yüksek (ELISA yöntemiyle $\geq$ 150 RU/mL olarak tanımlanır) ve düşmez veya $\geq$ 150 RU/mL'ye yükselir.
Tedavi	IST'ye ihtiyaç duymazlar ve genellikle sadece destekleyici önlemlerle tedavi edilebilirler.	IST ile tedavi gerektirebilir veya gerektirmeyebilir. Yaklaşımımız, ilk 3-6 aylık gözlem döneminde hastalığın seyrine bağlı olarak değişir.	IST başlanmalıdır. (kontrendikasyon yoksa)

Not: İmmünosüpresif tedavi (IST), tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR).

Hoxha ve arkadaşlarının (51) yaptığı çalışmada, hastaların klinik remisyona ulaşması için geçen süre ve hastalık aktivitesi arasında anti-PLA2R antikor seviyeleri ile bağlantı bulunmuştur. PMN'li hastalarda, anti-PLA2R antikor seviyelerindeki azalmanın, proteinüri düzeyinde iyileşme ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Serum anti-PLA2R antikorlarındaki değişikliklerin, proteinüri düzeyindeki değişikliklerden önce görülebilmesi; hastanın tedaviye yanıtını değerlendirmede faydalı bir araç olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (51-55).

Doğrulanmış anti-PLA2R antikoru ile ilişkili MN'li hastalarda, antikor titresinin seri izlenmesi bilgilendiricidir. Anti-PLA2R antikorunun kalıcı olması veya kaybolduktan sonra yeniden ortaya çıkması, hastalığın tekrarlaması ile sıkı bir şekilde ilişkili bulunmuştur (56-59).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik kurul onayı

Tez çalışmasına dair etik kurul onayı, KTÜ Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 30.06.2022 tarihli 2022/120 karar nolu mikrobiyoloji çalışması olarak verildi. Etik kurul onayı EK-1’de belirtildi.

3.2. Çalışmanın özellikleri

Bu çalışma, kesitsel bir çalışma olarak planlanmış olup, KTÜ Tıp Fakültesi Nefroloji bölümünde Haziran 2022-Haziran 2023 tarihleri arasında teşhis ve takipleri yapılan, 74 erişkin hasta ve 15 sağlıklı erişkin gönüllü çalışmaya dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilenlerden bir tüp periferik kan örneği alındı. Alınan örnekten anti-PLA2R antikor düzeyine, iki farklı ELISA kiti ile bakıldı.

Hastaların klinik biyokimya test sonuçları, hastane bilgi yönetim sisteminden (HBYS) takip edildi. İdrar total protein, idrar kreatinin, idrar albümin, glikoz, kreatinin, albümin, blood urea nitrogen (BUN), tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), alanin aminotransferaz (ALT), kolesterol, trigliserit, total kalsiyum, potasyum, sodyum, hemoglobin, hematokrit değerleri alındı. 24 saatlik idrar örnekleri, proteinüri düzeylerini hesaplamak için kullanıldı. Çıkan proteinüri düzeyine göre <3,5 gr/gün ve >3,5 gr/gün olmak üzere hastalar iki gruba ayrıldı.

3.2.1. Çalışmaya dahil edilen gruplar

Sekonder nedenler dışlanmış olup patolojik biyopsi sonucu PMN tanısı konulan 30 hasta, SMN tanısı konulan 10 hasta (lupusa bağlı, anti-nötrofil sitoplazmik antikor (ANCA) vaskülitine bağlı), MN olmayan nefrotik sendrom tanısı konulan 34 hasta (MPGN-FSGS-MDH-IgA nefropatisi) ve 15 sağlıklı gönüllü çalışmaya dahil edildi.

3.2.2. Çalışmaya kabul edilme/edilmeme ölçütleri

Araştırmaya kabul edilme ölçütleri:

- ✓ Çalışmaya katılmaya gönüllü olması

- ✓ 18-65 yaş aralığında olması
- ✓ PMN tanısı konulan hastaların, sekonder sebeplerin dışlanmış olması ve patolojik biyopsi sonucunun PMN tanısı ile uyumlu olması
- ✓ SMN tanısı konulan hastaların, patolojik biyopsi sonucunun PMN tanısı ile uyumlu olmaması ve ikincil bir nedene bağlı olması
- ✓ MN olmayan nefrotik sendrom tanısı konulan hastaların, patolojik biyopsi sonucunun nefrotik sendrom tanısı ile uyumlu olması

Araştırmaya kabul edilmeme ölçütleri:

- ✓ Çalışmaya katılmaya gönüllü olmaması
- ✓ 18 yaştan küçük veya 65 yaştan büyük olması

3.3. Örneklerin toplanması-saklanması-stoklanması

KTÜ Nefroloji bölümünde hastalar ve sağlıklı gönüllüler çalışmanın süreci hakkında bilgilendirildi ve bilgilendirilmiş gönüllü onam formu alınanlardan serum örnekleri toplandı.

Alınan periferal kan örneklerine, sırasıyla numaralar verilerek, excel dosyasına dosya numaraları, demografik bilgileri ve klinik biyokimya test sonuçları ile kaydedildi. Periferal kan örnekleri, mikrobiyoloji laboratuvarında santrifüj edildi.

Toplanan örnekler en az üç alikot olacak şekilde paylaştırıldı. Santrifüj tüplerine, 300 µL serum otomatik pipet ile pipetlendi. Çalışma gününe kadar -80°C’de buzdolabında saklandı.

3.4. Örnekleri çalışma yöntemi

Serum anti-PLA2R antikor düzeyleri, üretici firmaların önerileri doğrultusunda, ticari ELISA kitleri olan, Anti-PLA2R ELISA (IgG), Euroimmun kiti (Lübeck, Almanya) ve Human Anti-Phospholipase Receptor A2 IgG Antibody (Anti-PLA2R) ELISA, MyBioSource kiti (San Diego, California (CA), ABD) ile değerlendirildi.

3.5. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya)

Çalışma zamanı gelince, dondurularak saklanmış hasta ve sağlıklı gönüllülerden alınmış serumlar oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Saklanan serumlardan ayrılan alikotlar, Euroimmun (Lübeck, Almanya) kiti ile anti-PLA2R antikoru düzeyine bakmak üzere kullanıldı.

3.5.1. Test prensibi

Euroimmun ELISA test kiti, serum veya plazmada PLA2R'ye karşı IgG sınıfı otoantikörleri saptayan, yarı kantitatif veya kantitatif bir in vitro testtir. Test kiti, her biri PLA2R ile kaplanmış 8 break-off reaktif kuyucuğuna sahip mikrotitre şeritleri içerir. İlk reaksiyon adımında, dilüe edilmiş hasta serumları kuyucuklarda inkübe edilir. Pozitif örneklerde, spesifik IgG antikörleri antijenlere bağlanır. Bağlanan antikörleri saptamak için, bir renk reaksiyonunu katalize eden enzim işaretli anti-insan IgG (enzim konjugat) kullanılarak ikinci bir inkübasyon gerçekleştirilir.

3.5.2. Test kitinin içeriği

- 1) Antijenle kaplı mikropleyt kuyucukları (96 kuyucuklu)
- 2) Kalibratörler
- 3) Kontroller
- 4) Konjugat peroksidaz işaretli anti-insan IgG (tavşan)
- 5) Örnek tamponu
- 6) Yıkama tamponu
- 7) Kromojen/substrat solüsyonu
- 8) Durdurma (stop) solüsyonu
- 9) Test talimat kitapçığı
- 10) Kalite kontrol sertifikaları

3.5.3. Kit dışında kullanılan malzemeler

- 1) ELISA okuyucu ve inkübatör (Versamax, Molecular Devices, USA)
- 2) Otomatik pipet ve pipet uçları
- 3) Distile su

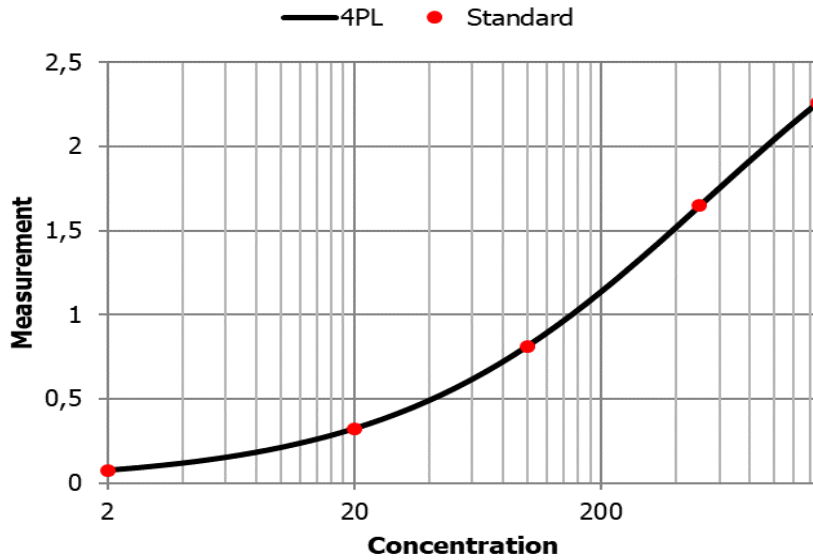
3.5.4. Anti-PLA2R IgG ELISA çalışma basamakları

- 1) Tüm reaktifler, çalışmaya başlanılmadan 30 dakika öncesinde, oda sıcaklığına (+18°C ile +25°C) getirildi. Kullanmadan önce reaktifler iyice karıştırıldı.
- 2) Hasta örnekleri, örnek tamponunda 1:101 oranında dilüe edildi ve vorteks ile iyice karıştırıldı. 10 kat konsantre yıkama solüsyonu, 540 ml distile su ile sulandırıldı.
- 3) Örnek inkübasyonu: Pipetleme protokolüne göre 100 µl'şer kalibratörler, kontroller ve dilüe hasta serumları ile sağlıklı kontrol serumlarından kuyucuklara transfer edildi. Oda sıcaklığında (18-25 °C) 30 dakika inkübe edildi.
- 4) Yıkama: Otomatik cihazda (Hydroflex washer, Tecan, Switzerland), 450 µl yıkama solüsyonu kullanılarak reaktif kuyucukları üçer kere yıkandı. Yıkama solüsyonu, her yıkama döngüsü başına 30 ila 60 saniye boyunca kuyucuklarda bırakıldı, ardından kuyucuklar boşaltıldı. Yıkandıktan sonra, tüm kalan yıkama solüsyonunu çıkarmak için açıklıkları aşağı bakacak şekilde emici kağıt üzerine vurularak mikropleytteki tüm sıvı iyice atıldı.
- 5) Konjugat inkübasyonu: 100 µl konjugat enzimi (anti-insan IgG) her kuyucuğa transfer edildi. Oda sıcaklığında (18-25°C) 30 dakika inkübasyonda bekletildi.
- 6) Yıkama: Otomatik cihazda (Hydroflex washer, Tecan, Switzerland), 450 µl yıkama solüsyonu kullanılarak reaktif kuyucukları üçer kere yıkandı. Yıkama solüsyonu, her yıkama döngüsü başına 30 ila 60 saniye boyunca kuyucuklarda bırakıldı, ardından kuyucuklar boşaltıldı. Yıkandıktan sonra, tüm kalan yıkama solüsyonunu çıkarmak için açıklıkları aşağı bakacak şekilde emici kağıt üzerine vurularak mikropleytteki tüm sıvı iyice atıldı.
- 7) Substrat inkübasyonu: 100 µl kromojen/substrat solüsyonu her kuyucuğa transfer edildi. Oda sıcaklığında (18-25°C) 15 dakika inkübe edildi. Direkt güneş ışığından korundu.
- 8) Reaksiyonu durdurma: 100 µl stop solüsyonu, aynı anda ve aynı hızda her kuyucuğa transfer edildi.
- 9) Ölçüm: Renk yoğunluğunun fotometrik ölçümü, durdurma (stop) solüsyonunun eklenmesinden sonraki 30 dakika içinde mikropleyt okuyucuda (Versamax, Molecular Devices, USA) 450 nm dalga boyunda yapıldı.

Ölçümden önce, solüsyonun homojen dağılımını sağlamak için mikropleyt hafifçe sallandı.

Sonuçların değerlendirilmesi: Anti-PLA2R ELISA Euroimmun (Lübeck, Almanya) kitinin birimi RU/ml'dir. Anti-PLA2R antikör pozitif ve negatif sonuçları, anti-PLA2R ELISA Euroimmun (Lübeck, Almanya) kitinden çıkan eşik değere göre belirlendi.

(<14 RU/ml: negatif, ≥ 14 ile <20 RU/ml: ara değer, ≥ 20 RU/ml: pozitif olarak değerlendirildi.)



Calibrator	Conc.	Well	Raw	Backfit	Recovery %
Standard1	2	A1	0,0736	1,983	99,13
Standard2	20	B1	0,324	20,1	100,5
Standard3	100	C1	0,812	99,78	99,78
Standard4	500	D1	1,65	500,5	100,1
Standard5	1500	E1	2,26	1499	99,96

Şekil 9. Anti-PLA2R antikoru için kalibrasyon eğrisi (Euroimmun (Lübeck, Almanya) anti-PLA2R ELISA kiti)

3.6. Anti-PLA2R IgG ELISA (Mybiosource, San Diego, California, ABD)

Çalışma zamanı gelince dondurularak saklanmış hasta ve sağlıklı gönüllülerden alınmış serumlar oda sıcaklığına gelinceye kadar bekletildi. Saklanan serumlardan ayrılan alikotlar, MyBioSource kiti (San Diego, CA, ABD) ile anti-PLA2R antikoru düzeyine bakmak üzere kullanıldı.

3.6.1. Test prensibi

Bu anti-PLA2R kiti, tanısal veya terapötik prosedürlerde kullanım için değil, yalnızca araştırma amaçlı kullanım içindir. Durdurma (stop) solüsyonu, rengi maviden sarıya değiştirir ve oluşan rengin yoğunluğu bir spektrofotometre kullanılarak 450 nm'de ölçülür. Numunedeki anti-PLA2R konsantrasyonunu ölçmek için, bu anti-PLA2R kitinde birkaç kalibrasyon standartı bulunmaktadır. Kalibrasyon standartları numunelerle aynı anda test edilir ve anti-PLA2R konsantrasyonuna karşı standart bir optik dansite (OD) eğrisi oluşturulur. Numunelerin OD'si standart eğri ile karşılaştırılarak, numunelerdeki anti-PLA2R konsantrasyonu belirlenir.

3.6.2. Test kitinin içeriği

- 1) Mikroelisa şerit plakası (96 kuyucuklu)
- 2) Standart (6 şişe)
- 3) Numune dilüenti
- 4) Horseradish peroxidase (HRP) konjugat reaktifi
- 5) 20X yıkama solüsyonu
- 6) Kromojen solüsyon A
- 7) Kromojen solüsyon B
- 8) Durdurma (stop) solüsyonu
- 9) Kapatma plakası
- 10) Kullanım kılavuzu
- 11) Mühürlü çanta

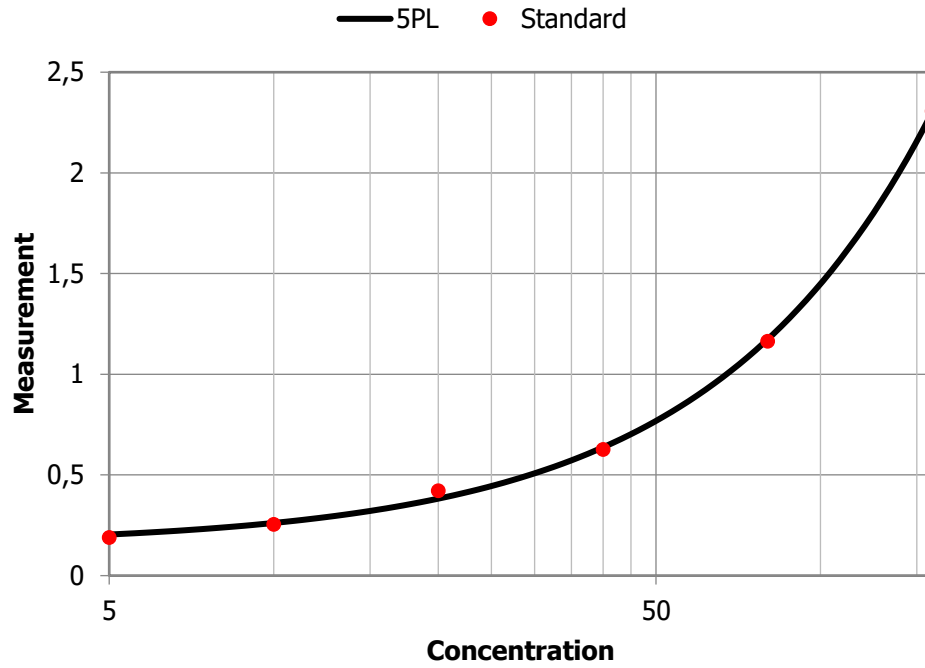
3.6.3. Kit dışında kullanılan malzemeler

- 1) Standart mikropleyt okuyucu (450nm) (Versamax, Molecular Devices, USA)
- 2) Hassas pipetler ve tek kullanımlık pipet uçları
- 3) 37 °C inkübatör (EN 120, Nüve, Türkiye)

3.6.4. Anti-PLA2R IgG ELISA çalışma basamakları

- 1) Tüm kit reaktifleri buzdolabından çıkarıldı ve oda sıcaklığına (20-25°C) ulaşmaları beklenildi.
- 2) 20 kat konsantre yıkama solüsyonu, 475 ml distile su ile sulandırıldı.
- 3) Çalışmaya başlamadan önce, tüm reaktifler yukarı aşağı döndürme hareketleri ile köpürtmeden karıştırıldı.
- 4) İlk olarak standartlar daha sonra hasta serumları ve sağlıklı gönüllülerin serumları, sulandırılmadan direkt olarak uygun kuyucuklara 50 µl pipetlendi.
- 5) Her kuyucuğa 100 µl HRP-konjugat reaktifi eklendi, yapışkan şeritle kapatıldı ve 37°C'de 60 dakika inkübe edildi.
- 6) Otomatik yıkayıcı (Hydroflex washer, Tecan, Switzerland) kullanılarak her kuyucuk, yıkama solüsyonu (400µl) ile 5 kere olacak şekilde yıkandı. Pleyt ters çevrildi ve temiz kağıt havlularla kurulandı.
- 7) Her bir kuyucuğa kromojen solüsyonu A 50µl ve kromojen solüsyonu B 50µl eklendi. Yavaşça karıştırıldı ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi. Işıktan korundu.
- 8) Her kuyucuğa 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi. Kuyuların rengi maviden sarıya değişti. Kuyulardaki renk yeşilse veya renk değişimi aynı biçimde görünmüyorsa, iyice karışmasını sağlamak için pleyte hafifçe vuruldu.
- 9) 15 dakika içinde bir mikropleyt okuyucu (Versamax, Molecular Devices, USA) kullanarak 450 nm'de OD'leri okundu.

Sonuçların değerlendirilmesi: Anti-PLA2R ELISA MyBioSource (San Diego, CA, ABD) kitinin birimi ng/ml'dir. MyBioSource (San Diego, CA, ABD) kiti için eşik değer belirtilmediği için, sadece konsantrasyon değerleri kullanıldı.



Calibrator	Conc.	Well	Raw	Backfit	Recovery %
● Standard1	5	A1	0,189	3,632	72,63
● Standard2	10	B1	0,254	9,393	93,93
● Standard3	20	C1	0,421	23,12	115,6
● Standard4	40	D1	0,626	39,18	97,95
● Standard5	80	E1	1,16	79,33	99,16
● Standard6	160	F1	2,31	160,2	100,1

Şekil 10. Anti-PLA2R antikoruna için kalibrasyon eğrisi (MyBioSource (San Diego, CA, ABD) anti-PLA2R ELISA kiti)

3.7. Verilerin İstatistiksel Analizi

İstatistiksel analizlerde SPSS (Statistical Package for the Social Science) 24.0 kullanıldı. Değerlendirme sonuçlarının tanımlayıcı istatistikleri; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için ortalama (mean), standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleri olarak verildi.

Normal dağılımı test etmek için Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan ölçümsel değişkenlerin analizinde karşılaştırılan

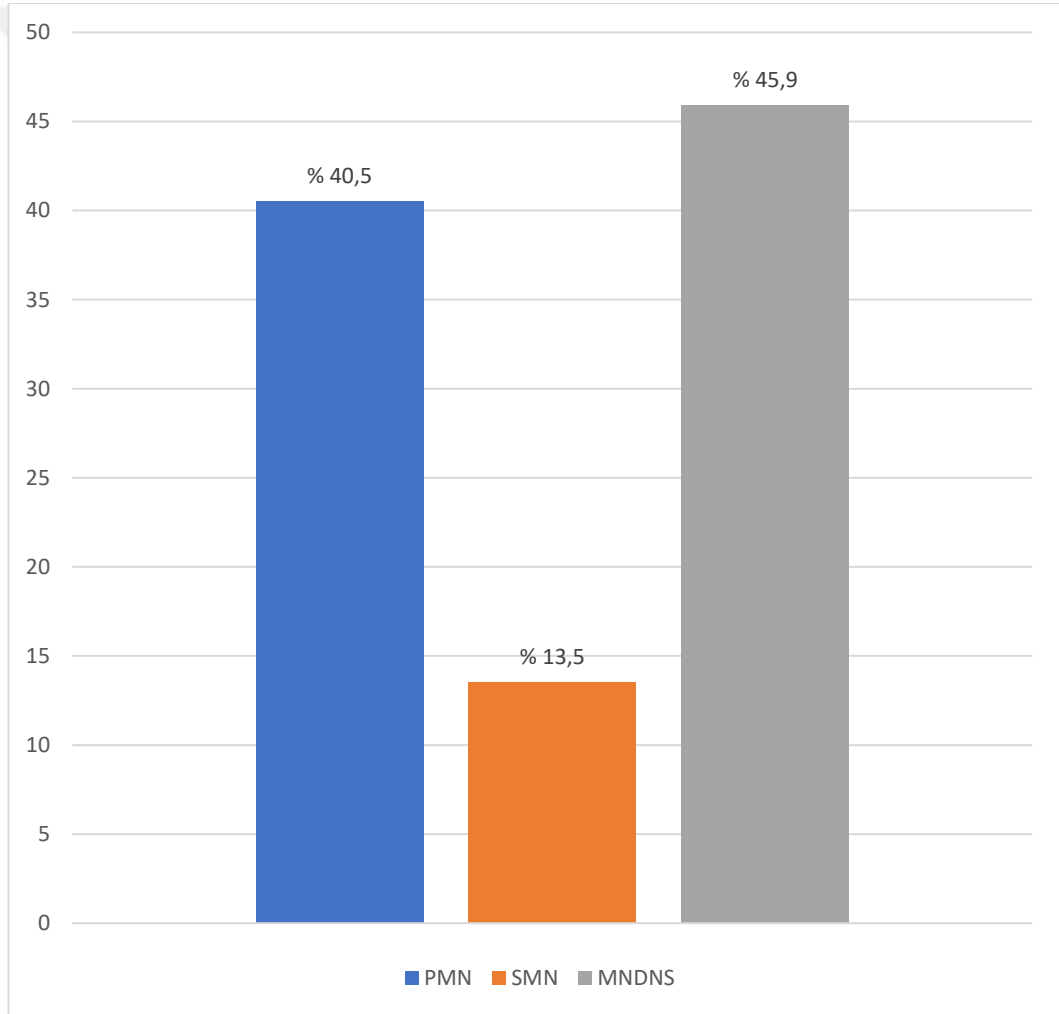
grup sayısı iki ise Mann Whitney U testi, üç ve daha fazla olanlarda Kruskal Wallis testi kullanıldı. Kategorik verilerin analizinde Pearson Ki-kare testi kullanıldı. Normal dağılıma uymayan sayısal değişkenler arasında korelasyon olup olmadığını değerlendirmek için Spearman korelasyon analizi yapıldı.

ELISA kitlerinin değerleri, PMN'yi öngörmede tanısal karar verdirici özellikleri ROC eğrisi analizi ile incelendi. Tüm istatistik analizlerinde, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4.BULGULAR

Çalışmamıza KTÜ Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalına başvuran nefrotik sendromu olan 74 erişkin hasta ve 15 sağlıklı erişkin gönüllü dahil edildi. Hastaların ortalama yaşı $44,1 \pm 12,7$ (21-65) 'ydi. PMN'li hastaların ortalama yaşı $46,9 \pm 11,6$; SMN'li hastaların ortalama yaşı $46,6 \pm 11,7$; MN dışı nefrotik sendromlu hastaların ortalama yaşı $41 \pm 13,5$ 'ti. Hastaların 34'ü (%45,9) kadın, 40'ı (%54,1) erkekti. Hastaların 30'u (%40,5) PMN, 10'u (%13,5) SMN, 34'ü (45,9) MN dışı nefrotik sendromlulardan oluşuyordu. Hastaların tanılarına göre dağılımı Şekil 11'de verildi.



Şekil 11. Hastaların tanılarına göre dağılımı

Not: Primer membranöz nefropati (PMN), sekonder membranöz nefropati (SMN), membranöz nefropati dışı nefrotik sendrom (MNDNS).

PMN hastalarının patoloji sonuçlarına bakıldığında, ışık mikroskopunda glomerüllerde GBM'nın diffüz olarak kalınlaşması; immünofloresan mikroskopide ise baskın olarak IgG immün kompleks birikimi saptandı.

Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinde çalışmaya alınan PMN hastalarının 9'unda anti-PLA2R antikoru pozitif; SMN, MN dışı nefrotik sendromlular ve sağlıklı gönüllülerin ise tümünde anti-PLA2R antikoru negatif bulundu. PMN'li hastalarının birinde, anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinde, anti-PLA2R antikor sonucu ara değerde bulundu (Tablo 5).

Tablo 5. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinde, hastaların ve sağlıklıların, anti-PLA2R antikoru pozitif ve negatif sonuçlarının yüzdesi

	Anti-PLA2R (+) (Euroimmun)	Anti-PLA2R (-) (Euroimmun)	Toplam Sayı
PMN	9 (%30)	20 (%67)	30 (%100)*
SMN	0 (%0)	10 (%100)	10 (%100)
MN dışı Nefrotik Sendrom	0 (%0)	34 (%100)	34 (%100)
Sağlıklılar	0 (%0)	15 (%100)	15 (%100)
Toplam	9 (%10)	79 (%89)	89 (%100)

* 30 PMN hastasının birinde, anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinde, anti-PLA2R antikor sonucu ara değerde bulundu.

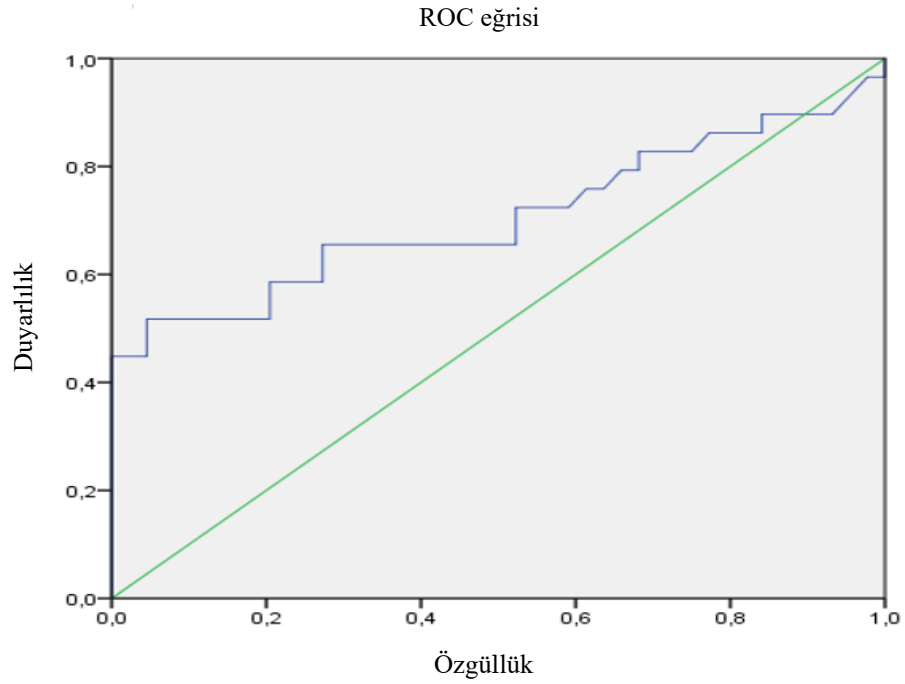
Çalıştığımız hastaların ve sağlıklı gönüllülerin iki kit içinde ayrı ayrı anti-PLA2R antikoru sonuçlarının ortalaması Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6. Hastaların ve sağlıklı gönüllülerin, çalışılan iki kit için, anti-PLA2R antikorunun ortalama değerleri

	<u>Euroimmun anti-PLA2R</u>	<u>Mybiosource anti-PLA2R</u>
	Ort±S.S.	Ort±S.S.
PMN	31,8±55,3	18,9±39,7
SMN	1,1±0,09	8±6
MN dışı Nefrotik Sendrom	1,1±0,1	10,1±14,1
Sağlıklılar	1,1±0,1	6,8±3,7

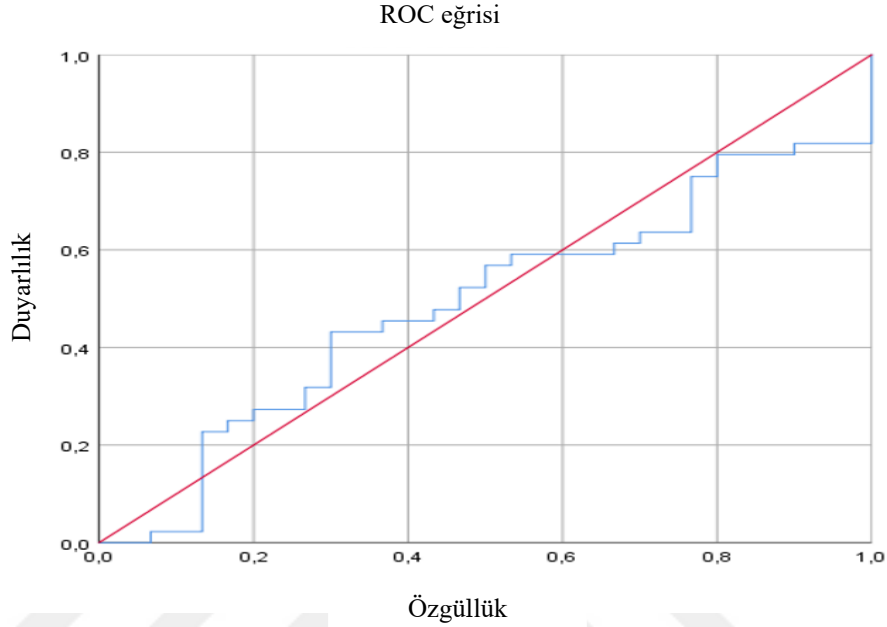
* Anti-PLA2R ELISA Euroimmun (Lübeck, Almanya) kitinin birimi RU/ml, anti-PLA2R ELISA Mybiosource (San Diego, CA, ABD) kitinin birimi ng/ml’ dir.

Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kiti ile serumların çalışılması ile elde edilen konsantrasyon değerleri bir eşik değer elde etmek için ROC eğrisi analizi ile incelendi (area under the curve=0,706 ve p=0,003). Buna göre eşik değer 1,19 RU/ml olarak bulundu (Şekil 12).



Şekil 12. Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kiti ROC eğrisi analizi

MyBioSource ELISA (San Diego, CA, ABD) kiti ile serumların çalışılması ile elde edilen konsantrasyon değerlerine yapılan ROC eğrisi analizinde (area under the curve=0,486 ve p=0,834) istatistiki anlamlı bir sonuç saptanamadı ve eşik değeri bulunamadı (Şekil 13).



Şekil 13. MyBioSource ELISA (San Diego, CA, ABD) kiti ROC eğrisi analizi

Referans yöntem olarak böbrek biyopsi bulguları kullanılarak, anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinin farklı eşik değerlerde duyarlılığı, özgüllüğü, pozitif prediktif değeri (ppd) ve negatif prediktif değeri (npd) hesaplandı (Tablo 7).

Tablo 7. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinin, farklı eşik değerlerde duyarlılığı, özgüllüğü, ppd ve npd'i

Eşik Değer	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
>40 RU/ml	%20	%100	%100	%64,7
>20 RU/ml	%30	%100	%100	%67,6
>14 RU/ml	%33,3	%100	%100	%68,7

Eşik Değer	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
>2 RU/ml	%46,6	%100	%100	%73,3
>1,19 RU/ml	%66,6	%72,7	%62,5	%76,2

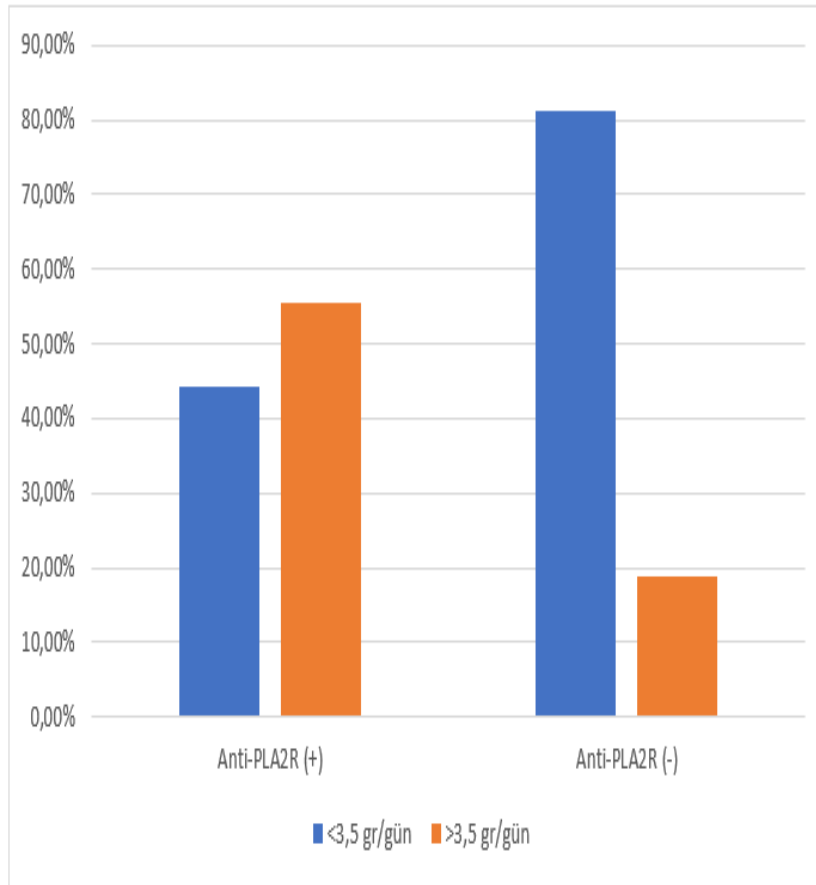
Çalışmadaki tüm hastaların, anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testine göre antikor sonuçlarının glomerüler hastalıkla ilişkili parametrelere göre karşılaştırma analizi yapıldı. Anti-PLA2R antikoru pozitif olanların ortalama proteinüri düzeyinin ($3,6 \pm 2,1$), anti-PLA2R antikoru negatif olanların ortalama proteinüri düzeyine ($2,4 \pm 3,2$) göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p=0,015$). Anti-PLA2R antikoru pozitif olanların ortalama albümin düzeyinin ($32,3 \pm 5,8$), anti-PLA2R antikoru negatif olanların ortalama albümin düzeyine göre ($38,2 \pm 6,3$) anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p=0,010$) (Tablo 8).

Tablo 8. Hastaların anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testine göre antikor sonuçlarının glomerüler hastalıkla ilişkili parametrelere göre karşılaştırılması

	<u>Anti-PLA2R (+)</u> <u>(Euroimmun)</u> Ort $\pm$ S.S.	<u>Anti-PLA2R (-)</u> <u>(Euroimmun)</u> Ort $\pm$ S.S.	p
BUN	23,4 $\pm$ 11,1	19,4 $\pm$ 10,6	0,214
Kreatinin	1,1 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,7	0,913
eGFR	79,6 $\pm$ 39,5	85 $\pm$ 34,2	0,620
Albümin	32,3 $\pm$ 5,8	38,2 $\pm$ 6,3	0,010
Proteinüri	3,6 $\pm$ 2,1	2,4 $\pm$ 3,2	0,015

Not: Blood urea nitrogen (BUN), tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR).

Hastaların 24 saatlik idrar sonuçlarından proteinüri düzeyi hesaplandı. Çıkan proteinüri düzeyi $<3,5$ gr/gün ve $>3,5$ gr/gün olarak değerlendirilip, hastalar buna göre iki gruba ayrıldı. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test sonucu pozitif olanların %44,4'ünün proteinüri düzeyi $<3,5$ gr/gün, %55,6'sının proteinüri düzeyi $>3,5$ gr/gün olarak hesaplandı. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test sonucu negatif olanların %81,2'sinin proteinüri düzeyi $<3,5$ gr/gün, %18,8'inin proteinüri düzeyi $>3,5$ gr/gün olarak hesaplandı. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test sonucu pozitif ve negatif olarak ayrıldıktan sonra, proteinüri düzeyine göre oluşan yüzdelik gruplarla istatistiksel olarak analizi yapıldığında farkın anlamlı ($p=0,027$) olduğu saptandı. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test sonucuna göre bu belirlenen proteinüri gruplarına göre oluşan yüzdelerin grafiği Şekil 14'de verildi.



Şekil 14. Hastaların anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi sonuçları ve proteinüri gruplarına göre oluşan yüzdelerin grafiği

Proteinüri düzeyi ve proteinüri üzerine etki edebileceği düşünülen faktörlerin tüm hastaları içeren korelasyon analizi yapıldı. Proteinüri düzeyine etkili faktörlerin BUN ($p=0,037$) ve albümin ($p<0,001$) düzeyi olduğu saptandı (Tablo 9).

Tablo 9. Proteinüri düzeyi ve proteinüri üzerine etki eden faktörlerin tüm hastaları içeren analizleri

	<u>Proteinüri</u>	
	Spearman's rho	p
Anti-PLA2R (Euroimmun kiti)	0,087	0,461
Anti-PLA2R (Mybiosource kiti)	0,028	0,812
BUN	0,243	0,037
Kreatinin	0,087	0,463
Albümin	-0,783	<0,001
MN varlığı	*	0,195
Yaş	-0,105	0,375

* Tabloda, MN varlığı için Spearman's rho değeri hesaplanamamıştır.

Not: Blood urea nitrogen (BUN).

Çalışmaya alınan PMN'li hastaların anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test sonucuna göre hastalar pozitif/negatif olarak iki gruba ayrıldı ve her bir grup için hastalık temel klinik parametreleri için ortalama değerler hesaplandı. Gruplar arasında ortalama hemoglobin ($p=0,030$) ve hematokrit ($p=0,039$) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken, diğer parametrelerde anlamlı bir fark bulunamadı. Anti-PLA2R antikoru pozitif olanların ortalama hemoglobin değeri $12,3\pm1,3$, negatif olanların ortalama hemoglobin değeri $13,9\pm1,7$ çıktı. Anti-PLA2R antikoru pozitif olanların ortalama hematokrit değeri $37,6\pm3,9$, negatif olanların ortalama hematokrit değeri $41,7\pm4,7$ çıktı. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test sonucu pozitif PMN'li hastalarda, negatiflere göre ortalama hemoglobin ve hematokrit değerleri anlamlı olarak daha düşük çıktı (Tablo 10).

Tablo 10. PMN’li hastalarda, anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testine göre temel klinik parametrelerin sonuçları

	<u>Anti-PLA2R (+)</u> <u>(Euroimmun)</u> Ort±S.S.	<u>Anti-PLA2R (-)</u> <u>(Euroimmun)</u> Ort±S.S.	p
İdrar total protein	171,9±147,9	129±188,9	0,140
İdrar kreatinin	50,1±25,6	51,3±21,9	0,835
İdrar albümin	125,4±119,7	95,7±156	0,127
Proteinüri	3,6±2,1	2,8±3,7	0,127
Glikoz	91,2±24,4	98,1±40,9	0,417
BUN	23,4±11,1	20,4±9,8	0,472
Kreatinin	1,1±0,6	1,1±0,9	0,908
eGFR	79,6±39,5	86,4±34,2	0,594
Albümin	32,3±5,8	37±6,6	0,069
LDL	115,4±40,1	147,8±62,1	0,153
HDL	68,3±41,1	64,2±16,5	0,532
Kolesterol	215,5±78,5	242,1±80,7	0,340
Trigliserit	159,3±55,5	150,2±79,8	0,417
Total kalsiyum	8,8±0,6	9,2±0,4	0,153
Potasyum	4,3±0,4	4,5±0,4	0,199
Sodyum	137,8±3,4	139±1,4	0,365
ALT	23,2±16,3	19,6±8,3	0,799
Hemoglobin	12,3±1,3	13,9±1,7	0,030
Hematokrit	37,6±3,9	41,7±4,7	0,039

* İki hastanın LDL, HDL, kolesterol ve trigliserit değerleri sistemde bulunmadığından çalışmada kullanılamadı.

** Beş hastanın idrar albümini HBYS’de 0,5 değerinden küçük, bir hastanın idrar total proteini de HBYS’de 1 değerinden küçük olarak belirtilmişti. Çalışmamızda, cihazın (AU5800 ve AU680, Beckman Coulter, Japonya) en küçük ölçebileceği değerler olan idrar albümini için 0,5 ve idrar total proteini için 1 değeri kullanıldı.

Not: Blood urea nitrogen (BUN), tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), alanin aminotransferaz (ALT).

Hastaların, hastalık tanılarına göre hastalık temel klinik parametresi sonuçlarının ortalamaları Tablo 11’de verildi. Gruplar arasında, bakılan değerlerde istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 11. Hastaların, tanılarına göre temel klinik parametrelerin sonuçları

	<u>PMN</u>	<u>SMN</u>	<u>MN dışı Nefrotik</u> <u>Sendrom</u>	
	Ort±S.S.	Ort±S.S.	Ort±S.S.	p
İdrar total protein	145,8±173,7	52±58,6	98,2±132,3	0,18
İdrar kreatinin	53,3±25,9	46,8±19,4	57,5±19,6	0,28
İdrar albümin	106±141,8	35,8±43,6	67,7±95,1	0,14
Proteinüri	3±3,2	1,6±1,8	2,4±3,3	0,12
Glikoz	102,2±49,9	94,7±13,8	100±37,5	0,4
BUN	21,8±10,2	21,8±13,5	18,1±10,2	0,11
Kreatinin	1,1±0,8	1,1±0,7	1,1±0,6	0,99
eGFR	82,4±36,2	79,9±35,2	85,7±34,8	0,79
Albümin	35,4±6,5	39,6±3,7	38,6±6,7	0,08
LDL	135,9±57,4	124,3±50,2	134,4±51,2	0,85
HDL	64,6±25,9	51,7±15,2	55,7±16,4	0,15
Kolesterol	232±78,8	211,4±79,7	219,3±65,7	0,74
Trigliserit	156,8±74	177,1±108	155,7±78,3	0,98
Total kalsiyum	9,1±0,5	9,3±0,3	9,3±0,5	0,2
Potasyum	4,4±0,4	4,4±0,4	4,3±0,5	0,47
Sodyum	138,8±2,3	138,5±1,9	139±2,1	0,78
ALT	20,4±11,1	18,9±12,8	20±12,2	0,44
Hemoglobin	13,3±1,7	12,6±1,7	13,9±1,5	0,09
Hematokrit	40,4±4,7	37,7±4,5	41,7±4,4	0,05

* İki hastanın LDL, HDL, kolesterol ve trigliserit değerleri sistemde bulunmadığından çalışmada kullanılmadı.

** Beş hastanın idrar albümini HBYS’de 0,5 değerinden küçük, bir hastanın idrar total proteini de HBYS’de 1 değerinden küçük olarak belirtilmişti. Çalışmamızda, cihazın (AU5800 ve AU680, Beckman Coulter, Japonya) en küçük ölçebileceği değerler olan idrar albümini için 0,5 ve idrar total proteini için 1 değeri kullanıldı.

Not: Blood urea nitrogen (BUN), tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR), düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), alanin aminotransferaz (ALT).



5.TARTIŞMA

Erişkin insanlarda nefrotik sendromun birçok sebebi vardır. Bunlar içinde en sık görüleni MN'dir. MN'nin tanısını koymak, tedavisini düzenlemek, prognozunu belirlemek klinisyenler için çok önemlidir. Son zamanlarda keşfedilen, anti-PLA2R antikorlarının, MN'de primer ve sekonder ayrımının yapılmasında yol gösterici olabileceği düşünülmektedir. Bu antikorlar hastalığın tanısına ilaveten, tedavisinin planlamasında, tedaviye yanıtın izlenmesinde ve prognozun gösterilmesinde de faydalı bulunmuştur (1, 60).

ELISA ve indirekt IFT'i yöntemleri, anti-PLA2R antikorlarının ölçümünde kullanılmaktadır. IFT'i, duyarlılığı en yüksek test olarak bildirilmesine rağmen, birçok laboratuvarın ilk tercih ettiği yöntem ELISA'dır. ELISA yönteminin tercih edilmesinin sebebi; fazla miktardaki örnek hacimlerinin çalışılabilmesi, testin çalışanın yorumuna daha az ihtiyaç göstermesi ve kantitatif sonuçları verebilmesidir (61, 62). Anti-PLA2R ELISA testi ile yapılan çalışmalarda, testin duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olduğu gösterilmiştir. Nefrotik sendromu olan hastalarda böbrek biyopsisinin yapılamadığı durumlarda akla ilk gelmesi gereken anti-PLA2R antikor testidir (41).

Wu ve arkadaşları (22) yaptıkları çalışmada, PMN'li grubun yaş ortalamasını, SMN'li grubun yaş ortalamasından daha büyük bulmuşlardır. PMN grubunun yaş ortalamasını 42 ± 13 , SMN grubunun yaş ortalamasını 38 ± 12 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda, hastaların yaş ortalaması 74 hastada $44,2 \pm 12,7$, PMN grubunda $46,9 \pm 11,6$, SMN grubunda $46,60 \pm 11,7$ olarak bulunmuş olup; her iki grubun yaş ortalamasının yakın olduğu gösterilmiştir.

MN, 40-60 yaşlarında ve erkek cinsiyette daha sık görülmektedir (1,15). Wu ve arkadaşları (22) tarafından Çin'de yapılan bir çalışmada, 164 MN hastasının %53,6'sının erkek, %46,4'ünün kadın olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmamızda da, elde ettiğimiz veriler buna benzerdir (%54,1'i erkek, %45,9'u kadın).

PMN tanısı alan hastalarda, anti-PLA2R antikor sonucu pozitifliği çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı oranlarda saptanmıştır. Japon hastalar ile yapılan bir çalışmada, anti-PLA2R antikoru ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi

sonucu, üreticinin önerileri olan 20 RU/ml eşik değeri seçildiğinde, %50 oranında pozitif bulunmuştur (63). Kim ve arkadaşlarının (49) yaptıkları çalışmada, anti-PLA2R antikoru ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi, 14 RU/ml eşik değerinde, %44,1 oranında pozitif saptamışlardır. Çinli bir hasta grubunda yapılan çalışmada, anti-PLA2R antikoru ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi sonucu, 20 RU/ml eşik değerinde, %62,2 oranında pozitif bulunmuştur (23). Avustralya’da yapılan bir çalışmada, anti-PLA2R antikoru ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi sonucu, 20 RU/ml eşik değerinde, %25 oranında pozitif saptanmıştır (64). Yapılan bir başka çalışmada Yunan hastalarda anti-PLA2R antikoru ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi sonucu, üreticinin önerileri olan 20 RU/ml eşik değerinde, %48,5 oranında pozitif bulunmuştur (65).

Çalışmamızda da, PMN tanısı alan 30 hasta anti-PLA2R antikorları açısından değerlendirilmiştir. Anti-PLA2R antikorları, anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinde, üreticinin önerileri olan 20 RU/ml eşik değerinde, hastaların %30’unda pozitif saptanmıştır.

Yapılan birçok çalışmada, SMN’li hastalarda, anti-PLA2R antikoru sonuçları negatif tespit edilmiştir (48-50). Kim ve arkadaşları (49) yaptıkları çalışmada 93 PMN, 14 SMN, 41 MN dışı nefrotik sendromlu hastanın ve 12 sağlıklı gönüllünün anti-PLA2R antikorunu Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kiti ile test etmişlerdir. SMN’li hastaların tümünde anti-PLA2R antikoru sonucu negatif saptanmıştır. Hoxha ve arkadaşları (53) yaptıkları çalışmada 100 PMN, 17 SMN, 90 MN dışı nefrotik sendromlu hastanın ve 153 sağlıklı gönüllünün anti-PLA2R antikorunu Euroimmun IFT (Lübeck, Almanya) kiti ile test etmişlerdir. SMN’li hastaların tümünde anti-PLA2R antikoru sonucu negatif bulunmuştur.

Çalışmamızda SMN’li hasta sayısı 10’dur. On hastanın tümünde anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi sonuçları negatif saptanmıştır. Hasta sayımız nispeten az olmasına rağmen çıkan sonuç yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda, MN dışı diğer glomerüler hastalıklarda (IgA nefropatisi, MDH, FSGS) anti-PLA2R antikorunun saptanmadığı belirtilmiştir. Anti-PLA2R antikor pozitifliği nefrotik sendromun diğer sebeplerini (MDH, FSGS, MPGN gibi)

dışlamamızı sağlar (22,23,49). Wu ve arkadaşları (22) yaptıkları bir çalışmada 64 PMN, 40 SMN, 60 MN dışı nefrotik sendromlu hastanın anti-PLA2R antikorunu Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kiti ile test etmişlerdir. MN dışı nefrotik sendromlu hastaların tümünde anti-PLA2R antikor sonucunu negatif saptanmıştır. 82 PMN, 22 SMN, 40 MN dışı nefrotik sendromlu, Çinli bir hasta grubunda, anti-PLA2R antikorunu Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kiti ile test edilmiştir. MN dışı nefrotik sendromlu hastaların tümünde anti-PLA2R antikor sonucunu negatif bulunmuştur (23). Kim ve arkadaşları (49) yaptıkları çalışmada 93 PMN, 14 SMN, 41 MN dışı nefrotik sendromlu hastanın ve 12 sağlıklı gönüllünün anti-PLA2R antikorunu Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kiti ile test etmişlerdir. MN dışı nefrotik sendromlu hastaların tümünde anti-PLA2R antikor sonucunu negatif saptanmıştır.

Çalışmamızda, yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak, 34 MN dışı nefrotik sendromlu hastanın tümünde, anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi sonuçları negatif bulunmuştur.

Literatürde sağlıklı kontrollerle yapılan çalışmalarda anti-PLA2R antikor sonucunu negatif saptanmıştır (23,49). Çalışmamızda da, yapılan çalışmalarla uyumlu olarak, 15 sağlıklı gönüllünün tümünde, anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi sonuçları negatif bulunmuştur.

Kim ve arkadaşlarının (49) yaptıkları çalışmada, ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi kullanılarak, anti-PLA2R antikor pozitif sonuçlananların ortalama anti-PLA2R antikor düzeyi $188,82 \pm 38,93$ ve anti-PLA2R antikor negatif sonuçlananların ortalama anti-PLA2R antikor düzeyi $2,60 \pm 0,053$ bulunmuştur.

Çalışmamızda, anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinde ortalama anti-PLA2R antikor düzeyi PMN'li hastalarda $31,8 \pm 55,3$; SMN'li hastalarda $1,1 \pm 0,09$; MN dışı nefrotik sendromlu hastalarda $1,1 \pm 0,1$ ve sağlıklılar da $1,1 \pm 0,1$ saptanmıştır.

Liu ve arkadaşları (64) yaptıkları çalışmada Çinli hastalar için en uygun eşik değeri belirlemeye çalışmışlardır. Anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi ile saptanan antikor sonuçlarının konsantrasyon değerleri kullanılarak,

istatistiki olarak ROC analizi yapılmıştır. ROC eğrisi analizi sonucunda area under the curve hesaplanmıştır ve $p < 0,05$ istatikselsel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Eşik değeri 2,6 RU/ml olarak saptanmıştır. Farklı eşik değeri ile bulunan eşik değeri karşılaştırılmıştır. Bulunan eşik değeri tanısal etkinliği gösterilmiştir; duyarlılığı %78,9 özgüllüğü %91,7 olarak hesaplanmıştır. İtalya’da yapılan bir çalışmada ise anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi ile saptanan antikor sonuçlarının konsantrasyon değeri kullanılarak, ROC eğrisi analizi sonucunda eşik değeri 2,7 RU/ml olarak bulunmuştur (35).

Çalışmamızda, Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kiti ile elde edilen konsantrasyon değeri istatistiki olarak ROC analizi yapılmıştır ve bir eşik değeri bulunmuştur. Yapılan ROC eğrisi analizi sonucunda (area under the curve=0,706 ve $p=0,003$) anlamlı bir sonuç saptanmıştır ve eşik değeri 1,19 RU/ml olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, Euroimmun ELISA kiti (Lübeck, Almanya) için, 1,19 RU/ml eşik değeri kullanıldığında duyarlılık %66,6, özgüllük %72,7, ppd %62,5, npd %76,2 olarak hesaplanmıştır. Eşik değeri 2 RU/ml kullanıldığında ise duyarlılık %46,6’ya yükselirken, özgüllük %100 olarak kalmıştır. Eşik değeri 1,19-2 RU/ml gibi daha düşük değeri kullanılması testin duyarlılığını artırdığı; 14-20-40 RU/ml gibi daha yüksek eşik değeri kullanılması ise testin özgüllüğünü koruduğu görülmüştür.

MyBioSource anti-PLA2R ELISA kiti (San Diego, CA, ABD) ile ilgili literatürde makale sayısı son derece sınırlıdır. Öztürk ve arkadaşlarının (66) çalışmasında, MyBioSource anti-PLA2R ELISA kiti (San Diego, CA, ABD) kullanılmış ve çıkan sonuçlar testin referans aralığının dışında kalmıştır. Anlamlı kabul edilecek düzeyde antikor titresi bulamamışlardır.

Çalışmamızda, anti-PLA2R antikorları, MyBioSource ELISA kiti (San Diego, CA, ABD) ile de analiz edilmiştir. Anti-PLA2R ELISA Mybiosource (San Diego, CA, ABD) kitinde, ortalama anti-PLA2R antikor düzeyi PMN’li hastalarda $18,9 \pm 39,7$; SMN’li hastalarda 8 ± 6 ; MN dışı nefrotik sendromlu hastalarda $10,1 \pm 14,1$ ve sağlıklılarda $6,8 \pm 3,7$ olarak hesaplanmıştır. MyBioSource ELISA (San Diego, CA, ABD) kiti ile yapılan çalışmamız sonucunda elde edilen konsantrasyon değeri istatistiki olarak ROC analizi yapılmış (area under the curve=0,486 ve $p=0,834$) ve

anlamalı bir eşik değeri belirlenememiştir. Anti-PLA2R antikor düzeyi için sadece konsantrasyon değerleri verilebilmiştir.

ELISA testlerinde duyarlılık, özgüllük, ppd ve npd belirlenen eşik değerlere göre değişmektedir (35,37). İtalya’da yapılan bir çalışmada; 126 PMN’li ve 369 diğer membranöz olmayan nefropatili hastada, bir ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi kullanılarak anti-PLA2R otoantikorları bakılmıştır. Pozitif eşik değeri 20 RU/ml kabul edildiğinde, duyarlılık %61,1 ve özgüllük %99,7; eşik değeri 14 RU/ml kabul edildiğinde duyarlılık %63,5 ve özgüllük %99,7 bulunmuştur. ROC eğrisi analizi sonucunda eşik değeri 2,7 RU/ml belirlendiğinde duyarlılık %83,3 ve özgüllük %95,1 olarak saptanmıştır (35). Yapılan birçok çalışmadaki farklı eşik değerlerde, anti-PLA2R antikorumun duyarlılık, özgüllük, ppd ve npd’lerinin sonuçları ve çalışmamızın sonuçları belirtilmiştir (Tablo 12).

Tablo 12. Anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi kullanılarak yapılan çalışmalarda, farklı eşik değerlerde, testin duyarlılık, özgüllük, ppd ve npd’lerinin sonuçları (37, 49, 63, 64)

Eşik Değeri	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	Ülke	Referans
>14 RU/ml	%65,3	%97,3			Çin	Dou ve arkadaşları (37)
>20 RU/ml	%60,2	%97,3			Çin	Dou ve arkadaşları (37)
>40 RU/ml	%45,8	%97,3			Çin	Dou ve arkadaşları (37)
>20 RU/ml	%50	%100	%100	%52,5	Japonya	Hihara ve arkadaşları (63)
>14 RU/ml	%44,1	%100	%100	%56,3	Kore	Kim ve arkadaşları(49)
>2 RU/ml	%82,5	%75	%69,1	%86,3	Çin	Liu ve arkadaşları (64)
>2,6 RU/ml	%78,9	%91,7	%86,5	%86,5	Çin	Liu ve arkadaşları (64)
>14 RU/ml	%59,6	%95,2	%89,5	%77,7	Çin	Liu ve arkadaşları (64)
>20 RU/ml	%50,9	%96,4	%90,6	%74,3	Çin	Liu ve arkadaşları (64)

Eşik Değer	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	Ülke	Referans
>40 RU/ml	%47,4	%97,6	%93,1	%73,2	Çin	Liu ve arkadaşları (64)
>1,19 RU/ml	%66,6	%72,7	%62,5	%76,2	Türkiye	Çalışmamızda
>2 RU/ml	%46,6	%100	%100	%73,3	Türkiye	Çalışmamızda
>14 RU/ml	%33,3	%100	%100	%68,7	Türkiye	Çalışmamızda
>20 RU/ml	%30	%100	%100	%67,6	Türkiye	Çalışmamızda
>40 RU/ml	%20	%100	%100	%64,7	Türkiye	Çalışmamızda

Çalışmamızda anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinde üretici firma önerisi olan eşik değerin >20 RU/ml kullanılması, pozitiflik oranlarının düşük çıkmasına sebep olmuş olabilir. Testin eşik değerini daha düşük tuttuğumuzda pozitiflik oranının arttığı, testin duyarlılığının da yükseldiği görülmüştür.

Çalışmamızda, anti-PLA2R antikorlarının diğer çalışmalara göre nispeten düşük saptanmasının en olası nedenlerinden biri, örnek alındığı tarihte hastaların aktif evrede olmaması olabilir kanaatindeyiz. Hastaların spontan olarak veya immünosüpresif tedavi ile immünolojik remisyona girdiği dönemde serum numunelerinin toplanmasının anti-PLA2R antikorlarının saptanamamasına neden olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (42). Qin ve arkadaşlarının (67) çalışmasında, PMN tanılı hastalarda ilk tanı konulduğunda ve tedavi sonrası anti-PLA2R antikoru ölçülmüş, tedaviden sonra anti-PLA2R antikoru pozitif hasta sayısının azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışma, anti-PLA2R antikoru hastalığın hangi evresinde bakıldığının çok önemli olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda da PMN tanılı olup anti-PLA2R antikoru negatif saptadığımız hastaların immünolojik remisyona girmiş olması olası sebeplerdendir.

Olası nedenlerden ikincisi, çalışma grubundaki hastaların hastalık seyrinin başlarında olması da olabilir. Serum anti-PLA2R antikorları, hastalık seyrinin başlarında yanlış bir şekilde negatif olabilmekte ve daha sonra serokonversiyon

meydana gelebilmektedir (44,45). Bu iki mekanizma ile, PLA2R ile ilişkili MN'li hastaların seronegatif sonuçları açıklanabilir (42-46). Olası nedenlerden üçüncüsü, PLA2R'den farklı bir antikor mekanizmasının (THSD7A veya henüz tanımlanmamış başka bir antikor grubu) dahil olduğu durumdur (19).

MN'li hastalar için, böbrek yetmezliğine ilerleme riski derecesine göre sınıflandırma yapıldığında, anti-PLA2R antikor seviyelerinden ve proteinüri düzeyinden yararlanılmaktadır. Anti-PLA2R antikor seviyeleri ve proteinüri düzeyi MN'nin prognozunu belirlemede yararlı belirteçler olarak kullanılmaktadır (39).

Yapılan çalışmalar, PMN tanılı hastalarda, anti-PLA2R antikorlarının yüksek olmasının artmış nüks riski ile ilişkisini; anti-PLA2R antikorlarının prognostik değerini ve hastalık aktivitesiyle ilişkisini ortaya çıkarmıştır (51, 68-71). Yapılan on bir çalışmanın dahil edildiği meta-analizde, 824 PMN hastasında anti-PLA2R antikorumun PMN hastalarını sınıflandırmak için prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceği belirtilmiştir. 594 anti-PLA2R antikoru pozitif hastada 230 anti-PLA2R antikoru negatif hastaya göre tedavilere bakılmaksızın klinik remisyon değişimi daha azdır ve anti-PLA2R antikoru sonucunun klinik remisyon üzerindeki etkisi istatistiki olarak ($p<0,0001$) anlamlı saptanmıştır. Yüksek anti-PLA2R antikorumun PMN hastalarında kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (70).

Radice ve arkadaşları (68) yaptıkları çalışmada, anti-PLA2R antikor pozitifliğinin, artan proteinüri ve azalan serum albümin düzeyleri ile doğrusal ilişkisini saptamışlardır. Anti-PLA2R antikor düzeyinin proteinüri ve diğer biyobelirteçler ile ölçülen hastalık aktivitesiyle ilişkisini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda da, tüm hastalar anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testine göre, anti-PLA2R antikor sonuçlarının glomerüler hastalıkla ilişkili parametrelerle ilişkisi analiz edilmiştir. Anti-PLA2R antikoru pozitif olanların, daha yüksek ortalama proteinüri ($p=0,015$) ve daha düşük ortalama serum albümin ($p=0,010$) düzeylerine sahip olduğu bulunmuştur. Bu veriler ışığında anti-PLA2R antikor sonucunun proteinüri düzeyi ile ilişkisinden dolayı prognostik bir biyobelirteç olarak kullanılabilir.

Yapılan çalışmalarda proteinüri düzeyi $>3,5$ gr/gün üzerinde olanlar nefrotik olarak belirtilmiş ve bu düzey kullanılarak çalışmalarda karşılaştırmalar yapılmıştır (53, 72). Proteinüri düzeyinden, MN'nin klinik seyrini belirlemede ve hastalık aktivitesini izlemede yararlanılmaktadır (73).

Çalışmamızda hastalar proteinüri düzeyi $<3,5$ gr/gün ve $>3,5$ gr/gün olarak iki gruba ayrılarak değerlendirilmiştir. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi kullanılarak, anti-PLA2R antikoru pozitif hastaların %44,4'ünün proteinüri düzeyi $<3,5$ gr/gün, %55,5'inin proteinüri düzeyi $>3,5$ gr/gün; anti-PLA2R antikoru negatif hastaların %81,2'inin proteinüri düzeyi $<3,5$ gr/gün, %18,7'inin proteinüri düzeyi $>3,5$ gr/gün olarak saptanmıştır. Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test sonucu pozitif ve negatif olarak ayrıldıktan sonra, proteinüri düzeyine göre oluşan gruplarla istatistiksel olarak analizi yapıldığında farkın anlamlı ($p=0,027$) olduğu bulunmuştur. Anti-PLA2R antikoru pozitif hastaların, proteinüri düzeyi olarak nefrotik kısımda olan yüzdesinin daha fazla olduğu görülmüştür. Bu verilerin de katkısı ile anti-PLA2R antikor sonucu, hastalığın klinik aktivitesinde etkili rol oynayabilir.

Yapılan çalışmada, subnefrotik proteinürisi olan hastalarda serum albümin düzeyinin en güçlü prognostik faktör olduğu bulunmuştur (74). Çalışmamızda tüm hastalarda, proteinüri düzeyine etkili faktörlere bakıldığında; yapılan analiz sonucunda BUN ($p=0,037$) ve serum albümin ($p<0,001$) düzeylerinin etkili olduğu saptanmıştır.

Akiyama ve arkadaşları (48) yaptıkları bir çalışmada, PMN hastalarını anti-PLA2R antikor sonucuna göre pozitif ve negatif olarak iki gruba ayırarak temel klinik parametreler ile ilişkisini incelemişlerdir. Serum albümini ≤ 3.0 g/dL olan hasta sayısı, anti-PLA2R antikorları pozitif PMN hastalarında, anti-PLA2R antikorları negatif PMN hastalarına göre ($p=0,02$) anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur.

Çalışmamızda, PMN hastaları anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testi sonucuna göre, pozitif ve negatif olarak iki gruba ayrılmış ve temel klinik parametrelerin ortalama değerleri hesaplanmıştır. Gruplar arasında bakılan değerlerin büyük bir kısmında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, yapılan çalışmalardan farklı olarak çalışmamızda, ortalama hemoglobin ($p=0,030$) ve hematokrit ($p=0,039$) değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır. Anti-

PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test sonucu pozitif PMN'li hastalarda, negatif olanlara göre ortalama hemoglobin ve hematokrit değerleri daha düşük çıkmıştır.

PMN hastalığının prognozu oldukça değişkendir. Hastaların 1/3'ü spontan remisyona girer, 1/3'ü stabil böbrek fonksiyonlarıyla proteinürik kalır, 1/3'ü ise son dönem böbrek yetmezliğine ilerlemektedir (52,53). Kronik böbrek yetmezliğine ilerleyen hastalarda anemi ciddi bir komplikasyon olarak gelişebilmektedir. Anemi gelişen hastalarda hemoglobin ve hematokrit değerlerinde düşüş görülmektedir (75). Yapılan meta-analiz çalışmasında, kronik böbrek yetmezliği hastalarında proteinürisi yüksek olanlarda proteinürisi olmayanlara göre anemi gelişmesinin daha yüksek olduğu saptanmaktadır. Kronik böbrek yetmezliği anemisi ile yüksek proteinüri arasında ki ilişki görülmektedir (76).

Çalışmamızda anti-PLA2R antikor sonucu pozitif hastaların daha yüksek ortalama proteinüri düzeyine ve daha düşük ortalama hemoglobin ve hematokrit değerlerine sahip olması; hastalığın kronik böbrek yetmezliğine ilerlemesi ile ilişkili olabilir.

Wu ve arkadaşlarının (22) yaptıkları çalışmada, PMN, SMN ve MN olmayan nefrotik sendromlu hastalarda, temel klinik parametrelerin ortalama değerlerinde (serum kreatinin, serum albümin, 24 saatlik idrar proteini, kolesterol ve trigliserid düzeyleri) üç grup arasında istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı bir fark saptayamamışlardır.

Çalışmamızda, tüm hastaların, hastalık tanılarına göre oluşturulan gruplarda temel klinik parametrelerinin ortalama değerleri hesaplanmıştır. Gruplar arasında, bakılan değerlerde istatistiksel olarak ($p>0,05$) anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Yakın zamanda yapılan bir çalışma, anti-PLA2R antikorlarının, MN'li hastalarda proteinüri ortaya çıkmadan ve patolojik olarak tanı konulmadan daha önce saptanabileceğini belirtmiştir. Bu çalışma, bu antikoru tanıda ne kadar önemli olduğunu ve bunu destekleyecek ileriki araştırmaların gerekliliğini ortaya koymuştur (77).

Çalışmamızın başlıca kısıtlılıklarından biri, seçtiğimiz hasta grubunu oluşturan hastaların sayısının (PMN’li 30, SMN’li 10 ve MN dışı nefrotik sendromlu 34 hasta) diğer çalışmalara göre nispeten daha az olmasıdır. İkincisi, serumların toplandığı tarihte hastaların hastalığının immünolojik remisyonunda olup olmadığının belirlenememiş olmasıdır. Üçüncüsü, hastaları izleme şansımız olmadığı için, hastalarda iyileşme ve nüks oranları hastalığın ileriki dönemlerindeki durumu ile anti-PLA2R antikoru arasındaki ilişki saptanamamıştır. Dördüncüsü, çalışma zaman aralığında, hastaların uzun vadeli izlemi mümkün olmamış ve hastalardan tek bir serum örneği alındığı için anti-PLA2R antikor titreleri takip edilememiştir. Beşincisi, çalışmamızda, iki farklı ticari ELISA kiti kullanılarak anti-PLA2R antikoru saptanmış ve iki farklı birim ile konsantrasyon sonuçları alınmıştır. Anti-PLA2R ELISA Euroimmun (Lübeck, Almanya) kitinin ölçüm birimi RU/ml, anti-PLA2R ELISA MyBioSource (San Diego, CA, ABD) kitinin ise ölçüm birimi ng/ml’dir. Literatürde bu antikor için bu birimleri birbirine dönüştürme açısından bir formül bulunamamıştır. Farklı ticari ELISA kitleri ile farklı birimlerde çıkan sonuçlar, birimleri birbirine çevirmek için bir formülün gerekliliğini ortaya koymaktadır. Kitlerin referans aralıklarının ve birimlerinin farklı olması, iki kitin performanslarının karşılaştırılamamasına neden olmuştur.

Çalışmamızda, Euroimmun ELISA kitinde üreticinin önerdiği eşik değeri kullanıldığında, pozitif sonucun daha yararlı olduğu ve biyopsi ihtiyacını kaldırdığı, negatif sonucun ise biyopsi ile doğrulanması gerektiği saptanmıştır. Her iki test kitinde de optimal eşik değerin belirlenmesi için daha fazla sayıda hasta ile daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Antikor pozitifliğinin yüksek proteinüri düzeyiyle ve düşük hemoglobin/hematokrit değerleri ile ilişkili olması; MN’nin kronik böbrek yetmezliğine ilerlemesi ile ilişkili olabilir ve antikoru prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceğini gösterebilir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuçlar:

Anti-PLA2R antikoru, anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinde, üreticinin önerileri olan 20 RU/ml eşik değerinde PMN hastalarının %30'unda pozitif saptanmıştır.

Anti-PLA2R antikoru, SMN'li, MN dışı nefrotik sendromlu hastalar ile sağlıklı gönüllülerin tümünde, anti-PLA2R ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testinde, negatif bulunmuştur.

Euroimmun ELISA kitinin (Lübeck, Almanya), duyarlılığı %30 ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır.

Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kiti sonucunda bulunan konsantrasyon değerlerine yapılan ROC eğrisi analizine göre eşik değer 1,19 RU/ml olarak bulunmuştur.

Anti-PLA2R antikoru için, Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kitinde, 1,19 RU/ml eşik değeri kullanıldığında duyarlılık %66,6, özgüllük %72,7, ppd %62,5, npd %76,2 olarak hesaplanmıştır.

MyBioSource ELISA (San Diego, CA, ABD) kiti sonucunda bulunan konsantrasyon değerlerine yapılan ROC eğrisi analizine göre bir eşik değer saptanamamıştır.

Anti-PLA2R antikoru için, Euroimmun ELISA (Lübeck, Almanya) kitinde 2, 14 ve 40 RU/ml eşik değerleri kullanıldığında sırasıyla duyarlılıklar %46,6, %33,3 ve %20 özgüllükler ise üç değer için %100 olarak hesaplanmıştır.

Anti-PLA2R antikorunun, anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) testine göre pozitifliğinin daha yüksek ortalama proteinüri ve daha düşük ortalama serum albümin düzeylerine sahip olduğu bulunmuştur.

Anti-PLA2R antikor sonucunun proteinüri düzeyi ile ilişkisi saptanmış ve prognostik biyobelirteç olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

Proteinüri düzeyine etkili faktörlere bakıldığında; özellikle BUN ve serum albümin düzeylerinin etkili olduğu bulunmuştur.

Anti-PLA2R IgG ELISA (Euroimmun, Lübeck, Almanya) test sonucu pozitif PMN'li hastalarda, negatif olanlara göre ortalama hemoglobin ve hematokrit değerleri daha düşük saptanmıştır.

Tüm hastaların, hastalık tanılarına göre temel klinik parametrelerden çıkan ortalama sonuçları hesaplandığında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Öneriler:

Anti-PLA2R antikor seviyelerinin, MN'deki tanı ve önemini göstermek için randomize prospektif tasarım ve daha fazla sayıda kayıtlı hasta ile ek çalışmalar yapılmalıdır.

Optimal eşik değerin belirlenmesi için daha fazla sayıda hasta ile çalışmalar yapılmalıdır.

Çalışmamızdaki kısıtlı yönler; düşük örneklem büyüklüğü ve kısa örnek toplama süresidir, bunlar ileriki çalışmalarda göz ardı edilmemelidir.

Hastalık aktivitesinin, anti-PLA2R antikor seviyelerine etkisini göstermek için, hastalardan en az iki farklı zamanda numune alınmalıdır.

7.KAYNAKLAR

- 1) Ronco P, Beck L, Debiec H, Fervenza FC, Hou FF, Jha V, Sethi S, Tong A, Vivarelli M and Wetzels J. Membranous nephropathy. *Nat Rev Dis Primers*. 2021 Sep 30; 7(1):69.
- 2) Gu Y, Xu H, and Tang D. Mechanisms of Primary Membranous Nephropathy. *Biomolecules*. 2021 Apr; 11(4): 513.
- 3) Prunotto M, Carnevali ML, Candiano G, Murtas C, Bruschi M, Corradini E, Trivelli A, Magnasco A, Petretto A, Santucci L, Mattei S, Gatti R, Scolari F, Kador P, Landino A and Ghiggeri GM. Autoimmunity in Membranous Nephropathy Targets Aldose Reductase and SOD2. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010 Mar; 21(3): 507-519.
- 4) Debiec H, Lefeu F, Kemper MJ, Niaudet P, Deschênes G, Remuzzi G, Ulinski T, Ronco P. Early-childhood membranous nephropathy due to cationic bovine serum albumin. *N Engl J Med*. 2011 Jun 2; 364(22): 2101-10.
- 5) Keri KC, Blumenthal S, Kulkarni V, Beck L, Chongkraitatanakul T. Primary membranous nephropathy: comprehensive review and historical perspective. *Postgrad Med J*. 2019 Jan; 95(1119): 23-31.
- 6) Akiyama S, Imai E, Maruyama S. Immunology of membranous nephropathy. *F1000Res*. 2019 May 24; 8:734.
- 7) Hogan JJ, Zee J and Beck LH. Towards optimizing use of PLA2R antibody testing in membranous nephropathy. *Journal of Nephrology volume*. 2021 Jan; 34: 557–559.
- 8) Tomas NM, Beck Jr LH, Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G, Dolla G, Hoxha E, Helmchen U, Dabert-Gay AS, Dabayle D, Merchant M, Klein J, Salant DJ, Stahl RAK, Lambeau G. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2014; 371(24): 2277-2287.
- 9) Hoxha E, Reinhard L and Stahl RAK. Membranous nephropathy: new pathogenic mechanisms and their clinical implications. *Nature Reviews Nephrology*. 2022 Apr; 18: 466–478.
- 10) Caravaca-Fontán F, Fernández-Juárez GM, Floege J, Goumenos D, Kronbichler A, Turkmen K, Kooten CV, Frangou E, Stevens KI, Segelmark M, Tesar V, Anders HJ, Bruchfeld A. The management of membranous nephropathy-an update. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2022 June; 37(6): 1033–1042.

- 11) Tomas NM, Huber TB, Hoxha E. Perspectives in membranous nephropathy. *Cell Tissue Res.* 2021 Aug; 385(2): 405–422.
- 12) Liu Q, Liu J, Lin B, Zhang Y, Ma M. Novel Biomarkers in Membranous Nephropathy. *Front Immunol.* 2022 Apr; 13: 845767.
- 13) Alsharhan L and Beck Jr LH. Membranous Nephropathy: Core Curriculum 2021. *Am J Kidney Dis.* 2021 Mar; 77(3):440-453.
- 14) Moroni G, Ponticelli C. Secondary Membranous Nephropathy. A Narrative Review. *Front Med (Lausanne).* 2020 Dec 3; 7:611317.
- 15) Couser WG. Primary Membranous Nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017 Jun 7; 12(6): 983–997.
- 16) Ruggenenti P, Ruggiero B, Cravedi P, Vivarelli M, Massella L. Rituximab in steroid-dependent or frequently relapsing idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2014 Apr; 25(4): 850-63.
- 17) Graca A, Suszek D, Jeleniewicz R, Majdan M. Nephrotic syndrome in the course of type 1 diabetes mellitus and systemic lupus erythematosus with secondary antiphospholipid syndrome-diagnostic and therapeutic problems. *Reumatologia.* 2020 Oct; 58(5): 331-334.
- 18) Huang G, Liu F, Yu L, Wang J, Chen J, and Mao J. Pediatric membranous nephropathy: In the novel antigens era. *Front Immunol.* 2022 Aug; 13: 962502.
- 19) De Vriese AS, Glassock RJ, Nath KA, Sethi S, Fervenza FC. A Proposal for a Serology-Based Approach to Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2017 Feb; 28(2): 421-430.
- 20) Bobart SA, De Vriese AS, Pawar AS, Zand L, Sethi S, Giesen C, Lieske JC, Fervenza FC. Noninvasive diagnosis of primary membranous nephropathy using phospholipase A2 receptor antibodies. *Kidney Int.* 2019 Feb; 95(2): 429-438.
- 21) VanBeek C, Haas M. Anti-PLA2R-associated membranous nephropathy: a review with emphasis on diagnostic testing methods. *Clin Nephrol.* 2015 Jul; 84(1):1-9.
- 22) Wu X, Liu L, Guo Y, Yang L. Clinical value of a serum anti-PLA2R antibody in the diagnosis and monitoring of primary membranous nephropathy in adults. *Int J Nephrol Renovasc Dis.* 2018 Sep 20; 11: 241-247.

- 23) Li X, Wei D, Zhou Z, Wang B, Xu Y, Pan J, Yang C, Lu J, Qiu Y. Anti-PLA2R Antibodies in Chinese Patients with Membranous Nephropathy. *Med Sci Monit.* 2016 May 15; 22: 1630-6.
- 24) Takahashi S, Watanabe K, Watanabe Y, Fujioka D, Nakamura T, Obata J, Kugiyama K. C-type lectin-like domain and fibronectin-like type II domain of phospholipase A(2) receptor 1 modulate binding and migratory responses to collagen. *FEBS Lett.* 2015 Mar 24; 589(7): 829-35.
- 25) Van Si N, Fujioka D, Watanabe K, Watanabe Y, Watanabe K, Nakamura K, Yamaguchi K, Uematsu M, Kugiyama K. Phospholipase A2 Receptor Gene Polymorphisms Alter its Functions and Present a Genetic Risk of an Increased Intima-Media Thickness of the Carotid Artery. *J Atheroscler Thromb.* 2016 Oct 1; 23(10): 1227-1241.
- 26) Kao L, Lam V, Waldman M, Glassock RJ, Zhu Q. Identification of the immunodominant epitope region in phospholipase A2 receptor-mediating autoantibody binding in idiopathic membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2015;26(2):291-301.
- 27) Fresquet M, Jowitt TA, Gummadova J, Collins R, O'Cualain R, McKenzie EA, Lennon R, Brenchley PE. Identification of a major epitope recognized by PLA2R autoantibodies in primary membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2015 Feb;26(2):302-13.
- 28) Seitz-Polski B, Dolla G, Payré C, Girard CA, Polidori J, Zorzi K, Birgy-Barelli E, Jullien P, Courivaud C, Krummel T, Benzaken S, Bernard G, Burtey S, Mariat C, Esnault VLM, Lambeau G. Epitope spreading of autoantibody response to PLA2R associates with poor prognosis in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2016 May;27(5):1517-33.
- 29) Zhang P, Huang W, Zheng Q, Tang J, Dong Z, Jiang Y, Liu Y, Liu W. A Novel Insight into the Role of PLA2R and THSD7A in Membranous Nephropathy. *J Immunol Res.* 2021 Jul 14; 2021:8163298.
- 30) Augert A, Payre C, De Launoit Y, Gil J, Lambeau G, Bernard D. The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO reports.* 2009 Mar ;10(3):271-7.

- 31) Vindrieux D, Augert A, Girard CA, Gitenay D, Lallet-Daher H, Wiel C, Calve BJ, Gras B, Ferrand M, Verbeke S, Launoit YD, Leroy X, Puisieux A, Aubert S, Perrais M, Gelb M, Simonnet H, Lambeau G, Bernard D. PLA2R1 mediates tumor suppression by activating JAK2. *Cancer research*. 2013 Oct 15;73(20):6334-45.
- 32) Schlumberger W, Hornig N, Lange S, Probst C, Komorowski L, Fechner K, Dahnrich C, Stöcker W. Differential diagnosis of membranous nephropathy with autoantibodies to phospholipase A2 receptor 1. *Autoimmun Rev*. 2014 Feb; 13(2):108–113.
- 33) Corapi KM, Chen JL, Balk EM, Gordon CE. Bleeding complications of native kidney biopsy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis*. 2012 Jul;60(1):62-73.
- 34) Atwell TD, Spanbauer JC, McMenomy BP, Stockland AH, Hesley GK, Schleck CD, Harmsen WS, Welch TJ. The Timing and Presentation of Major Hemorrhage After 18,947 Image-Guided Percutaneous Biopsies. *AJR Am J Roentgenol*. 2015 Jul;205(1):190-5.
- 35) Porcelli B, Guarnieri A, Ferretti F, Garosi G, Terzuoli L, Cinci F, Tabucchi A, Tampoia M, Abbracciavento L, Villani C, Deleonardi G, Grondona AG, Mazzolini M, Manna GL, Santostefano M, Infantino M, Manfredi M, Spatoliatore G, Rosali A, Somma C, Bizzaro N. Diagnostic accuracy of antiphospholipase A2 receptor (PLA2R) antibodies in idiopathic membranous nephropathy: an Italian experience. *J Nephrol*. 2021 Apr;34(2):573-579.
- 36) Behnert A, Schiffer M, Muller-Deile J, Beck LH Jr, Mahler M, Fritzler MJ. Antiphospholipase A(2) receptor autoantibodies: a comparison of three different immunoassays for the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy. *J Immunol Res*. 2014; 2014:143274.
- 37) Dou Y, Zhang L, Liu D, Wang C, Quan S, Ma S, Xiao J, Cheng G, Liu Z, Zhao Z. The accuracy of the anti-phospholipase A2 receptor antibody in the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy: a comparison of different cutoff values as measured by the ELISA method. *Int Urol Nephrol*. 2016 Jun;48(6):845-9.
- 38) Timmermans SAMEG, Damoiseaux JGMC, Heerings-Rewinkel PTJ, Ayalon R, Beck Jr LH, Schlumberger W, Salant DJ, Paassen PV, Tervaert JWC, Registry LR. Evaluation of anti-PLA2R1 as measured by a novel ELISA in patients with idiopathic membranous nephropathy: a cohort study. *Am J Clin Pathol*. 2014 Jul;142(1):29-34.

- 39) Vriese ASD, Wetzels JFM, Cattran DC. Membranous nephropathy: Treatment and prognosis. Post TW, ed. UpToDate. Waltham, MA: UpToDate Inc. <http://www.uptodate.com>. (Accessed on Sep 12, 2022.)
- 40) Du Y, Li J, He F, Lv Y, Liu W, Wu P, Huang J, Wei S, Gao H. The diagnosis accuracy of PLA2R-AB in the diagnosis of idiopathic membranous nephropathy: a meta-analysis. PLoS One. 2014 Aug 19;9(8).
- 41) Ronco P, Debiec H. Pathophysiological advances in membranous nephropathy: time for a shift in patient's care. Lancet. 2015 May 16;385(9981):1983-92.
- 42) Fervenza FC, Glassock RJ, Bleyer AJ. American Society of Nephrology Quiz and Questionnaire 2012: glomerulonephritis. Clin J Am Soc Nephrol. 2013 Aug;8(8):1460-5.
- 43) Svobodova B, Honsova E, Ronco P, Tesar V, Debiec H. Kidney biopsy is a sensitive tool for retrospective diagnosis of PLA2R-related membranous nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2013 Jul;28(7):1839-44.
- 44) Van de Logt AE, Hofstra JM, Wetzels JFM. Serum anti-PLA2R antibodies can be initially absent in idiopathic membranous nephropathy: seroconversion after prolonged follow-up. Kidney Int. 2015 Jun;87(6):1263-4.
- 45) Ramachandran R, Kumar V, Nada R, Jha V. Serial monitoring of anti-PLA2R in initial PLA2R-negative patients with primary membranous nephropathy. Kidney Int. 2015 Nov;88(5):1198-9.
- 46) Debiec H, Ronco P. PLA2R autoantibodies and PLA2R glomerular deposits in membranous nephropathy. N Engl J Med. 2011 Feb 17;364(7):689-90.
- 47) Gunnarsson I, Schlumberger W, Rönnelid J. Antibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) and membranous lupus nephritis. Am J Kidney Dis. 2012 Apr;59(4):585-6.
- 48) Akiyama S, Akiyama M, Imai E, Ozaki T, Matsuo S, Maruyama S. Prevalence of anti-phospholipase A2 receptor antibodies in Japanese patients with membranous nephropathy. Clin Exp Nephrol. 2015 Aug;19(4):653-60.
- 49) Kim YG, Choi YW, Kim SY, Moon JY, Ihm CG, Lee TW, Jeong KH, Yang SH, Kim YS, Oh YJ, Lee SH. Anti-phospholipase A2 receptor antibody as prognostic indicator in idiopathic membranous nephropathy. Am J Nephrol. 2015;42(3):250-7.

- 50) Hoxha E, Kneißler U, Stege G, Zahner G, Thiele I, Panzer U, Harendza S, Helmcken UM, Stahl RAK. Enhanced expression of the M-type phospholipase A2 receptor in glomeruli correlates with serum receptor antibodies in primary membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2012 Oct;82(7):797-804.
- 51) Hoxha E, Thiele I, Zahner G, Panzer U, Harendza S, Stahl RA. Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2014 Jun;25(6):1357-66.
- 52) Zhang BO, Cheng M, Yang M, Han S, Zhang YH, Shi HG, Zhu L, Zhao XZ. Analysis of the prognostic risk factors of idiopathic membranous nephropathy using a new surrogate end-point. *Biomed Rep.* 2016 Feb; 4(2): 147-152.
- 53) Hoxha E, Harendza S, Zahner G, Panzer U, Steinmetz O, Frenchner K, Helmcken U, Stahl RAK. An immunofluorescence test for phospholipase-A2-receptor antibodies and its clinical usefulness in patients with membranous glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2011 Aug; 26:2526–2532.
- 54) Beck Jr LH, Fervenza FC, Beck DM, Bonegio RGM, Malik FA, Erickson SB, Cosio FG, Cattran DC, Salant DJ. Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2011 Aug; 22(8):1543-50.
- 55) Qin HZ, Zhang MC, Le WB, Ren Q, Chen DC, Zeng CH, Liu L, Zuo K, Xu F, Liu ZH. Combined Assessment of Phospholipase A2 Receptor Autoantibodies and Glomerular Deposits in Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2016 Oct; 27(10): 3195-3203.
- 56) Kanigicherla D, Gummadova J, McKenzie EA, Roberts SA, Harris S, Nikam M, Poulton K, McWilliam L, Short CD, Venning M, Brenchley PE. Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int.* 2013 May; 83(5): 940-8.
- 57) Quintana LF, Blasco M, Seras M, Pérez NS, López-Hoyos M, Villarroel, P, Rodrigo, E, Vinas O, Ercilla G, Diekmann F, Gomez-Roan JJ, Fernandez-Fresnedo G, Oppenheimer F, Arias M, Caampistol JM. Antiphospholipase A2 receptor antibody

- levels predict the risk of posttransplantation recurrence of membranous nephropathy. *Transplantation*. 2015 Aug;99(8):1709-14.
- 58) Kattah A, Ayalon R, Beck LH Jr., Sethi S, Sandor DG, Cosio FG, Gandhi MJ, Lorenz EC, Salant DC, Fervenza FC. Anti-phospholipase A₂ receptor antibodies in recurrent membranous nephropathy. *Am J Transplant*. 2015 May;15(5):1349-59.
- 59) Seitz-Polski B, Payré C, Ambrosetti D, Albano L, Cassuto-Viguier E, Berguignat M, Jeribi A, Thouret MC, Bernard G, Benzaken S, Lambeau G, Esnault VLM. Prediction of membranous nephropathy recurrence after transplantation by monitoring of anti-PLA2R1 (M-type phospholipase A2 receptor) autoantibodies: A case series of 15 patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2014 Dec;29(12):2334-42.
- 60) Obrisca B, Ismail G, Jurubita R, Baston C, Andronesi A and Mircescu G. Antiphospholipase A2 Receptor Autoantibodies: A Step Forward in the Management of Primary Membranous Nephropathy. *Biomed Res Int*. 2015 Oct; 2015:249740.
- 61) Wetzels JFM. Antibodies Against M-Type Phospholipase Receptor and Prediction of Outcome in Membranous Nephropathy: We are Not There Yet. *Am J Nephrol*. 2018 Nov; 48(6):434-437.
- 62) Dähnrich C, Komorowski L, Probst C, Seitz-Polski B, Esnault V, Wetzels JF, Hofstra JM, Hoxha E, Stahl RA, Lambeau G, Stöcker W, Schlumberger W. Development of a standardized ELISA for the determination of autoantibodies against human M-type phospholipase A2 receptor in primary membranous nephropathy. *Clinica Chimica Acta*. 2013 Jun; 421:213-8.
- 63) Hihara K, Iyoda M, Tachibana S, Iseri K, Saito T, Yamamoto Y, Suzuki T, Wada Y, Matsumoto K, Shibata T. Anti-Phospholipase A2 Receptor (PLA2R) Antibody and Glomerular PLA2R Expression in Japanese Patients with Membranous Nephropathy. *PLoS One*. 2016 Jun 29; 11(6): e0158154.
- 64) Liu Y, Li X, Ma C, Wang P, Liu J, Su H, Zhuo H, Kong X, Xu D, Xu D. Serum anti-PLA2R antibody as a diagnostic biomarker of idiopathic membranous nephropathy: The optimal cut-off value for Chinese patients. *Clin Chim Acta*. 2018 Jan; 476: 9-14.
- 65) Provatopoulou S, Kalavrizioti D, Stangou M, Kouri M-N, Kalliakmani P, Papasotiriou M, Papachristou E, Goumenos DS, Papagianni A. Circulating anti-phospholipase A2 receptor antibodies as a diagnostic and prognostic marker in Greek patients with

- idiopathic membranous nephropathy- a retrospective cohort study. *Rom J Intern Med*. 2019 Jun 1; 57(2):141- 150.
- 66) Öztürk S. İdiyopatik membranöz glomerulonefritli hastalarda Anti-fosfolipaz A2 reseptör (Anti-PLA2R) antikor düzeyinin tanı ve tedavideki yeri [tez]. Gaziantep: Gaziantep Üniversitesi; 2018.
- 67) Qin W, Beck LH, Zeng C, Chen Z, Li S, Zuo K, Salant DJ, Liu Z. Anti-phospholipase A2 receptor antibody in membranous nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2011 Jun; 22(6):1137-43.
- 68) Radice A, Trezzi B, Maggiore U, Pregnolato F, Stellato T, Napodano P, Rolla D, Pesce G, A'Amico M, Santoro D, Londrino F, Ravera F, Ortisi G, Sinico RA. Clinical usefulness of autoantibodies to M-type phospholipase A2 receptor (PLA2R) for monitoring disease activity in idiopathic membranous nephropathy (IMN). *Autoimmun Rev*. 2016 Feb; 15(2):146-54.
- 69) Segarra-Medrano A, Jatem-Escalante E, Carnicer-Cáceres C, Agraz-Pamplona I, Salcedo MT, Valtierra N, Ostos-Roldan E, Arredondo KV, Jaramillo J. Evolution of antibody titre against the M-type phospholipase A2 receptor and clinical response in idiopathic membranous nephropathy patients treated with tacrolimus. *Nefrologia*. 2014; 34(4):491-7.
- 70) Liang Y, Wan J, Chen Y, Pan Y. Serum anti-phospholipase A2 receptor (PLA2R) antibody detected at diagnosis as a predictor for clinical remission in patients with primary membranous nephropathy: a meta-analysis. *BMC Nephrol*. 2019 Sep; 20(1):360.
- 71) Bech AP, Hofstra JM, Brenchley PE, Wetzels JFM. Association of anti-PLA(2)R antibodies with outcomes after immunosuppressive therapy in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014 Aug; 9(8):1386-92.
- 72) Haider MZ, Aslam A. Proteinuria. 2022 Dec 13. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan.
- 73) Claudio P. Primary membranous nephropathy: an endless story. *J Nephrol*. 2023 Mar; 36(2): 563-574.
- 74) Huh H, Lee H, Lee JP, Kim DK, Oh, Oh YK, Kim YS, Lim CS. Factors affecting the long-term outcomes of idiopathic membranous nephropathy. *BMC Nephrol*. 2017 Mar 27; 18(1): 104.

- 75) Fishbane S, Spinowitz B. Update on Anemia in ESRD and Earlier Stages of CKD: Core Curriculum 2018. *Am J Kidney Dis.* 2018 Mar; 71(3): 423-435.
- 76) Shiferaw WS, Akalu TY, Aynalem YA. Risk Factors for Anemia in Patients with Chronic Renal Failure: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ethiop J Health Sci.* 2020 Sep; 30(5): 829-842.
- 77) Burbelo PD, Joshi M, Chaturvedi A, Little DJ, Thurlow JS, Waldman M, Olson SW. Detection of PLA2R Autoantibodies before the Diagnosis of Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2020 Jan; 31(1):208-217.



