

Obilježja bolesnika s nefropatijom tankih glomerularnih bazalnih membrana udruženom s fokalnom segmentalnom glomerulosklerozom

Horaček, Matija

Doctoral thesis / Disertacija

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:639661>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-29**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Matija Horaček

**Obilježja bolesnika s nefropatijom tankih
glomerularnih bazalnih membrana
udruženom s fokalnom segmentalnom
glomerulosklerozom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2023.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Matija Horaček

**Obilježja bolesnika s nefropatijom tankih
glomerularnih bazalnih membrana
udruženom s fokalnom segmentalnom
glomerulosklerozom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2023.

Disertacija je izrađena na Zavodu za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Odjelu za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Dubrava, Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Danica Galešić Ljubanović, dr. med.

ZAHVALE: Zahvaljujem prof. dr. sc. Danici Galešić Ljubanović na cjelovitom i konstruktivnom mentorstvu i vodstvu pri izradi disertacije. Zahvaljujem i ostalim članovima istraživačke skupine: dr. sc. Petru Šenjugu za pomoć pri prikupljanju kliničkih i patohistoloških podataka i mjerenju debljine glomerularne bazalne membrane; Mariji Šenjugu Perica, dr. med. za pomoć pri prikupljanju kliničkih podataka; prof. dr. sc. Tamari Nikuševoj Martić, dr. sc. Saniji Kuzmac i Sunčani Sikirić, mag. biol. exp. za pomoć pri provedbi izolacije DNA i sekvenciranja te bioinformatičkoj analizi varijanti; prof. dr. sc. Franu Borovečkom i dr. sc. Kristini Gotovac Jerčić za provedbu dijela sekvenciranja u Centru za translacijsku medicinu i klinička istraživanja, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu; dr. sc. Maji Oroz za provedbu sekvenciranja Sangerovom metodom; doc. dr. sc. Frani Paiću za pomoć pri statističkoj obradi podataka. Zahvaljujem zaposlenicima Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na čelu s prof. dr. sc. Svenom Seiwerthom koji su stvorili uvjete kako bi se ovo istraživanje provelo. Također, zahvaljujem i ostalim kolegama i zaposlenicima Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb koji su mi, na bilo koji način, olakšali izradu disertacije. I konačno, hvala obitelji i prijateljima koji su mi bili stalna i neizostavna podrška.

Sadržaj

1. UVOD I SVRHA ISTRAŽIVANJA.....	1
1.1. Glomerularna filtracijska barijera i kolagen tipa IV	1
1.2. Alportov sindrom	4
1.3. Nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana	7
1.4. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza.....	8
1.5. Poremećaji Alportovog spektra	13
1.6. Uloga genske analize u dijagnostici i prognozi poremećaja Alportovog spektra.....	15
1.7. Svrha istraživanja.....	15
2. HIPOTEZA.....	16
3. CILJEVI RADA.....	17
3.1. Opći cilj	17
3.2. Specifični ciljevi	17
4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA.....	18
4.1. Identifikacija ispitanika i prikupljanje podataka	18
4.2. Metodologija mjerenja debljine glomerularne bazalne membrane	20
4.3. Izolacija i sekvenciranje DNA ispitanika	24
4.4. Bioinformatička analiza rezultata sekvenciranja.....	26
4.5. Statistička analiza podataka.....	29
5. REZULTATI	31
5.1. Klinički podaci svih ispitanika u trenutku biopsije bubrega	31
5.2. Klinički podaci svih ispitanika na kraju praćenja.....	36
5.3. Patohistološki podaci svih ispitanika	39
5.4. Klinički podaci ispitanika s varijantama <i>COL4A3</i> , <i>COL4A4</i> i/ili <i>COL4A5</i> gena u trenutku biopsije bubrega.....	43

5.5. Klinički podaci ispitanika s varijantama <i>COL4A3</i> , <i>COL4A4</i> i/ili <i>COL4A5</i> gena na kraju praćenja	47
5.6. Patohistološki podaci ispitanika s varijantama <i>COL4A3</i> , <i>COL4A4</i> i/ili <i>COL4A5</i> gena.....	50
5.7. Rezultati sekvenciranja nove generacije za gene <i>COL4A3</i> , <i>COL4A4</i> i <i>COL4A5</i>	53
5.8. Genotip-fenotip korelacija	57
6. RASPRAVA	63
6.1. Prevalencija poremećaja Alportovog spektra i <i>COL4</i> varijanti.....	63
6.2. Povezanost tankih glomerularnih bazalnih membrana s fokalnom segmentalnom glomerulosklerozom	63
6.3. Varijabilnost fenotipa među bolesnicima s <i>COL4A3</i> , <i>COL4A4</i> i/ili <i>COL4A5</i> varijantom	66
6.4. Nove varijante <i>COL4A3</i> , <i>COL4A4</i> i/ili <i>COL4A5</i> gena.....	69
7. ZAKLJUČCI	70
8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU.....	72
9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLISKOM JEZIKU.....	73
10. POPIS LITERATURE	74
11. ŽIVOTOPIS	85

POPIS OZNAKA I KRATICA

ACE - angiotenzin konvertirajući enzim

ACMG - Američki fakultet medicinske genetike i genomike (engl. *American College of Medical Genetics and Genomics*)

ACTN4 – gen za aktinin $\alpha 4$

ADAS - autosomno dominantan Alportov sindrom

AMP - Udruga za molekularnu patologiju (engl. *Association for Molecular Pathology*)

ANLN – gen za anilin

ARAS - autosomno recesivan Alportov sindrom

ARHGAP24 – gen za protein koji aktivira Rho gvanozin trifosfatazu

ARHGDIA – gen za inhibitor α koji disocira Rho gvanozin difosfat

AS - Alportov sindrom

BMI - indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*)

CD2AP – gen za protein povezan s CD2

CKD - kronična bubrežna bolest (engl. *chronic kidney disease*)

CKD-EPI - Suradnja u epidemiologiji kronične bubrežne bolesti (engl. *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*)

COL4 - kolagen IV

COL4A3 - $\alpha 3$ lanac kolagena IV

COL4A3 - gen za $\alpha 3$ lanac kolagena IV

COL4A4 - $\alpha 4$ lanac kolagena IV

COL4A4 - gen za $\alpha 4$ lanac kolagena IV

COL4A5 - $\alpha 5$ lanac kolagena IV

COL4A5 - gen za $\alpha 5$ lanac kolagena IV

eGFR - procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*)

EM - elektronska mikroskopija

ESRD - završni stadij bubrežne bolesti (engl. *end stage renal disease*)

FSGS - fokalna segmentalna glomeruloskleroza

GBM - glomerularna bazalna membrana

GFB - glomerularna filtracijska barijera

H&E - hemalaun – eozin

HGMD - Baza podataka mutacija ljudskog gena (engl. *The Human Gene Mutation Database*)

HGVS - Društvo za varijacije ljudskog genoma (engl. *Human Genome Variation Society*)

IF – imunofluorescentna mikroskopija

IFTA - intersticijska fibroza i tubularna atrofija

INF2 – gen za obrnuti formin 2

KDIGO – Organizacija za poboljšanje globalnih ishoda u bubrežnim bolestima (engl. *Kidney Disease: Improving Global Outcomes*)

LAMA5 – gen za $\alpha 5$ podjedinicu laminina

LAMB2 – gen za $\beta 2$ podjedinicu laminina

MYO1E – gen za miozin 1E

NGS - sekvenciranje nove generacije (engl. *next-generation sequencing*)

NPHS1 – gen za nefrin

NPHS2 – gen za podocin

PAS - histokemijsko bojenje Perjodna kiselina, Schiffov reagens

PCR - lančana reakcija polimeraze (engl. *polymerase chain reaction*)

PAX2 – gen za Pax-2 protein

PLCE1 – gen za fosfolipazu C ϵ 1

RAAS - renin-angiotenzin-aldosteronski sustav

SM - svjetlosna mikroskopija

SRNS - steroid rezistentni nefrotski sindrom

TBMN - nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana (engl. *thin basement membrane nephropathy*)

TKM - histokemijsko bojenje Masson trikrom

TRPC6 – gen za kationski kanal prijelaznog receptora član 6 obitelji C

VUS - varijanta nepoznatog značaja (engl. *variant of uncertain significance*)

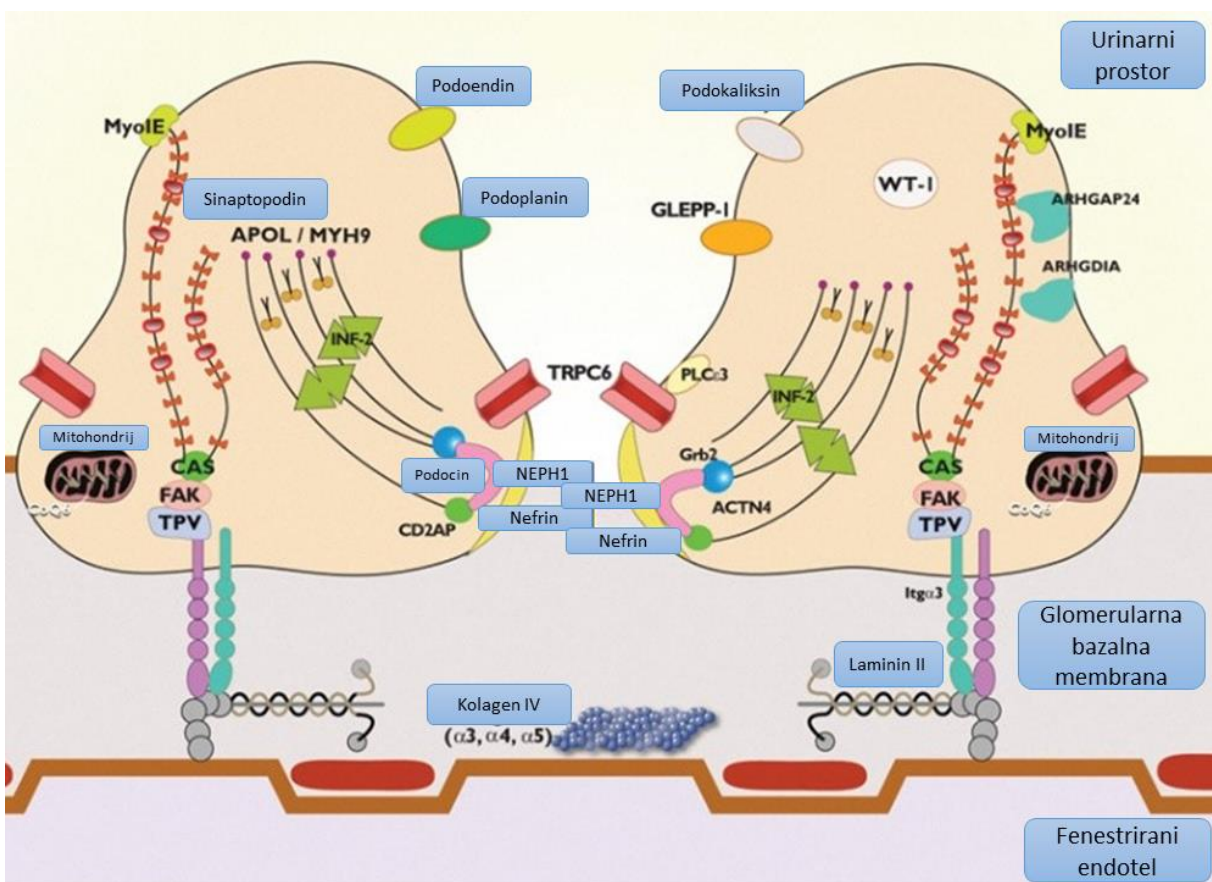
WT1 – gen za WT1 transkripcijski čimbenik

XAS - X-vezani Alportov sindrom

1. UVOD I SVRHA ISTRAŽIVANJA

1.1. Glomerularna filtracijska barijera i kolagen tipa IV

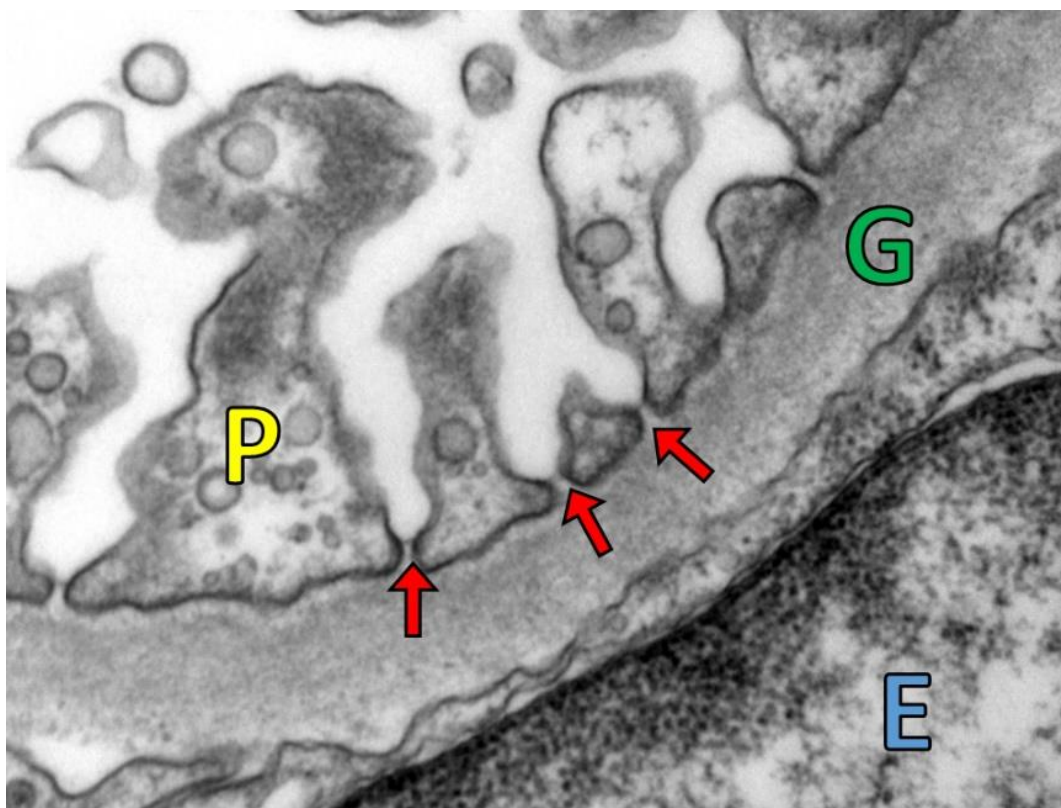
Glomerularnu filtracijsku barijeru (GFB) čine endotel kapilara, glomerularna bazalna membrana (GBM) i visceralni epitel odnosno podociti, a selektivno je propusna za molekule plazme i to po principu veličine i naboja molekule (sl. 1).



Slika 1. Struktura glomerularne filtracijske barijere (preuzeto i prilagođeno prema Rheault MN, Gbadegesin RA. The Genetics of Nephrotic Syndrome. J Pediatr Genet. 2016 Mar;5(1):15-24.) (1).

Podociti su visoko diferencirane stanice koji se sastoje od tijela stanice, primarnih nastavaka i sekundarnih nastavaka (tzv. nožice podocita). Nožice podocita se

međusobno isprepliću i prekrivaju vanjsku površinu GBM-a, a između nožica se nalazi filtracijska pukotina (sl. 2).

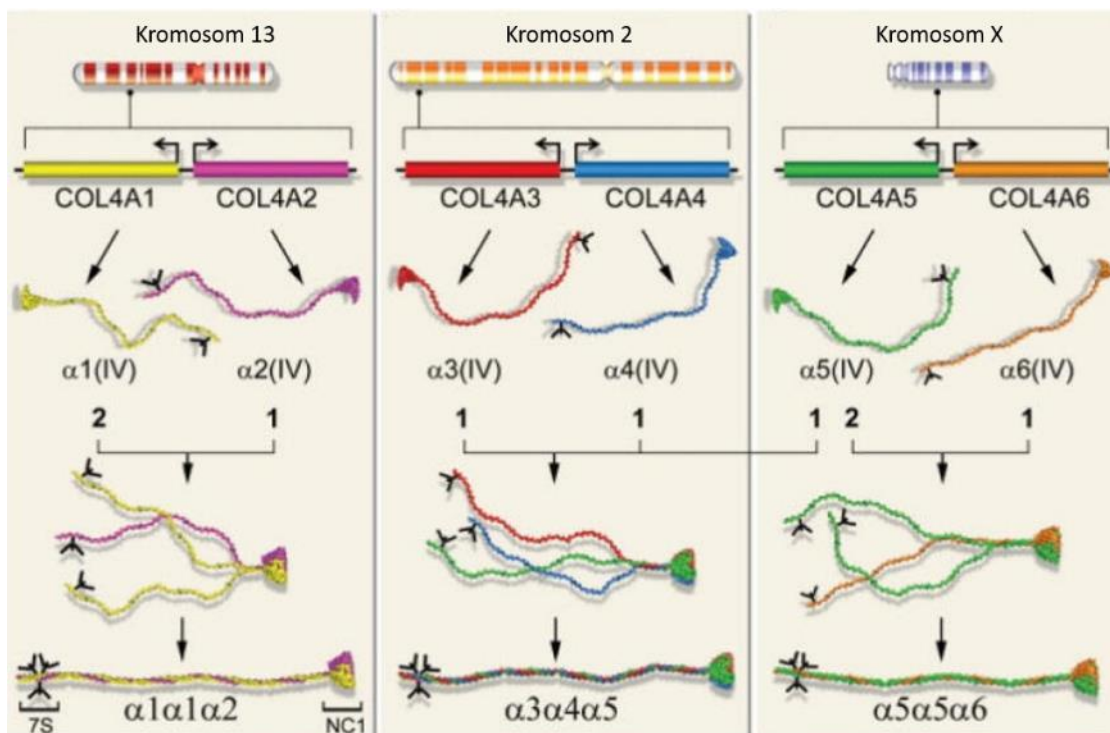


Slika 2. Glomerularna filtracijska barijera. Strelice prikazuju filtracijske pukotine između nožica podocita. E – jezgra endotelne stanice. G – glomerularna bazalna membrana. P – nožice podocita. EM 50 000 x.

Filtracijska pukotina je struktura koju čini mreža proteina koju kodiraju geni kao što su *NPHS1*, *NPHS2*, *PLCE1*, *TRPC6* i *CD2AP*, a koji su međusobno povezani čineći pravokutne pore dimenzija približno 4 x 14 nm u presjeku i 7 nm u duljini. Navedeni proteini su povezani s proteinima citoskeleta susjednih nožica podocita koje kodiraju geni *ACTN4*, *ANLN*, *ARHGAP24*, *ARHGDIA*, *INF2* i *MYO1E* i na taj način čine kontinuiranu strukturu koja regulira prolaz molekula preko GFB-a (1-3).

GBM je kompleksna struktura koja čini podlogu endotelnim stanicama s intrakapilarne strane i podocitima s urinarne strane, a građena je od umreženih makromolekula kao što su kolagen tipa IV (COL4), laminin, nidogen i sulfatizirani proteoglikani (4). Najbitnija komponenta GBM-a je COL4, trimer koji nastaje kombinacijom tri od mogućih šest α lanaca. Geni *COL4A1* i *COL4A2* se nalaze na dugom

kraku trinaestog kromosoma i kodiraju lance $\alpha 1$ i $\alpha 2$, *COL4A3* i *COL4A4* se nalaze na dugom kraku drugog kromosoma i kodiraju lance $\alpha 3$ i $\alpha 4$, a *COL4A5* i *COL4A6* se nalaze na dugom kraku X kromosoma i kodiraju lance $\alpha 5$ i $\alpha 6$ (4, 5). Iako je moguć veliki broj kombinacija ovih šest α lanaca, u bazalnim membranama nalazimo samo tri kombinacije: $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ i $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (sl. 3). Kolagen tipa IV u GBM dominantno je građen od $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ trimera.



Slika 3. Organizacija gena za lance kolagena IV i struktura različitih trimera kolagena IV (preuzeto i prilagođeno prema Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. Microsc Res Tech. 2008 May;71(5):357-70.) (6).

Svih šest lanaca kodira 50 egzona, a građeni su od 1600 aminokiselina. Svaki α lanac na jednom kraju sadrži N-terminalnu 7S domenu sačinjenu od 25 aminokiselina, a na suprotnom C-terminalnom kraju nekolagenu domenu sačinjenu od 230 aminokiselina. Između se nalazi kolagena domena sačinjena od 1400 aminokiselina, a sadrži karakteristične Gly-X-Y sljedove što je osobitost svih tipova kolagena. Unutar kolagene domene nalazi se 22 do 26 prekida koji čine molekulu kolagena tipa IV fleksibilnijom što

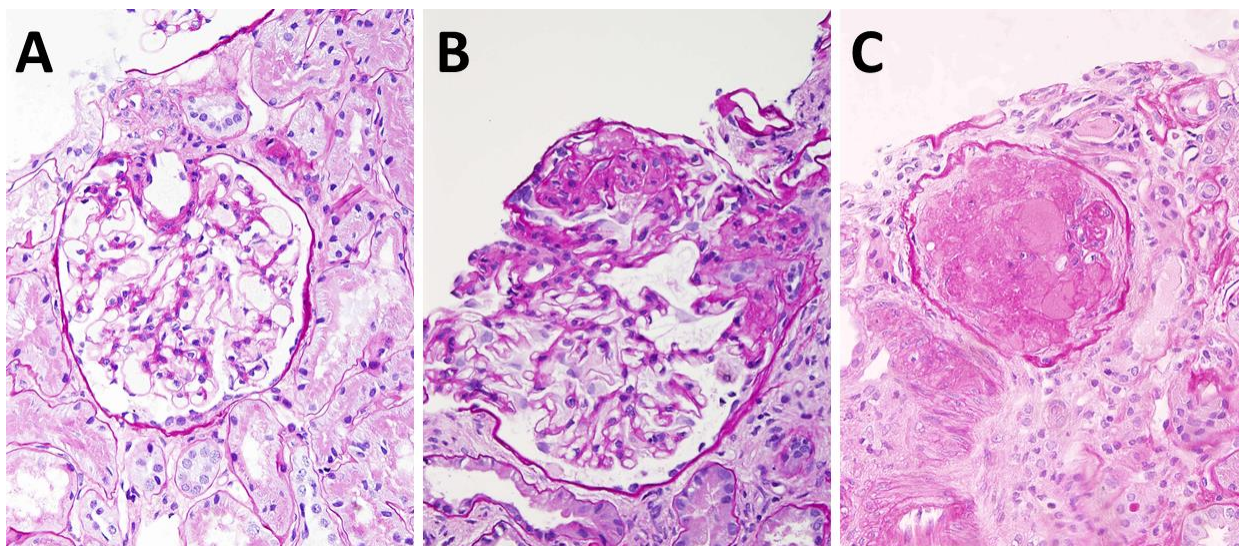
omogućuje stvaranje kolagene mreže te služe kao područja međulančanog umrežavanja i povezivanja sa stanicama (7-9).

1.2. Alportov sindrom

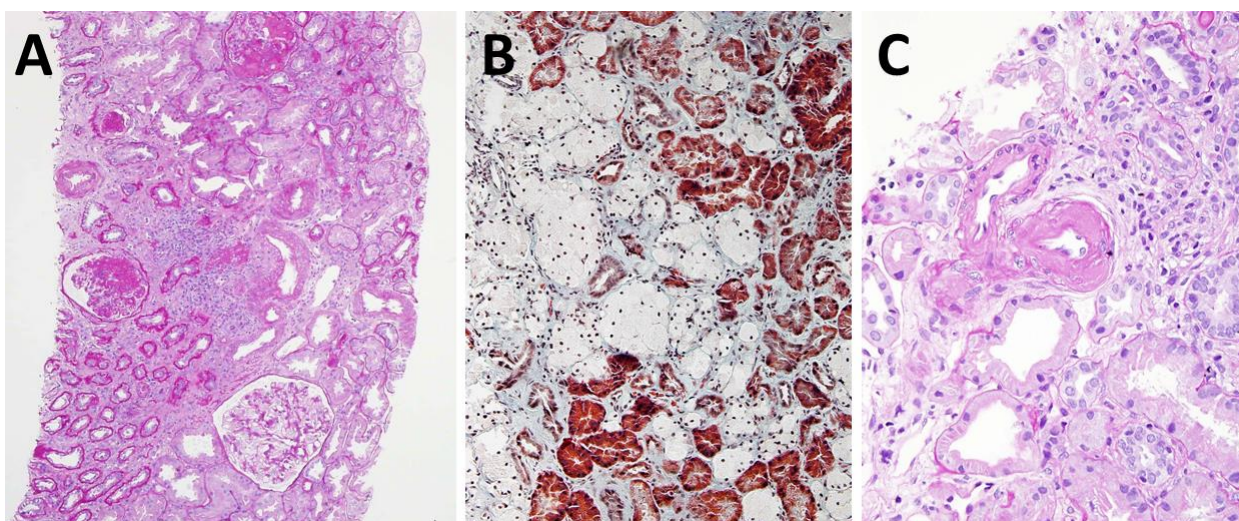
Alportov sindrom (AS) je genetski poremećaj strukture GBM-a uzrokovan varijantama gena *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* odgovornima za sintezu $\alpha 3$, $\alpha 4$ i $\alpha 5$ lanaca COL4 (4, 10-12). Klinička slika varira u dobi pojave i težini simptoma te brzini progresije bolesti, što ovisi o vrsti i lokaciji patogene varijante te obliku nasljeđivanja. Starija literatura navodi prevalenciju AS-a od 1 : 5000, međutim, to nije sasvim precizno (13). AS je prvi opisao Arthur Cecil Alport 1927. godine (14), a da se radi o strukturnom poremećaju koji zahvaća GBM su ustanovili Spear i Slusser 1972. godine pomoću elektronskog mikroskopa (EM) (15). Genetski čimbenik kao uzrok AS-a su prvi opisali Barker i suradnici 1990. godine kada su objavili da je X-vezani AS (XAS) posljedica varijanta gena *COL4A5* (16). Nedugo nakon toga je dokazano da i autosomne varijante gena *COL4A3* i *COL4A4* uzrokuju AS (17, 18).

Za AS ne postoji potpuno adekvatna terapija. Dosadašnja istraživanja su pokazala da rana dijagnoza i empirijska primjena inhibitora angiotenzin konvertirajućeg enzima (ACE inhibitori) smanjuje proteinuriju i usporava progresiju bolesti (19, 20).

Najčešći uzrok (65 %) AS-a su varijante gena *COL4A5* na X kromosomu (21). To je klasični ili XAS koji se klinički očituje hematurijom sa ili bez epizoda makrohaturije. Ostali znakovi bolesti su senzorneuralni gubitak sluha za tonove visokih frekvencija, oftalmološke promjene (prednji lentikonus, makularne pjege, kornealne endotelne vezikule, rekurentne kornealne erozije i katarakte), proteinurija, hipertenzija i konačno, zatajenje bubrega (7, 8, 12, 22, 23). Gubitak sluha se javlja u 70 %, a lentikonus u 30 % bolesnika do 4. desetljeća života (24). Zbog modaliteta nasljeđivanja u muškaraca se simptomi javljaju u ranijoj dobi u odnosu na žene te su izraženiji. U 60 % bolesnika do 30. godine života dolazi do progresije u kroničnu bubrežnu bolest (CKD, engl. *chronic kidney disease*), a u 90 % do 40. godine, uz pretpostavku da nije bilo terapijske intervencije (21). U početnom stadiju bolesti svjetlosna mikroskopija (SM) je uredna, a kasnije su uočljive promjene kao što su segmentalna skleroza glomerula, intersticijska fibroza i tubularna atrofija te pojava pjenušavih makrofaga u intersticiju (sl. 4 i 5) (8, 12, 13, 25).

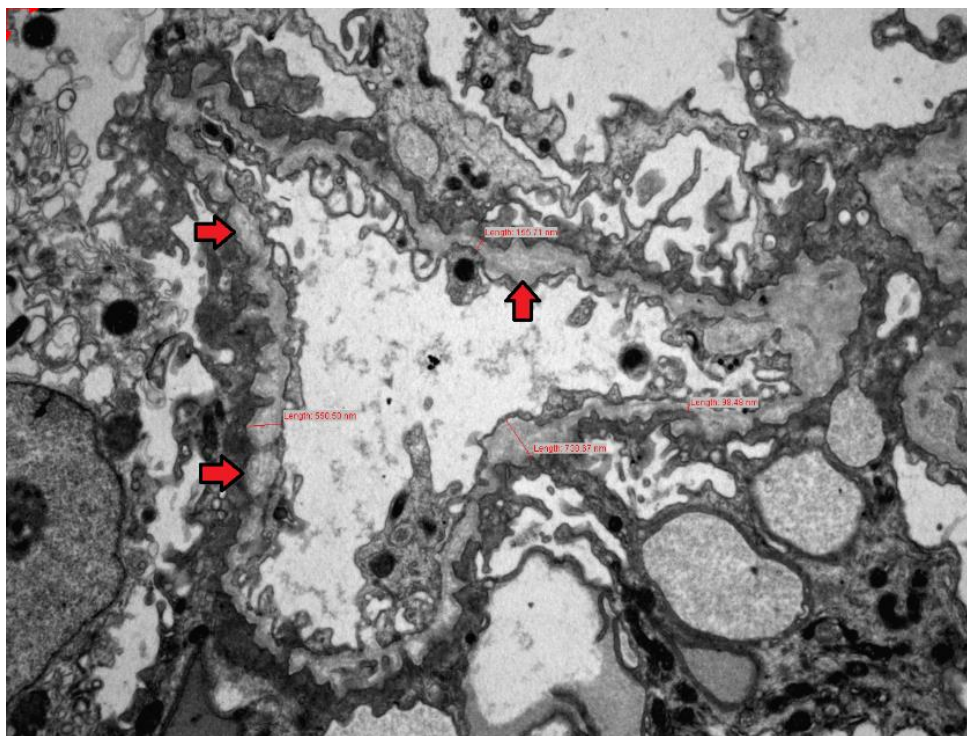


Slika 4. A) Glomerul uredne morfologije u bolesnika s AS-om. PAS 400 x. B) Segmentalna skleroza u glomerulu bolesnika s AS-om. PAS 400 x. C) Potpuno vezivno promijenjen glomerul u bolesnika s AS-om. PAS 400 x.



Slika 5. Kronične promjene u bolesnika s uznapredovalim AS-om; A) Izražena intersticijska fibroza i tubularna atrofija. PAS 100 x. B) Brojne nakupine pjenušavih stanica u intersticiju. Trikromno bojenje po Massonu 200 x. C) Hijalinoza arteriole u cijelom opsegu stijenke. PAS 400 x.

Glavna ultrastrukturalna obilježja, vidljiva pomoću EM-a, su izmjene tankih dijelova i zadebljanja GBM-a, fragmentacija i lameliranje GBM-a, pojava sitnih granula unutar GBM-a te nepravilnost vanjske konture GBM-a (sl. 6) (5, 26-29).



Slika 6. Ultrastrukturne promjene GBM-a karakteristične za AS. Stanjenja i zadebljanja GBM te lameliranje (strelice). EM 8 000 x.

Gotovo sve bolesnice (95 %) s XAS-om imaju hematuriju, a većina (75 %) s vremenom razvije i proteinuriju, 40 % gubitak sluha, a 12 % do 30 % razvije CKD u dobi od 40 do 60 godina (21, 24, 30-32).

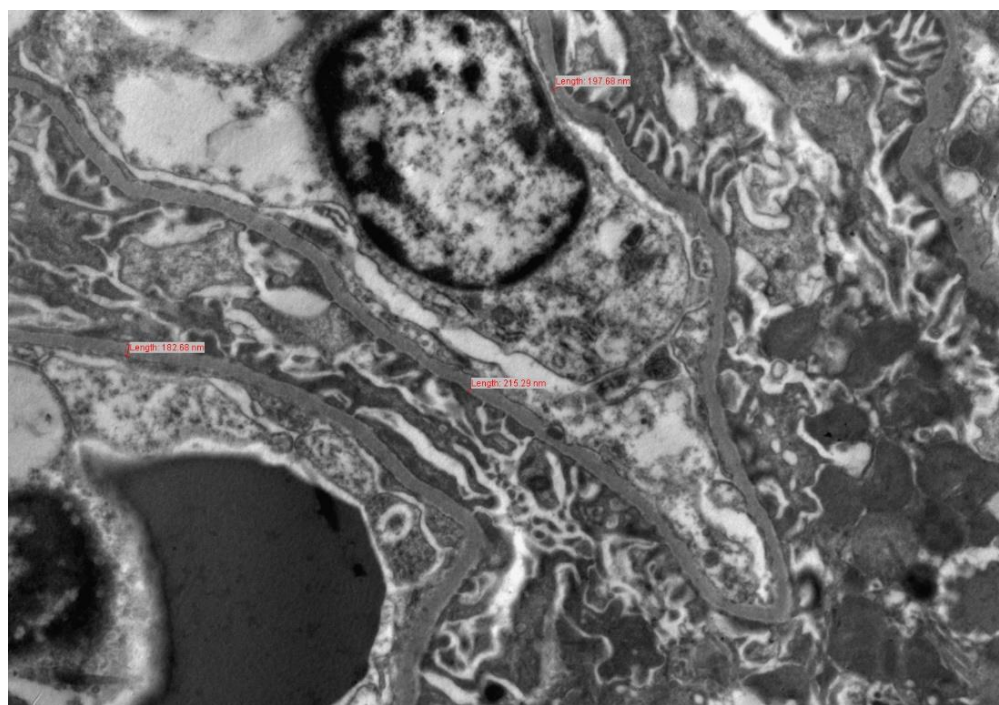
Autosomno dominantni AS (ADAS) se javlja u 20 %, a autosomno recesivni AS (ARAS) u 15 % oboljelih (21). Uzrok su varijante u *COL4A3* i/ili *COL4A4* genu. I muškarci i žene s ARAS-om imaju podjednako izražene simptome, slične muškim bolesnicima s XAS-om. Na ARAS treba posumnjati ukoliko je bolest sporadična te se javlja u jednoj generaciji, u obiteljima gdje su muški i ženski članovi zahvaćeni jednakom učestalošću i izraženošću simptoma te u slučaju konsangviniteta (24, 33). Bolesnici s ADAS-om imaju varijabilnu kliničku sliku neovisno o spolu, od izolirane hematurije do razvoja fokalne segmentalne glomeruloskleroze (FSGS) i kasnije progresije u završni stadij bubrežne bolesti (ESRD, engl. *end stage renal disease*) (34-36).

Termin ADAS je još uvijek predmet rasprave. U novijoj literaturi se spominju digenski i tzv. složeni (engl. *compound*) heterozigotni oblici nasljeđivanja. Digenski oblici podrazumijevaju nasljeđivanje primarne, patogene varijante u jednome od gena za lance

COL4 i dodatne varijante u nekom drugom lancu COL4 ili u genima koji kodiraju proteine za GFB-a. Složeni heterozigoti podrazumijevaju nasljeđivanje dviju varijanti unutar istog gena u kojemu je prisutna patogena varijanta. U oba slučaja smatra se da dodatna patogena i/ili varijanta nesigurnog značaja može pridonijeti izraženijoj kliničkoj slici s pojavom simptoma izvan bubrega i ranijom pojavom FSGS-a te progresijom u ESRD (37).

1.3. Nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana

Glavna klinička karakteristika nefropatije tankih glomerularnih bazalnih membrana (TBMN) je perzistentna mikroskopska hematurija sa samo povremeno pridruženom proteinurijom (38, 39). Najčešći nalaz na SM-u je normalna histologija glomerula, a na EM-u difuzno stanjena GBM-a (sl. 7) (40).

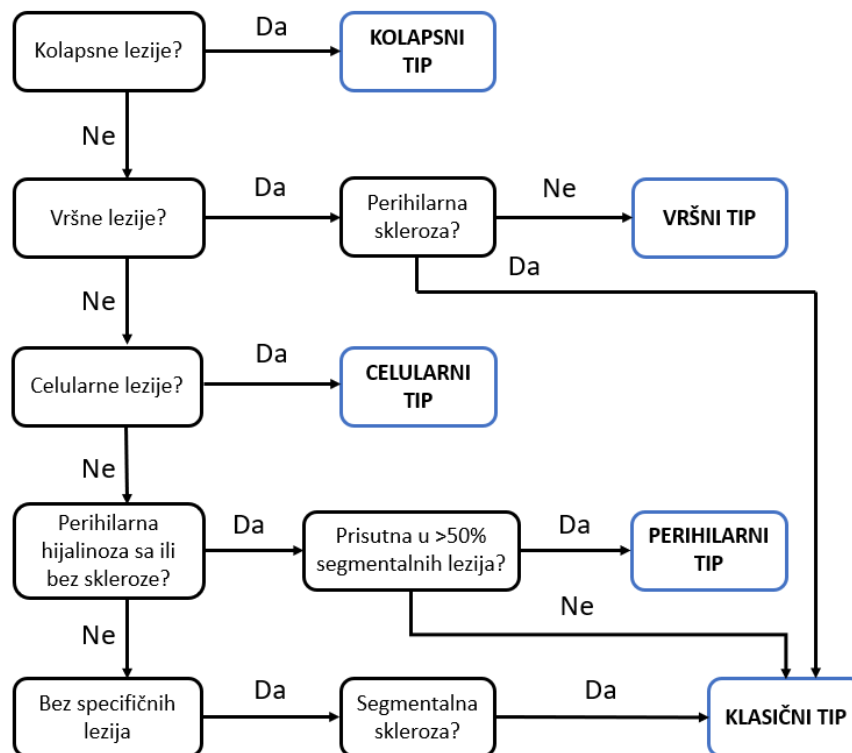


Slika 7. Difuzno, jednoliko stanjena glomerularna bazalna membrana. EM 8 000 x.

U više istraživanja uočena je korelacija TBMN-a s heterozigotnim *COL4A3* i/ili *COL4A4* varijantama i benignom obiteljskom hematurijom (10, 41-46). Međutim, novija istraživanja su pokazala da nisu svi heterozigotni nosioci *COL4A3* i/ili *COL4A4* varijanti imali benignan tijek bolesti, već su pojedinci imali progresivan tijek s hematurijom, hipertenzijom i CKD-om (17, 18, 47-49). Rezultati tih istraživanja su pokazali da će se kod određenog broja bolesnika razviti FSGS s progresijom u CKD (50-54). Neki autori za takve pacijente koriste naziv ADAS. Drugi pak smatraju da je bolje koristiti naziv TBMN. Argumenti korištenja TBMN-a kao termina su činjenica da većina pacijenata iz te skupine nema gubitak sluha, oftalmološke promjene ili lameliranje GBM-a, da je vjerojatnost progresije u CKD niska te da bi postavljanje dijagnoze AS-a imalo nepotreban negativan psihološki utjecaj na pacijenta zbog svih komplikacija koje se opisuju uz AS, a u većine tih bolesnika će bubrežna funkcija ostati normalna (8, 24, 55). Stoga su Savige i suradnici u svojim smjernicama odbacili termin ADAS te se priklonili terminu TBMN iako prepoznaju nedostatke ovakve terminologije (55). Druga grupa stručnjaka zagovara klasificiranje heterozigotnih *COL4A3* i/ili *COL4A4* varijanti kao autosomni AS s ciljem redefiniranja termina TBMN-a, smatrajući kako je prisutnost tankih membrana samo patološka promjena prisutna kod nekih pacijenata s XAS-om, ARAS-om i heterozigotnim *COL4A3* i/ili *COL4A4* varijantama (35).

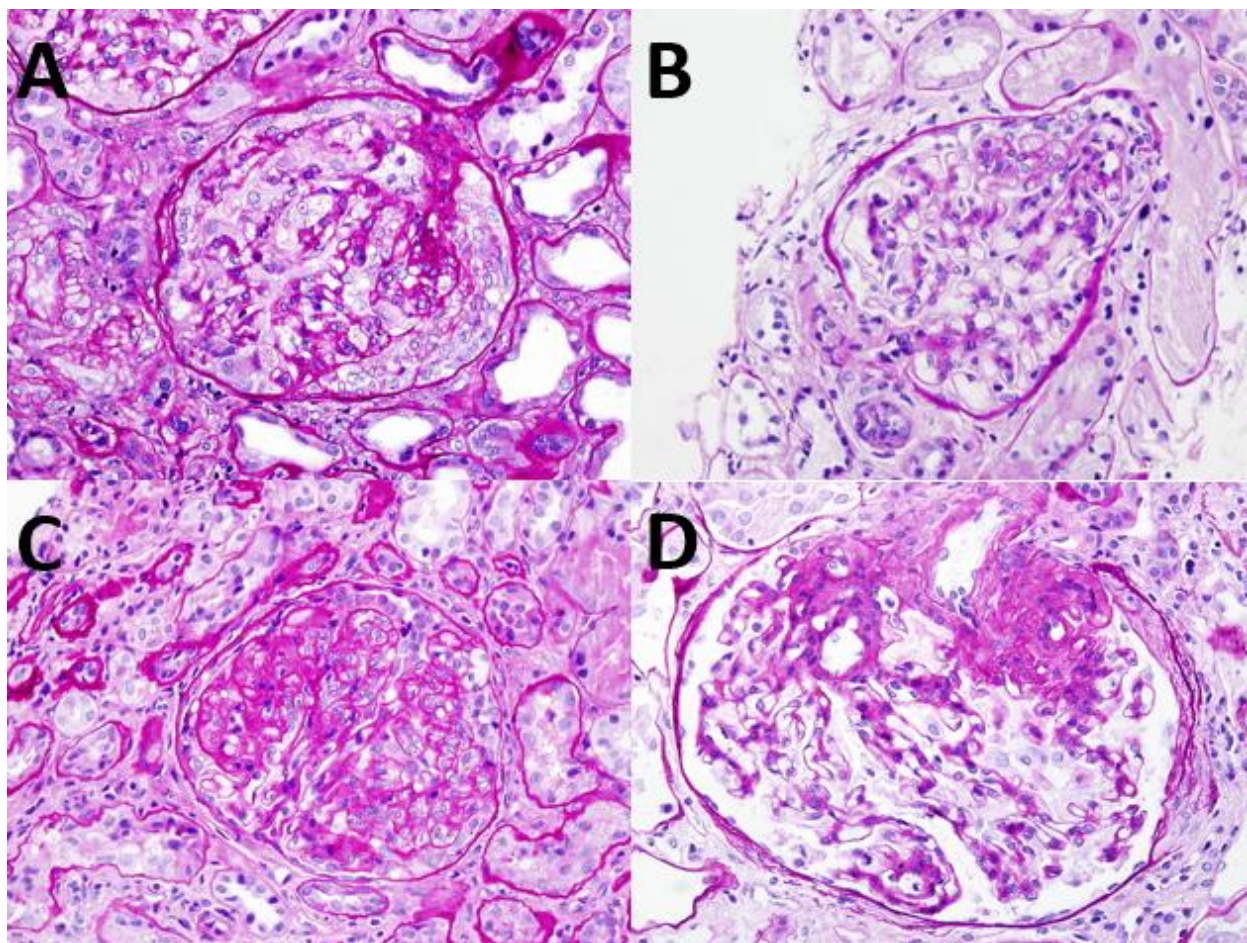
1.4. Fokalna segmentalna glomeruloskleroza

FSGS je histološka lezija koja se na svjetlosnoj mikroskopiji uzoraka biopsije bubrega vidi kao prisutnost skleroze u dijelovima nekih glomerula (56). FSGS, kao zasebni kliničko-patološki entitet, postoji od 1970. godine (57). S vremenom je uočeno da različiti morfološki tipovi FSGS-a imaju različito prognostičko značenje i zahtijevaju različit terapijski pristup. S ciljem standardiziranja kriterija patološke klasifikacije, D'Agati i suradnici su 2003. godine na Kolumbijskom sveučilištu predložili radnu klasifikaciju morfoloških tipova FSGS-a i odredili uključujuće i isključujuće kriterije za svaki tip (sl. 8).



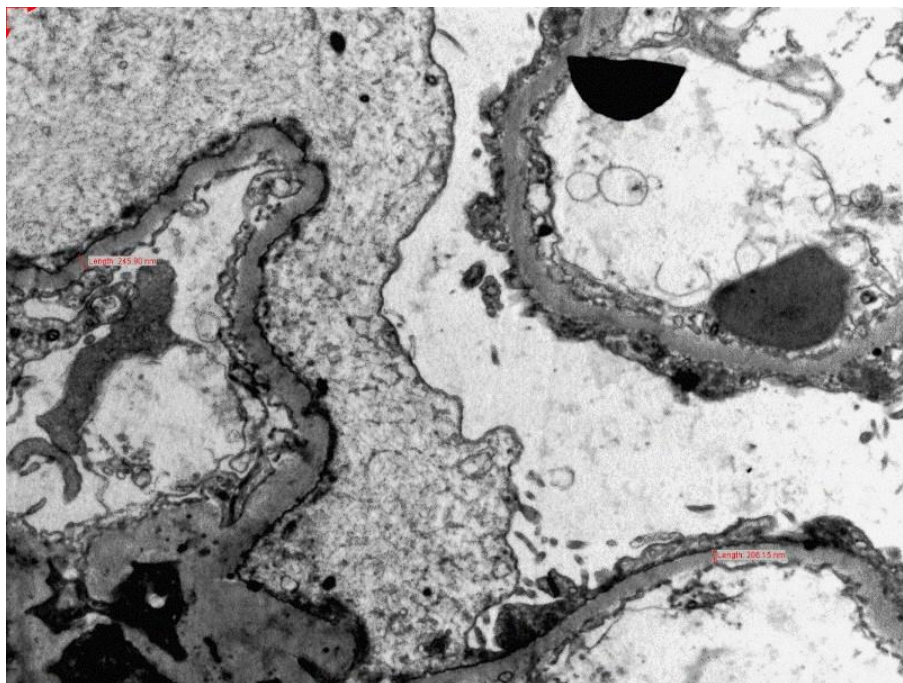
Slika 8. Algoritam i kriteriji za dijagnozu tipova FSGS-a prema Kolumbijskoj klasifikaciji. Prilagođeno prema shemi Fogo AB, Kashgarian M. Diagnostic Atlas of Renal Pathology. 3. izd. Philadelphia (PA): Elsevier Inc.; 2017 (58).

Prema toj klasifikaciji postoji pet tipova FSGS: klasični (bez drugih osobitosti), perihilarni, celularni, vršni i kolapsni (sl. 9) (59-61).



Slika 9. Histološki tipovi FSGS-a prema Kolumbijskoj klasifikaciji. A) Kolapsni tip. PAS 400 x. B) Vršni tip. PAS 400 x. C) Celularni tip. PAS 400 x. D) Perihilarni tip. PAS 400 x.

Prema etiološkoj klasifikaciji postoje četiri oblika FSGS-a: primarni, sekundarni, genski i FSGS neodređenog uzroka (62). Primarna FSGS je podocitopatija uzrokovana još neidentificiranim cirkulirajućim čimbenikom koji ima štetan učinak na podocyte. Tipičan nalaz je difuzni gubitak nožica podocita na EM-u (sl. 10) te klinički teška proteinurija i nefrotski sindrom. Primarna FSGS dobro odgovara na imunosupresivnu terapiju (63).



Slika 10. Stanjena glomerularna bazalna membrana te difuzni gubitak nožica podocita kod bolesnika s primarnim FSGS-om udruženim s nalazom TBMN-a. EM 8 000 x.

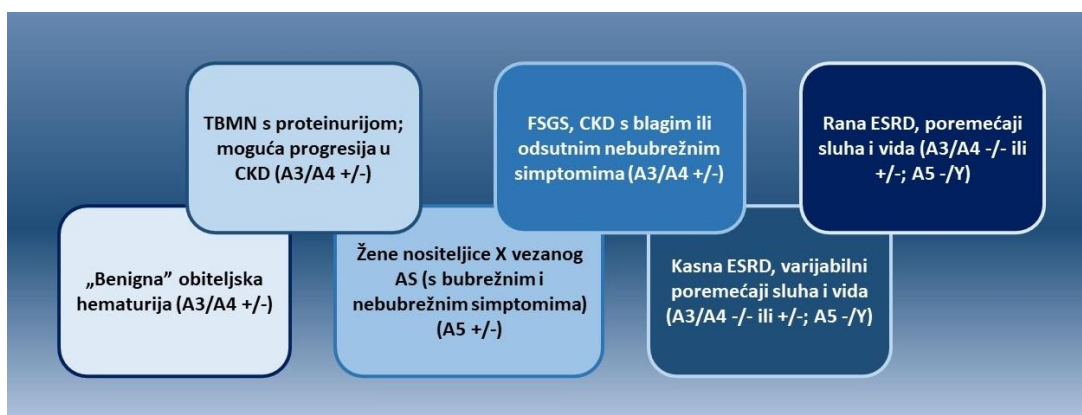
Sekundarno se FSGS javlja kao posljedica glomerularne hiperfiltracije, djelovanja toksina ili smanjenja ukupnog broja glomerula. Sekundarnu FSGS obilježava fokalni gubitak nožica podocita te klinički subnefrotska proteinurija bez jasnog nefrotskog sindroma. Liječenje sekundarne FSGS podrazumijeva uklanjanje uzročnog čimbenika, smanjenje hemodinamskog opterećenja glomerula, smanjenje tjelesne mase i smanjenje proteinurije obično uz korištenje ACE inhibitora (64). Pojam 'genska FSGS' nastao je kao posljedica otkrića gena čiji se proteinski produkti nalaze unutar podocita i GBM-a pa njihove varijante dovode do oštećenja GFB-a s posljedičnom proteinurijom (1-3, 65, 66). Kliničke manifestacije se razlikuju po životnoj dobi u kojoj počinju simptomi, penetraciji gena, (ne)prisutnosti nefrotskog sindroma te progresiji u CKD. Genska FSGS se uglavnom javlja u djetinjstvu, ali je moguća pojavnost i u odrasloj dobi. Otkriveno je više od 50 gena (npr. *NPHS1*, *NPHS2*, *LAMB2*, *LAMA5*, *PLCE1*, *MYO1E*, *ACTN4*, *WT1*, *CD2AP*, *TRPC6*, *ANLN*, *INF2*, *PAX2*) povezanih s monogenskom FSGS ili steroid rezistentnim nefrotskim sindromom (SRNS). Identifikacija gena uključenih u nastanak SRNS-a istaknula je podocyte i GFB kao primarno mjesto patogeneze SRNS-a (1, 67, 68).

Zadnjih godina su identificirane *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* varijante kod pacijenata s genskom FSGS (51, 53, 68-71). Iako se TBMN, uzrokovana autosomnim *COL4* varijantama, godinama smatrala benignim poremećajem s dugoročno odličnom prognozom, nekoliko publikacija uvjerljivo pokazuju da to nije točno (17, 18, 49). Rezultati tih studija pokazuju da je određen broj pacijenata razvio proteinuriju i FSGS te progredirao u CKD (50). Deltas i suradnici su u istraživanju iz 2007. godine opisali 116 bolesnika iz 13 obitelji s Cipra sa simptomima od izolirane hematurije do CKD-a. Učinjeno je 20 biopsija bubrega kojima je potvrđena FSGS na SM-u i TBMN na EM-u. Sekvenciranje tada poznatih gena povezanih s genskom FSGS-om dalo je negativne rezultate pa je dodatno učinjeno sekvenciranje *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* gena. U 70 % pacijenata bila je prisutna heterozigotna varijanta u *COL4A3* ili *COL4A4* genu čime je potvrđena dijagnoza TBMN-a udruženog s FSGS-om. Tome u prilog išla je i činjenica da na EM-u, osim jednoliko stanjenih GBM-a, nije bilo znakova AS-a. Također, pacijenti nisu imali poteškoća s vidom i sluhom što bi također upućivalo na AS. Daljnjim praćenjem utvrđeno je da je kod 38 % bolesnika došlo do progresije u CKD, a kod 19,5 % u ESRD. Unutar iste skupine, u ispitanika starijih od 51 godinu, u njih 80 % je došlo do progresije u CKD, a u 46 % u ESRD. Zaključili su da je hematurija jedini znak bolesti do otprilike 3. desetljeća života nakon čega se javlja proteinurija, a nakon 50. godine života uz hipertenziju, javljaju se i znakovi CKD-a s konačnom progresijom u ESRD (49). Ista skupina je kasnije opisala 250 bolesnika iz 68 obitelji s Cipra, a istraživanje je polučilo slične zaključke. Autori smatraju da kod bolesnika s *COL4* varijantom i nalazom FSGS-a na SM-u i/ili izraženijom kliničkom slikom postoji dodatna, neprepoznata varijanta, genski modifikator ili neki drugi čimbenik koji je uz *COL4* varijantu sinergistički odgovoran za razvoj težeg fenotipa (50). Gast i suradnici su otkrili *COL4* varijante u 38 % obitelji s genskom FSGS i 3 % sa sporadičnom FSGS, a više od pola varijanti zahvaćalo je *COL4A5* gen. Pacijenti s *COL4* varijantama su bili mlađe dobi kod pojave simptoma te su češće imali pozitivnu obiteljsku anamnezu, hematuriju i abnormalnosti GBM-a (51).

1.5. Poremećaji Alportovog spektra

U zadnjih 20 godina istraživanja AS-a i TBMN-a usmjerena su na genotip-fenotip korelaciju. Nekoliko istraživanja je opisalo čitav spektar fenotipa uzrokovanih *COL4A5* varijantama (istraživanje genotip-fenotip korelacije za XAS) te utvrdilo da lokacija i tip varijante u velikoj mjeri određuju tijek kliničke slike (intenzitet, brzina progresije do CKD-a) (31, 72-74).

Miner je 2014. godine napisao da je *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* varijante, koje imaju klinički različite, a ultrastrukturno slične manifestacije, najbolje shvatiti kao spektar AS-a. To bi obuhvatilo sve poremećaje koji se na jednom kraju spektra očituju kao benigna obiteljska hematurija (bez posljedičnog učinka na funkciju bubrega), a na drugom kao klasični AS s nedetektabilnim COL4 u GBM-u, konačnom progresijom u CKD, slušnim i vidnim smetnjama - te sve između tih dviju krajnosti (sl. 11).



Slika 11. Poremećaji Alportovog spektra (preuzeto i prilagođeno prema Miner JH. Pathology vs. molecular genetics: (re)defining the spectrum of Alport syndrome. Kidney Int. 2014;86(6):1081-3) (11).

S obzirom da varijanta koja uzrokuje hematuriju kod nekog pojedinca može u drugoga uzrokovati progresivnu bubrežnu bolest, Miner je također izjavio da bi klasifikacija tih poremećaja u određene dijelove spektra AS-a bila korisna za kliničare, ali i za pacijente i njihove obitelji kako bi bili upoznati s realnim rizikom bubrežne bolesti (11).

Savage i suradnici su 2018. godine objavili smjernice u kojima navode da kod heterozigotnih *COL4A3* i *COL4A4* varijanti često neće doći do lameliranja GBM-a i progresije u CKD, ali je fenotip i dalje varijabilan. Kod bolesnika koji razviju CKD, uzrok

težeg fenotipa može biti dodatna, neprepoznata varijanta u COL4 genima, ali i drugim genima koji kodiraju proteine GFB-a i podocita, zatim neka druga bolest glomerula (npr. IgA nefropatija, FSGS) ili ostali komorbiditeti (hipertenzija, dijabetes, pretilost, lijekovi) (36). Ista skupina znanstvenika spominje da i nedostatak protektivnih čimbenika (fizička aktivnost, umjeren unos soli i proteina mesnog porijekla, održavanje BMI-a ispod 25 kg/m², izbjegavanje pušenja i održavanje krvnog tlaka) može biti razlog težeg fenotipa (75). Iz navedenih razloga, jedan heterozigotni član obitelji može progredirati u CKD, a drugi, s istom varijantom, ne mora. Smatraju da se termin ADAS ne bi trebao koristiti dok se ne istraže navedeni čimbenici, a preferiraju termin TBMN (55).

Novija istraživanja pokazuju da bi varijante u genima povezanim s genskom FSGS mogli imati utjecaj na varijabilnost fenotipa kod heterozigota s istim varijantama COL4A3 ili COL4A4 gena (76-80). U zdravim bubrezima podociti čvrsto prijanjaju na GBM kako bi odoljela filtracijskom tlaku i na taj način održavaju GFB (81). Glomerularno oštećenje dovodi do dediferencijacije podocita, gubitka nožica i nastanka FSGS-a (82). COL4, kao glavna komponenta GBM-a, održava cjelovitost i funkciju GFB-a pa će gubitak $\alpha 3$, $\alpha 4$ ili $\alpha 5$ lanca uzrokovati nestabilnost GBM-a i veće opterećenje podocita (83, 84). Ako uz gubitak COL4 lanca postoji dodatna varijanta gena koji kodira proteine GFB-a i podocita, ona će doprinijeti težem fenotipu i nastanku FSGS-a (85-89). Istraživanja Voskaridesa, Stefanoua i suradnika pokazala su da genski modifikatori doista imaju ulogu u oštećenju bubrega kod bolesnika s COL4 varijantama. Opisali su dvije varijante gena *NPHS2* (p.Arg229Gln i p.Glu237Gln) koji kodira podocin, protein GFB-a funkcionalno povezan s nefrinom, a čije varijante dovode do SRNS-a. Pokusi u staničnim kulturama pokazali su da oštećeni podocin ima slabiju interakciju s ostalim komponentama GFB-a i ometa fiziološki promet molekula preko GFB-a (76, 78). Opisali su i varijantu u genu *NEPH3* koji kodira filtrin, također protein GFB-a, a koja predstavlja povišeni rizik za progresiju u CKD u bolesnika s COL4 varijantama (80). Istraživanja Fresea i sur. te Bullicha i sur. dala su slične rezultate na temelju kojih su zaključili da varijante gena koji kodiraju proteine GFB-a i podocita kod bolesnika s COL4 varijantom doprinose dodatnom oštećenju bubrega, razvoju FSGS i ranijoj progresiji bolesti u CKD (89, 90).

1.6. Uloga genske analize u dijagnostici i prognozi poremećaja Alportovog spektra

Metoda sekvenciranja nove generacije (NGS od engl. *next-generation sequencing*) zlatni je standard u dijagnostici poremećaja Alportovog spektra. Za razliku od prijašnjih metoda, NGS omogućuje paralelno sekvenciranje više gena, a danas je u primjeni i sekvenciranje čitavih egzona i genoma. Također, NGS omogućuje otkrivanje novih, potencijalno patogenih varijanti u genima za koje se dosad nije znalo sudjeluju li u patogenezi određenih bolesti, identifikaciju gena modifikatora i digenskih oblika nasljeđivanja patogenih varijanti (17, 50, 91). Biopsija bubrega daje uvid u stanje tkiva bubrega bolesnika, a sekvenciranje gena otkriva konkretnu varijantu kao uzrok bolesti, njen položaj u genomu te vrstu i učinak koji ima na protein kojeg kodira zahvaćeni gen. Detaljan uvid u genetsku podlogu poremećaja omogućuje bolje razumijevanje fenotipa bolesti kao i bolji terapijski i prognostički pristup svakom pojedinom bolesniku (33).

1.7. Svrha istraživanja

Ovim istraživanjem utvrdit će se kliničke, patohistološke i genetske osobitosti bolesnika s TBMN-om udruženim s FSGS-om te će se omogućiti bolji uvid u genetsku podlogu poremećaja i histološka obilježja bubrega bolesnika uz potencijalno otkrivanje i opisivanje novih varijanti povezanih s Alportovim spektrom poremećaja. Razumijevanje utjecaja određene varijante na težinu i tijek bolesti je osnova adekvatnog terapijskog i prognostičkog pristupa bolesnicima kao i osnova za daljnja istraživanja terapijskih intervencija.

2. HIPOTEZA

Bolesnici s nefropatijom tankih glomerularnih bazalnih membrana udruženom s fokalnom segmentalnom glomerulosklerozom imaju teži klinički tijek bolesti u odnosu na bolesnike s izoliranom nefropatijom tankih glomerularnih bazalnih membrana, a to je djelomice uvjetovano vrstom i težinom varijante kolagena IV.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj

Opći cilj je utvrditi kliničke, patohistološke i genetske karakteristike bolesnika s TBMN-om udruženim s FSGS-om.

3.2. Specifični ciljevi

1. Identifikacija bolesnika s TBMN-om i s TBMN-om udruženim s FSGS-om pregledom registra bubrežnih biopsija Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju KB Dubrava.
2. Određivanje učestalosti izoliranog TBMN-a i TBMN-a udruženog s FSGS-om u registru bubrežnih biopsija Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju, KB Dubrava.
3. Prikupljanje kliničkih i patohistoloških podataka identificiranih bolesnika.
4. Mjerenje debljine GBM-a standardiziranom metodom.
5. Kreiranje rodoslovnih stabala obitelji uključenih ispitanika.
6. Provođenje genetskog testiranja ispitanika sekvenciranjem sljedeće generacije za varijante gena *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5*.
7. Analiza rezultata genetskog testiranja i opis novih varijanti.
8. Provođenje genotip-fenotip korelacije.
9. Usporedba podataka istraživanih skupina ispitanika.

4. ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

Istraživanje je provedeno u sklopu istraživačkog projekta „Genotip-fenotip korelacija u Alportovom sindromu i nefropatiji tankih glomerularnih bazalnih membrana“ koje je financirala Hrvatska Zaklada za Znanost (IP-2014-09-2151). Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (broj: 380-59-10106-15-168/181, klasa: 641-01/15-02/01).

4.1. Identifikacija ispitanika i prikupljanje podataka

Ispitanici su identificirani pretragom registra bubrežnih biopsija Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb te Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Biopsije bubrega uključenih pacijenata učinjene su u razdoblju od 1988. do 2019. godine. Ispitanici su podijeljeni u dvije skupine. Uključni kriterij za prvu skupinu ispitanika (Skupina A) je nalaz TBMN-a na EM-u, a za drugu skupinu (skupina B) nalaz TBMN-a na EM-u i prisutnost FSGS-a na SM-u. Nalaz TBMN-a je određen prema rasponu uredne debljine GBM-a Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava (92). Isključni kriterij za obje skupine bilo je prisustvo imunih depozita u imunofluorescentnoj mikroskopiji (IF) i/ili EM-u. Uključeno je ukupno 100 ispitanika, od čega je 68 svrstano u skupinu A, a 32 u skupinu B. Nakon identifikacije, ispitanike se kontaktiralo, obrazložena im je svrha istraživanja te su potpisali informirani pristanak za sudjelovanje u istraživanju. Informirane pristanke za maloljetne ispitanike potpisali su njihovi roditelji ili skrbnici. Za potrebe genetske analize, ispitanicima je uzet uzorak od 5 ml periferne krvi.

Nakon identifikacije su skupljeni svi dostupni klinički podaci (dob pojave prvih simptoma, prisutnost hematurije i proteinurije, klinički sindrom, podaci o bubrežnoj funkciji, poremećaji sluha i vida, podaci o pušenju, hipertenziji, dijabetesu i ostalim komorbiditetima, podaci o praćenju bubrežne funkcije) i patohistološki podaci (dijagnoza

na temelju patohistološkog nalaza, postotak globalne i segmentalne glomeruloskleroze, postotak i stupanj intersticijske fibroze i tubularne atrofije, prisutnost upale i pjenušavih makrofaga u intersticiju, stupanj kroničnih promjena na arterijama i arteriolama).

Kriterij za mikrohematuriju bio je nalaz barem 5 eritrocita na vidnom polju s povećanjem 400 x. Proteinurija je definirana kao pozitivan rezultat testa trakicom ili proteinurija veća od 300 mg u 24-satnom urinu. Kategorija klinički sindrom odnosila se na skupinu simptoma i znakova kojima se bolest klinički očitovala, a uključuje: izoliranu hematuriju i/ili proteinuriju, nefrotski sindrom, kronični nefritički sindrom i nespecificirano oštećenje bubrega (zatajenje bubrega nepoznate etiologije). Vrijednosti procijenjene brzine glomerularne filtracije (eGFR) izračunate su pomoću CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) jednadžbe za odrasle (<https://www.mdcalc.com/ckd-epi-equations-glomerular-filtration-rate-gfr>) i pedijatrijske Schwartzove jednadžba za djecu (93-95). CKD je definirana kao abnormalnost strukture i/ili funkcije bubrega prisutne dulje od 3 mjeseca s implikacijama na zdravlje (95). CKD stadij 1 podrazumijeva održanu bubrežnu funkciju ($\text{eGFR} \geq 90 \text{ ml/min/1,72 m}^2$) s abnormalnostima mokraćne (hematurija, proteinurija); stadij 2 podrazumijeva blago smanjenu bubrežnu funkciju ($\text{eGFR} = 60 - 89 \text{ ml/min/1,72 m}^2$); stadij 3a blago do umjereno smanjenu bubrežnu funkciju ($\text{eGFR} 45 - 59 \text{ ml/min/1,72 m}^2$); stadij 3b umjereno do izrazito smanjenu bubrežnu funkciju ($\text{eGFR} = 30 - 44 \text{ ml/min/1,72 m}^2$); stadij 4 izrazito smanjenu bubrežnu funkciju ($\text{eGFR} = 15 - 29 \text{ ml/min/1,72 m}^2$), a stadij 5 ($\text{eGFR} < 15 \text{ ml/min/1,72 m}^2$) podrazumijeva ESRD. Nakon prikupljanja, provedena je korelacija kliničkih i patohistoloških podataka s rezultatima genetske analize.

Praćenje bolesnika započelo je biopsijom bubrega i trajalo je do postizanja primarnog ciljnog ishoda ili do kraja 2020. godine. Vremenski period praćenja bio je od 3 mjeseca do 33 godine. Primarni ciljni ishod definiran je kao razvoj ESRD-a (definiran kao $\text{eGFR} < 15 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ili potreba za trajnim bubrežnim nadomjesnim liječenjem) ili smrt bolesnika. Sekundarni ciljni ishod definiran je kao pogoršanje bubrežne ekskrecijske funkcije (trajni pad eGFR za $\geq 50 \%$ od početnih vrijednosti, uz napomenu da su tu isključena prolazna, reverzibilna razdoblja smanjenja eGFR iz bilo kojeg razloga). Analiza doživljenja određena je Kaplan-Meierovom analizom i log-rank (Mantel-Cox) testom.

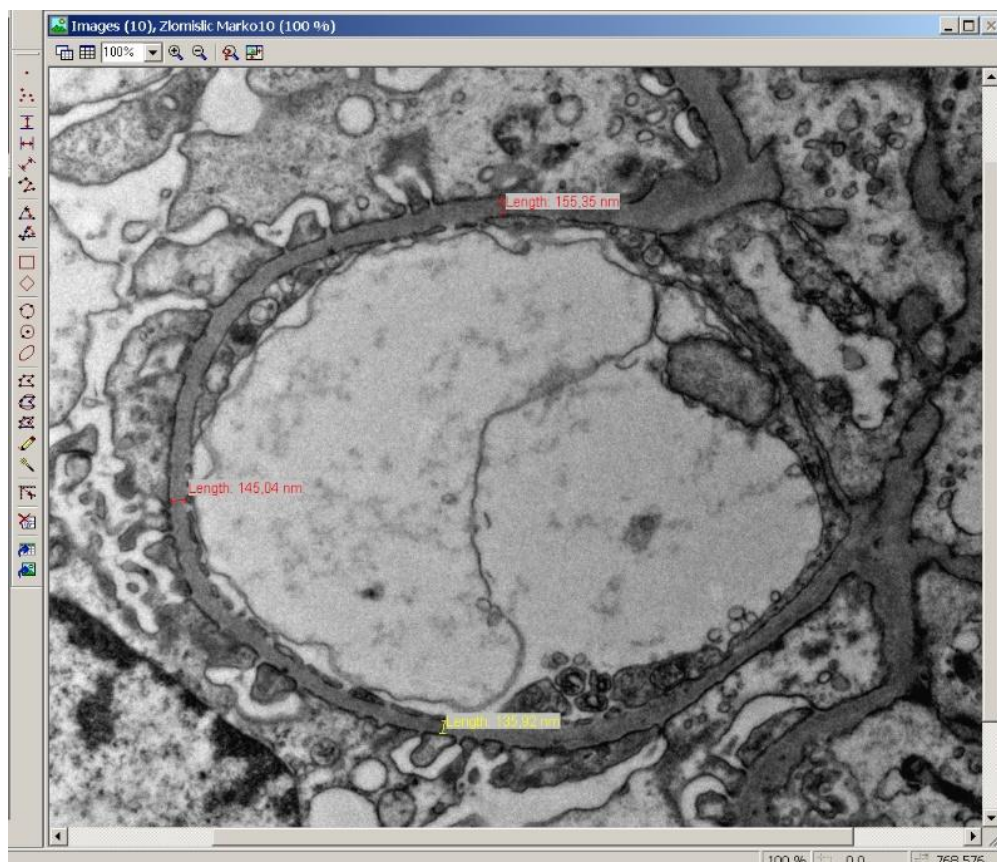
4.2. Metodologija mjerenja debljine glomerularne bazalne membrane

Rutinski, materijal dobiven biopsijom bubrega se pod disekcijskim mikroskopom podijeli na tri dijela, za SM, IF i EM. Tkivo za SM fiksira se u 10 %-tnom puferiranom formalinu, dehidrira u gradijentu alkohola (70 %, 96 % i 100 %), izbistri u ksilolu, uklopi u parafin i serijski se reže pomoću rotacijskog mikrotoma na 50 – 70 rezova debljine 3 µm. Od toga, 40 – 50 rezova naizmjenice se oboji hemalaun-eozinom (H&E), periodnom kiselinom sa Schiffovim reagensom (PAS), Masson trikromnim (TKM) i Jones bojenjem. Preostalih 20 – 30 rezova ostavi se u slučaju potrebe za daljnjom dijagnostičkom obradom. Tkivo za direktnu IF se naglo smrzne na – 20 °C i potom serijski izreže u kriostatu na rezove debljine 4 – 5 µm. Dobiveni rezovi se tretiraju fluoresceinom obilježenim protutijelima za IgG, IgA, IgM, C3, C1q, kappa i lambda lake lance. Tkivo za EM se fiksira u McDowellovom fiksativu nakon čega slijedi postfiksacija 2 %-tnim osmij tetroksidom, kontrastiranje 3 %-tnim uranil acetatom, dehidracija kroz seriju acetona rastuće koncentracije (30 – 100 %) i uklapanje u sintetsku smolu Durcupan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, SAD). Pomoću ultramikrotoma se izrežu polutanki rezovi debljine 0,5 – 1 µm, oboji ih se toluidinom i analizira pomoću SM-a. Dijelovi tkiva u kojima se nalaze glomeruli s okolnim tubulima i intersticijem izrežu se pomoću ultramikrotoma na ultratanke rezove debljine 50 – 100 nm i stave na bakrene mrežice. Mrežica se postavi na nosač EM-a (JEOL 1400) (sl. 12) te se provede ultrastrukturalna analiza tkiva. Digitalnom kamerom koja je sastavni dio mikroskopa su uslikana područja tkiva koja su značajna za dijagnozu.



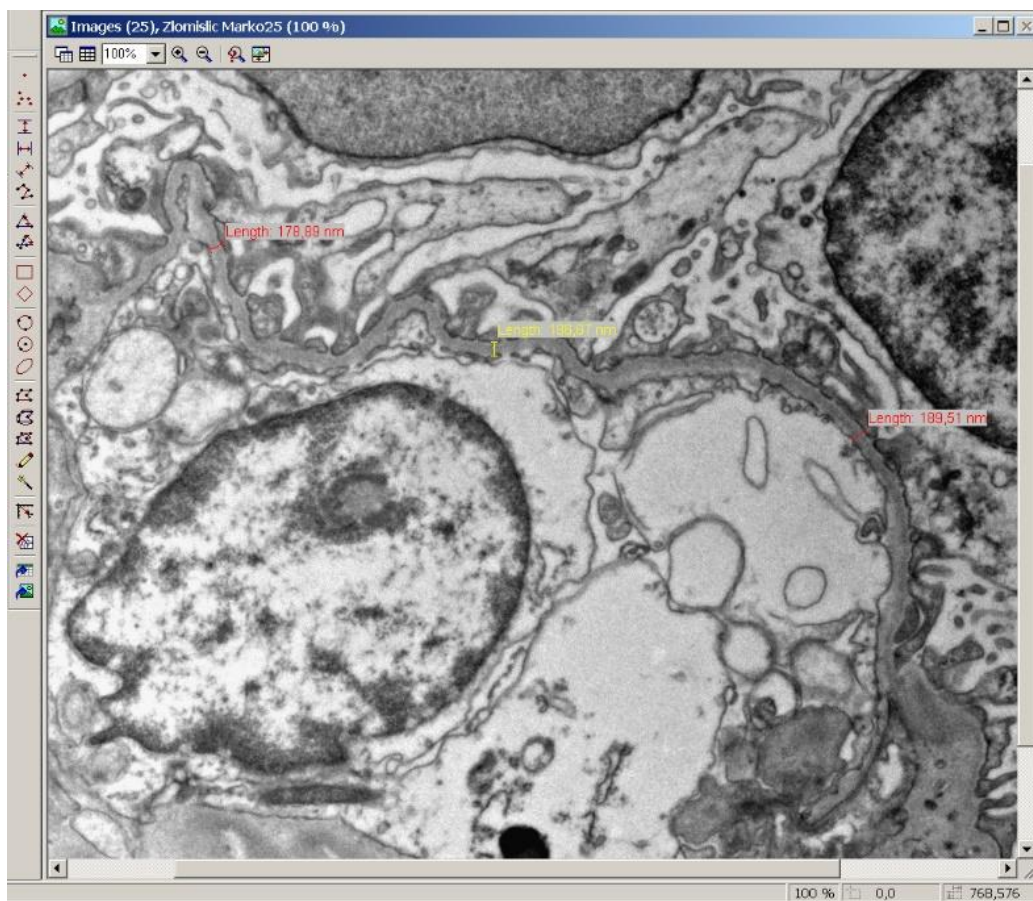
Slika 12. EM JEOL 1400 Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu.

Mjerenje debljine GBM-a se provelo pomoću iTEM softwarea (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany) na EM slikama modificiranom direktnom metodom prema kojoj se na 10 nasumičnih kapilarnih petlji po preparatu učine 3 mjerenja debljine GBM-a (ukupno 30 mjerenja po ispitaniku). Za kapilarne petlje čiji je opseg u potpunosti prisutan na EM slici mjerenje je učinjeno u tri točke netangencionalnog presjeka GBM-a – točka na suprotnom kraju petlje od mezangijskog područja te još dvije točke sa svake strane prema mezangijskom području (sl. 13).



Slika 13. Programsko sučelje Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (iTEM). Točke mjerenja debljine GBM u područjima s čitavim opsegom kapilarne petlje.

Kod petlji bez čitavog opsega na EM slici, mjerenja su učinjena u dvije točke netangencionalnog presjeka GBM-a najbliže rubovima EM slike ili u blizini mezangijskog područja, ali ne zahvaćajući mezangijski dio GBM-a, a treća točka je na središnjem dijelu GBM-a, između dvije navedene točke (sl. 14).



Slika 14. Programsko sučelje Olympus Soft Imaging Solutions GmbH (iTEM). Točke mjerenja debljine GBM u područjima bez čitavog opsega kapilarne petlje.

Mjerenja su učinjena na digitalnim fotografijama (povećanja 4 000 do 8 000 puta), a mjerene su udaljenost između stanične membrane podocita i endotela te je izračunata aritmetička sredina mjerenja za svaki uzorak. Takav oblik mjerenja je opisao Haas (12), na temelju čijeg istraživanja je provedena standardizacija mjerenja debljine GBM-a na Odjelu za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju KB Dubrava (tbl. 1) (92). Debljina GBM-a za svakog bolesnika opisana je četirima varijablama: srednjom vrijednosti, minimalnom vrijednosti, maksimalnom vrijednosti i standardnom devijacijom. Izračun istih generiran je u programskom sučelju Olympus Soft Imaging GmbH (iTEM) nakon učinjenih 30 mjerenja za pojedinog bolesnika. Normalni raspon debljine GBM-a za svaki spol je definiran kao raspon unutar dvije standardne devijacije izmjerenih srednjih vrijednosti debljine GBM-a. Kako bismo definirali uredne vrijednosti debljine GBM-a, analizirali smo EM slike uzoraka bubrežnih biopsija 23 muškaraca i 22 žene starijih od 9 godina (raspon

dobi 19 do 84 godine) s dijagnozom bolesti minimalnih promjena, akutnog intersticijskog nefritisa ili akutnog tubularnog oštećenja ili je utvrđeno da je parenhim bubrega bez patoloških promjena koje bi utjecale na debljinu GBM-a. Isključni kriteriji su bili hematurija i dijabetes. Za pacijente mlađe od 9 godina, referentne vrijednosti debljine GBM izračunate su prema formulama koje su objavili Haas i suradnici (12), jer su Morita i suradnici (96) pokazali da debljina GBM do 9. godine života raste linearno, a nakon te dobi dolazi do platoa u krivulji rasta debljine GBM-a koji postaje stalan te je debljina GBM nakon 9. godine života podjednaka kao kod odraslih. Osim mjerenja debljine GBM-a, u EM analizi je posebna pozornost posvećena prisutnosti i opsegu lameliranja GBM-a te izmjeni tankih dijelova i zadebljanja GBM-a kao glavnim ultrastrukturnim promjenama koje su karakteristične za poremećaje Alportovog spektra.

Tablica 1. Srednje vrijednosti i raspon uredne debljine glomerularne bazalne membrane u Odjelu za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju KB Dubrava (naše istraživanje) i njihova usporedba s podacima iz literature (11, 92).

	Srednje vrijednosti $\pm$ 2 SD debljine GBM		Raspon uredne debljine GBM	
	Naše istraživanje	Haas	Naše istraživanje	Haas
Muškarci	340 $\pm$ 36 nm	330 $\pm$ 50 nm	268 - 412 nm	230 - 430 nm
Žene	301 $\pm$ 44 nm	305 $\pm$ 45 nm	213 - 389 nm	215 - 395 nm

SD – standardna devijacija, GBM – glomerularna bazalna membrana.

4.3. Izolacija i sekvenciranje DNA ispitanika

Izolacija DNA iz periferne krvi i sekvenciranje gena *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* učinjeni su u Laboratoriju za molekularnu patologiju Zavoda za patologiju i Centru za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Svim ispitanicima je uzet uzorak 5 ml periferne krvi iz kojeg je izolirana DNA pomoću Zymo Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) i prema uputama proizvođača. Svakom uzorku je potom izmjerena koncentracija DNA pomoću High Sensitivity Qubit quantification kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Izolirana genomska DNA se zatim koristila u pripremi knjižnica za sekvenciranje pomoću AmpliSeq Library Plus for Illumina and AmpliSeq Custom DNA Panel for Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA) koji uključuje dva bazena početnica od 89 i 87 parova početnica koje služe za umnožavanje kodirajućih regija i pridruženih prekrajajućih (engl. *splice site*) regija ciljanih gena. Veličina amplicona se kretala u rasponu 125 - 175 parova baza. Za umnažanje kodirajućih i bliskih intronskih regija gena *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* korišteno je ukupno 20 ng genomske DNA u multipleksnoj reakciji umnažanja lančanom reakcijom polimeraze (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) s dva bazena od 89 i 87 parova početnica. Adapterski sljedovi i molekularni indeksi dodani su u narednim koracima na amplificirane sljedove lančanom reakcijom polimeraze, a dobiveni fragmenti pročišćeni su pomoću magnetskih kuglica Agencourt AMPure XP reagensa (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Kvaliteta knjižnica je provjerena pomoću Agilent Bioanalyzer HS DNA kita (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), koji pokazuje ispravnu veličinu i koncentraciju uzoraka. Pojedine knjižnice su potom kvantificirane pomoću kita High Sensitivity Qubit quantification kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) na uređaju Qubit 3.0 i objedinjene u jednu knjižnicu s koncentracijom 50 pM te je 20 µl stavljeno u uložak za sekvenciranje. Ciljano sekvenciranje gena *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* je učinjeno na iSeq 100 System platformi (Illumina, San Diego, CA, USA) na standardnoj protočnoj stanici i prema uputama proizvođača (sl. 15). Pokrivenost svih egzona iznosi 99,09 %, a srednja dubina pokrivenosti svih amplicona 270 x.



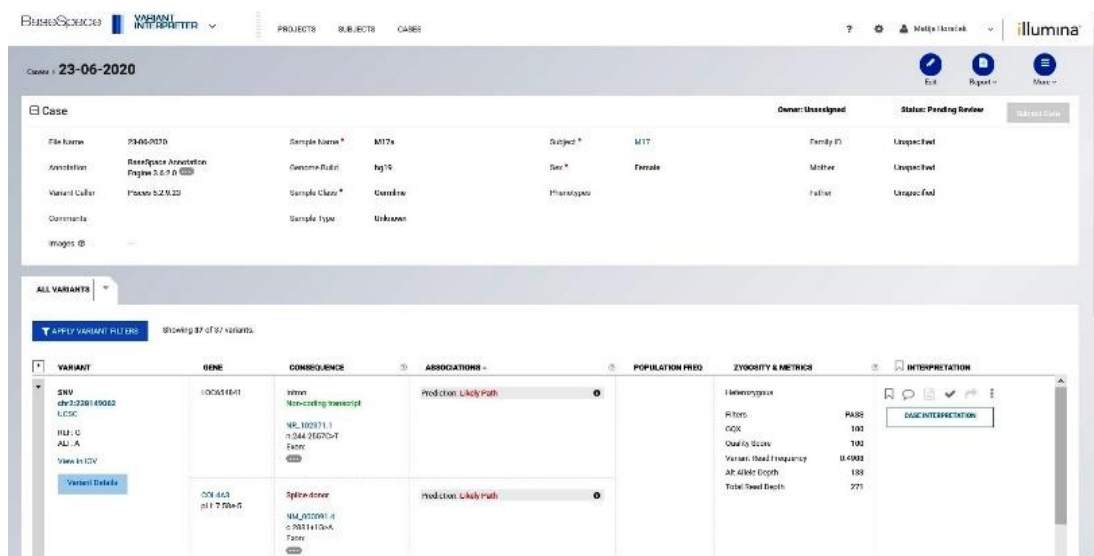
Slika 15. iSeq 100 System platforma na kojoj je učinjeno sekvenciranje.

Novootkrivene varijante su potvrđene Sangerovim sekvenciranjem. Genomska DNA umnožena je pomoću FW 5' GGG GGA ACA AGG AGA TAA AGG A3' i RV 5' AAA CAC TGG CCC TCA CTG TC3' početnica i pomoću EmeraldAmp MAX HS PCR Master Mix (Takara, Berkley, CA, USA). Produkti PCR reakcije su pročišćeni pomoću ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sangerovo sekvenciranje je provedeno na ABI310 (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) s BigDye v1.1 chemistry (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), a rezultati pregledani pomoću Vector NTI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Učinjeno je i sekvenciranje uzoraka pedesetero zdravih ispitanika koje podržava valjanost metode i dobivenih rezultata sekvenciranja.

4.4. Bioinformatička analiza rezultata sekvenciranja

Za bioinformatičku analizu koristio se VariantStudio Software (Germline workflow; version 2.12.0.34) (Illumina, San Diego, CA, USA). Datoteke dobivene sekvenciranjem i analizom na iSeq 100 platformi učitane su na BaseSpace Variant Interpreter (Illumina, San Diego, CA, USA) koji za svaki uzorak navede nađene varijante DNA prema HGVS (Human Genome Variation Society) nomenklaturi (sl. 16) (97).



Slika 16. Illumina VariantInterpreter sučelje za analizu .vcf datoteka dobivenih sekvenciranjem na iSeq 100 System platformi.

Svaka varijanta podrazumijeva gen u kojem je došlo do promijene i točnu poziciju u genomu. Pri analizi varijanti slijedili smo smjernice prema ACMG (American College of Medical Genetics and Genomics) i AMP (Association for Molecular Pathology) (98, 99). Prema navedenim smjernicama, 5 je mogućih kategorija varijanti: benigne, vjerojatno benigne, varijanta nepoznatog značaja (VUS, engl. variant of uncertain significance), vjerojatno patogene i patogene. Patogenost varijante podrazumijeva da ona ometa funkciju proteina kojeg kodira gen zahvaćen promjenom koju opisuje varijanta što posljedično uzrokuje specifični fenotip.

Sve varijante su analizirane *in silico* – provjereno je jesu li prijavljene u dostupnim bazama podataka kao što su NCBI dbSNP138, ClinVar, Ensembl, ARUP, *The Human Gene Mutation Database* (HGMD) i LOVD (100). Također, varijantama je provjerena patogenost pomoću programa kao što su MutationTaster, Align GVGD, SNPs3D, PolyPhen-2, SIFT, gnomAD te u bazi Varsome (sl. 17 i 18). Varijante koje zahvaćaju regije prekrajanja nemaju direktan učinak na promjenu aminokiseline u kodiranom proteinu pa se ne mogu testirati *MutationTaster-om* već pomoću *Human Splicing Finder-a* (101, 102).

varsome COL4A3 c.2881+1G>A Pg.1/9 Search Editions, About, Community, Blog

chr2-228149062-G-A

Transcript: NM_000991, canonical, protein length 367, gene COL4A3, splicing variant

Rules

PS1	PS2	PS3	PS4	PP1	PP2	PP3	PP4	PP5
PM4	PM5	PM6	PM7	PM8	PM9	PM10	PM11	PM12
BP1	BP2	BP3	BP4	BP5	BP6	BP7	BP8	BP9

The verdict will update automatically if you enable or disable a rule or change rule weights. The rule question marks display details about the rule (including why it was not triggered).

Automated criteria

Rule	Explanation
PS1 Very Strong	Null variant (intronic within 2 of splice site) affecting gene COL4A3, which is a known mechanism of disease (gene has 747 known pathogenic variants which is greater than minimum of 10, associated with Alport syndrome 1, autosomal dominant and Alport syndrome 2, autosomal recessive).
PM4 Moderate	Variant not found in gnomAD exomes (good gnomAD exomes coverage = 61.6). Variant not found in gnomAD genomes (good gnomAD genomes coverage = 30.3).
PP3 Supporting	Pathogenic computational verdict based on 5 pathogenic predictions from BayesDel_noPrior, DANN, EIGEN, FATMHM-MKL and MutationTaster vs no benign predictions.

Variant basic info

ACMG classification

Region browser

Community contributions

Publications

Structural Variants

Transcripts

Frequencies

Pathogenicity Scores

Conservation scores

PharmGKB

Beacon network

Gene COL4A3

Gene PFF-IT

Recent VarSome activity

Feedback

Cite VarSome

Slika 17. Varsome sučelje za analizu genetskih varijanti prema ACMG klasifikaciji.



mutation t@sting

Prediction disease causing Model: without_aae, prob: 1 (explain)

Summary

- protein features (might be) affected
- splice site changes

analysed issue analysis result

name of alteration	no title
alteration (phys. location)	chr2-228149062G>A show variant in all transcripts IGV
HGNC symbol	COL4A3
Ensembl transcript ID	ENST00000395578
Genbank transcript ID	NM_000991
UniProt peptide	Q01955
alteration type	single base exchange
alteration region	intron
DNA changes	g.119782G>A
AA changes	N/A
positions of altered AA / AA positions in RCS	N/A
frameshift	N/A
known variant	Variant was neither found in ExAC nor 1000G. Search ExAC
regulatory features	H3K36me3, Histone, Histone 3 Lysine 36 Tri-Methylation
phyloP / phastCons	PhyloP PhastCons (flanking) 2.197 1 3.603 1 (flanking) 3.018 1 explain score(s) and/or inspect your position(s) in UCSC Genome Browser

splice sites

alteration within used splice site, likely to disturb normal splicing	effect	gDNA position score	detection sequence	exon-intron border
Donor lost	119780	sequence motif lost	-	wt: AAAG gtas mu: AAAG.ataa
Donor marginally increased	119775	wt: 0.3233 / mu: 0.3448 (marginal change - not scored)	wt: CAGGTCCTCAAAAGGTA mu: CAGGTCCTCAAAAGTA	GGTC tcaa
Donor increased	119786	wt: 0.59 / mu: 0.77	wt: GGTAAAGAAATTGCTT mu: GATAAAGAAATTGCTT	TAAA gaat

Slika 18. MutationTaster sučelje za analizu patogenosti genetskih varijanti.

4.5. Statistička analiza podataka

Svi klinički i patohistološki podaci na SM-u te podaci dobiveni analizom EM slika, genetskom i bioinformatičkom analizom su statistički analizirani te je provedena korelacija podataka.

Bolesnici su prema patohistološkoj dijagnozi podijeljeni u dvije skupine: skupina 1 su bolesnici s dijagnozom TBMN-a, a skupina 2 bolesnici s dijagnozom FSGS-a s TBMN-om. Navedene skupine uspoređene su prema kliničkim parametrima (spol, dob, klinički sindrom, tjelesna masa, visina, BMI, prisutnost hematurije i proteinurije, 24-satna proteinurija, razina serumskog kreatinina, eGFR, CKD stadij, anti-RAAS terapija, naglušost, smetnje vida, komorbiditeti), patohistološkim parametrima (broj glomerula, prisutnost pjenušavih stanica u intersticiju, postotak i stupanj IFTA-e, upala u intersticiju, prisutnost arterioskleroze, prisutnost i izraženost fibrointimalnog zadebljanja arterija, prosječna, minimalna i maksimalna debljina GBM-a i njena standardna devijacija, prisutnost lameliranja i izmjene tankih dijelova i zadebljanja GBM-a) i parametrima rezultata genetske analize (zahvaćeni gen, oblik nasljeđivanja, patogenost varijante, tip varijante). U prvom dijelu usporedbe navedenih skupina uključeni su svi bolesnici (N = 100). Nakon toga, provedena je usporedba navedenih skupina, ali uključujući bolesnike (N = 62) kod kojih je NGS metodom nađena varijanta u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genu, također prema navedenim parametrima. Analiza doživljenja određena je Kaplan-Meierovom analizom i log-rank (Mantel-Cox) testom. Konačno, učinjena je genotip-fenotip korelacija u kojoj su, prema navedenim parametrima, uspoređene skupine bolesnika prema tipu naslijeđene varijante.

Podaci su prikazani u obliku tablica i slika. Numerički podaci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom u slučaju normalne raspodjele, a u ostalim slučajevima medijanom i granicama interkvartalnog raspona. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina testirane su neovisnim t-testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitney-evim testom. Razlike triju ili više nezavisnih skupina testirane su analizom varijance (ANOVA) u slučaju normalne raspodjele, a kod odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom. Kategorijski podaci prikazani su apsolutnim i relativnim frekvencijama.

Razlike kategorijskih varijabli su testirane χ^2 -testom i Fisherovim egzaktnim testom. Za sve analize razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$. Za analizu su korišteni dvosmjerni testovi. Statistička analiza provedena je pomoću računalnog programa SPSS 19.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

5. REZULTATI

Prema Registru biopsija bubrega Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava u razdoblju od 2004. do 2018. godine učinjena je analiza 3973 biopsije nativnih bubrega, od čega je u njih 163 (4,1 %) dijagnoza odgovarala TBMN-u, a njih 49 (30,1 %) je uz to imalo i FSGS. Prema tome, učestalost TBMN-a udruženog s FSGS-om, prema pregledanom registru, iznosi 1,2 %.

Od navedenih 163 bolesnika, u istraživanje je uključen 51 bolesnik s dijagnozom TBMN-a i 29 s dijagnozom FSGS-a i TBMN-a. Dva su razloga zbog kojih nije uključeno svih 163 bolesnika. Prvo, dio bolesnika odlučio je ne sudjelovati u istraživanju. Drugo, unatoč postavljenoj dijagnozi TBMN-a, revizijom EM slika pronađene su suspektne promjene, poput lameliranja i izmjene tankih dijelova i zadebljanja GBM-a koje bi upućivale na AS. Dodatno je uključeno 17 bolesnika s dijagnozom TBMN-a i 3 s dijagnozom FSGS-a i TBMN-a identificiranih pretragom registra biopsija Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Zavoda za patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

5.1. Klinički podaci svih ispitanika u trenutku biopsije bubrega

Kliničke osobitosti u trenutku biopsije bubrega svih uključenih bolesnika te bolesnika prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom prikazane su u tablici 2. Od ukupno 100 bolesnika, muškaraca je bilo 33, a žena 67. Prosječna dob u trenutku biopsije iznosila je $35,25 \pm 18,2$ godina.

Tablica 2. Kliničke osobitosti u trenutku biopsije bubrega svih uključenih bolesnika te bolesnika prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom.

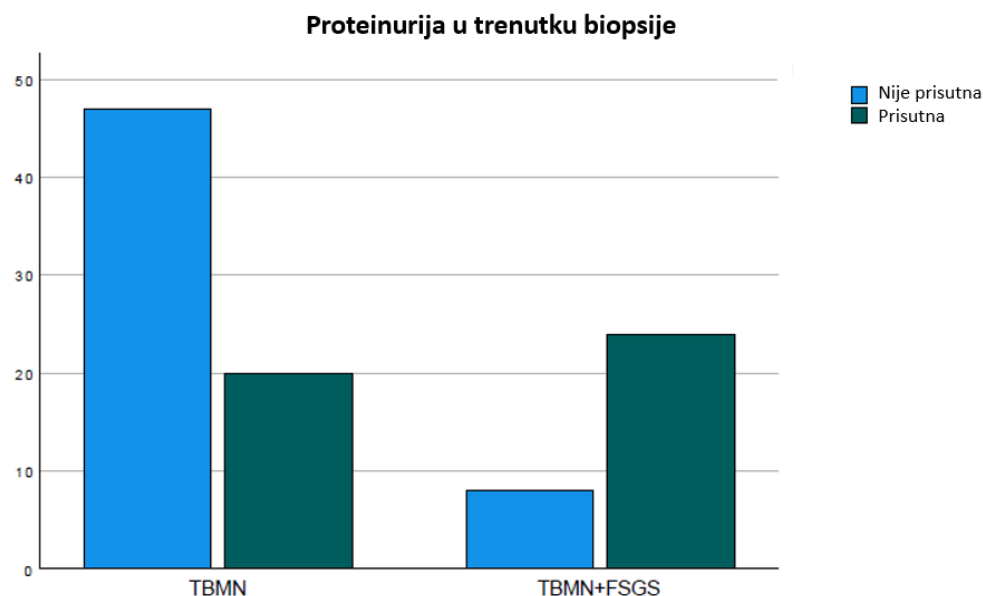
Varijabla	Svi ispitanici N = 100	TBMN N = 68	TBMN + FSGS N = 32	P
Spol				0,171
Muško	33 (33,0)	19 (27,9)	14 (43,8)	
Žensko	67 (67,0)	49 (72,1)	18 (56,3)	
Dob (godine)	38,3 (17,0 - 49,63)	37,7 (14,63 - 47,75)	40,6 (27,38 - 56,73)	0,095

Dob prilikom pojave simptoma (godine)	27,0 (10,0 - 38,5)	26,0 (9,0 - 39,0)	27,0 (14,25 - 36,25)	0,721
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	3	-	
Sindrom				0,073
Izolirana hematurija i/ili proteinurija	85 (86,7)	60 (90,9)	25 (78,1)	
Nefrotski sindrom	9 (9,2)	3 (4,5)	6 (18,8)	
Kronični nefritički sindrom	2 (2,0)	1 (1,5)	1 (3,1)	
Nespecificirano oštećenje bubrega	2 (2,0)	2 (3,0)	0 (0,0)	
Bez podataka	2	2	-	
Tjelesna masa (kg)	64,80 ± 27,42	58,43 ± 27,14	77,25 ± 23,90	0,006
Nedostaju podaci za 32 ispitanika				
Visina (cm)	168,25 (158,0 - 175,0)	166,0 (140,5 - 174,0)	173,0 (168,0 - 176,0)	0,072
Nedostaju podaci za 34 ispitanika				
BMI (kg/m²)	23,39 ± 6,07	21,95 ± 5,77	26,09 ± 5,81	0,007
Nedostaju podaci za 34 ispitanika				
Hematurija				0,078
Da	92 (93,9)	65 (97,0)	27 (87,1)	
Ne	6 (6,1)	2 (3,0)	4 (12,9)	
Nedostaju podaci za 2 ispitanika	2	1	1	
Proteinurija				< 0,001
Da	44 (44,4)	20 (29,9)	24 (75,0)	
Ne	55 (55,6)	47 (70,1)	8 (25,0)	
Nedostaju podaci za jednog ispitanika	1	1	-	
24-satna proteinurija (g)	0,18 (0,08 - 1,12)	0,12 (0,08 - 0,31)	1,56 (0,21 - 2,86)	< 0,001
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	2	1	
Serumski kreatinin (μmol/l)	75,0 (57,0 - 89,0)	72,5 (52,75 - 81,5)	85,0 (63,0 - 117,0)	0,005
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	2	1	
eGFR CKD-EPI (ml/min/1,73m²)	87,11 ± 27,14	91,61 ± 24,63	77,54 ± 30,01	0,017
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	2	1	
CKD stadij				0,018
1	51 (52,6)	39 (59,1)	12 (38,7)	
2	28 (28,9)	19 (28,8)	9 (29,8)	
3a	10 (10,3)	6 (9,1)	4 (12,9)	
3b	6 (6,2)	1 (1,5)	5 (16,1)	
4	1 (1,0)	0 (0,0)	1 (3,2)	
5	1 (1,0)	1 (1,5)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	2	1	
Anti-RAAS terapija				0,001
Da	49 (53,8)	26 (41,9)	23 (79,3)	

Ne	42 (46,2)	36 (58,1)	6 (20,7)	
Nedostaju podaci za 9 ispitanika	9	6	3	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza; BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*); eGFR - procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*) po CKD-EPI formuli; CKD - kronična bubrežna bolest (engl. *chronic kidney disease*); RAAS - renin-angiotenzin-aldosteronski sustav.

Većina bolesnika (85; 86,7 %) se klinički manifestirala izoliranom hematurijom i/ili proteinurijom, njih 9 (9,2 %) imalo je sliku nefrotskog sindroma, a ostali su se prezentirali kroničnim nefritičkim sindromom (2; 2 %) ili nespecificiranim oštećenjem bubrega (2; 2 %). Bolesnici s FSGS-om i TBMN-om prosječno teže 77.25 ± 23.90 kg (prosječan BMI 26.09 ± 5.81 kg/m²) i statistički su značajno teži ($P = 0,006$) i višeg BMI-ja ($P = 0,007$) od bolesnika s TBMN-om koji prosječno teže 58.43 ± 27.14 kg (prosječan BMI 21.95 ± 5.77 kg/m²). Hematurija je bila prisutna u 92 (93,9 %) bolesnika, a proteinurija u njih 44 (44,4 %). Postoji statistički značajna razlika ($P < 0,001$) između bolesnika s patohistološkom dijagnozom TBMN-a kod kojih 20 (29,9 %) ima proteinuriju i bolesnika s dijagnozom FSGS-a i TBMN-a kod kojih čak 24 (75 %) ima proteinuriju (sl. 19).



Slika 19. Razlika u prisutnosti proteinurije u trenutku biopsije bubrega između skupine s TBMN i TBMN+FSGS ($P < 0,001$). Odnosi se na sve uključene ispitanike.

Također, u skladu s navedenim, prisutna je i statistički značajka razlika ($P < 0,001$) između navedenih skupina u medijanu 24-satne proteinurije gdje u skupini bolesnika s TBMN-om ona iznosi 0,12 (0,08 – 0,31) g, a u skupini s FSGS-om i TBMN-om 1,56 (0,21 – 2,86) g. Srednja vrijednost kreatinina za sve ispitanike iznosi $82,06 \pm 45,89 \mu\text{mol/l}$, a eGFR-a $87,11 \pm 27,14 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Postoji statistički značajna razlika ($P = 0,017$) u srednjoj vrijednosti eGFR-a između ispitivanih skupina koja u bolesnika s TBMN-om iznosi $91,61 \pm 24,63$, a u bolesnika s FSGS-om i TBMN-om $77,54 \pm 30,01 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Na temelju eGFR vrijednosti, bolesnicima je određen CKD stadij prema KDIGO smjernicama (95). Najviše pacijenata imalo je CKD stadij 1 tj. urednu bubrežnu funkciju (51; 52,6 %), njih 28 (28,9 %) imalo je CKD stadij 2, 10 (10,3 %) je imalo CKD stadij 3a, 6 (6,2 %) CKD stadij 3b, 1 (1 %) CKD stadij 4, a 1 (1 %) CKD stadij 5. Postoji statistički značajna razlika ($P = 0,018$) u CKD stadijima između ispitivanih skupina gdje u bolesnika s TBMN-om njih 39 (59,1 %) ima urednu bubrežnu funkciju dok je ona uredna samo u 12 (38,7 %) bolesnika s FSGS-om i TBMN-om. Podjednak postotak (28,8 % za skupinu s TBMN-om, a 29,8 % za skupinu s FSGS-om i TBMN-om) u obje skupine ima CKD stadij 2, dok se teži stadiji (CKD 3 – 5) javljaju u većem postotku (32,2 %) u bolesnika s FSGS-om i TBMN-om nego u onih s TBMN-om (12,1 %). U trenutku biopsije, 49 (53,8 %) bolesnika je primalo anti-RAAS terapiju.

U tablici 3 prikazani su vanbubrežni simptomi uključenih bolesnika. Smetnje sluha potvrđene audiometrijom bile su prisutne u svega 7 (7,6 %) bolesnika, a bez audiometrije u njih još 2 (2,2 %). Poteškoće s vidom zabilježene su samo u jednog (1,1 %) bolesnika.

Tablica 3. Vanbubrežni simptomi uključenih bolesnika.

Varijabla	Svi ispitanici N = 100	TBMN N = 68	TBMN + FSGS N = 32	P
Naglušost				0,849
Ne	83 (90,2)	57 (90,5)	26 (89,7)	
Da bez audiometrije	2 (2,2)	1 (1,6)	1 (3,4)	
Da s audiometrijom	7 (7,6)	5 (7,9)	2 (6,9)	
Nedostaju podaci za 8 ispitanika	8	5	3	
Smetnje vida				> 0,999
Ne	91 (98,9)	62 (98,4)	29 (100,0)	
Da	1 (1,1)	1 (1,6)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 8 ispitanika	8	5	3	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza.

U tablici 4 prikazani su komorbiditeti kod uključenih bolesnika. Pušača je bilo 29 (34,1 %), a hipertoničara 30 (34,5 %). Postoji statistički značajna razlika u pušenju ($P < 0,001$) i hipertenziji ($P < 0,001$) između ispitivanih skupina gdje je u skupini bolesnika s TBMN-om samo 22 % pušača i 21,3 % hipertoničara, a u skupini s FSGS-om i TBMN-om je 61,5 % pušača i 65,4 % hipertoničara. Dijabetes je bio prisutan u 3 (3,4 %), bolesti dišnog sustava u 8 (9,3 %), a bolesti srca u 3 (3,5 %) bolesnika. Niti kod jednog bolesnika nisu zabilježene cerebrovaskularne niti periferne vaskularne bolesti.

Tablica 4. Komorbiditeti prisutni kod uključenih bolesnika.

Varijabla	Svi ispitanici N = 100	TBMN N = 68	TBMN + FSGS N = 32	P
Pušenje				< 0,001
Ne	56 (65,9)	46 (78,0)	10 (38,5)	
Da	29 (34,1)	13 (22,0)	16 (61,5)	
Nedostaju podaci za 15 ispitanika	15	9	6	
Hipertenzija				< 0,001
Ne	57 (65,5)	48 (78,7)	9 (34,6)	
Da	30 (34,5)	13 (21,3)	17 (65,4)	
Nedostaju podaci za 13 ispitanika	13	7	6	
Dijabetes				> 0,999
Ne	84 (96,6)	58 (96,7)	26 (96,3)	
Da	3 (3,4)	2 (3,3)	1 (3,7)	
Nedostaju podaci za 13 ispitanika	13	8	5	
Bolesti pluća				0,426
Ne	78 (90,7)	52 (88,1)	26 (96,3)	
Da	8 (9,3)	7 (11,9)	1 (3,7)	
Nedostaju podaci za 14 ispitanika	14	9	5	
Bolesti srca				0,231
Ne	83 (96,5)	58 (98,3)	25 (92,6)	
Da	3 (3,5)	1 (1,7)	2 (7,4)	
Nedostaju podaci za 14 ispitanika	14	9	5	
Cerebrovaskularne bolesti				
Ne	86 (100,0)	59 (100,0)	27 (100,0)	NA
Da	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 14 ispitanika	14	9	5	
Periferne vaskularne bolesti				
Ne	85 (100,0)	58 (100,0)	27 (100,0)	NA
Da	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	

Nedostaju podaci za 15 ispitanika	15	10	5	
-----------------------------------	----	----	---	--

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza.

5.2. Klinički podaci svih ispitanika na kraju praćenja

Praćenje bolesnika je trajalo od 2 mjeseca do 25 godina (prosječno 4,2 godine). U tablici 5 prikazane su kliničke osobitosti na kraju praćenja svih uključenih bolesnika te bolesnika prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom. Prosječna dob za sve pacijente na zadnjoj kontroli iznosila je $40,06 \pm 17,23$ godina. Hematurija je bila prisutna u 79 (87,8 %) bolesnika, a proteinurija u njih 42 (46,7 %). Postoji statistički značajna razlika ($P < 0,001$) između bolesnika s patohistološkom dijagnozom TBMN-a kod kojih je 18 (30 %) imalo proteinuriju i bolesnika s dijagnozom FSGS-a i TBMN-a kod kojih je čak njih 24 (80 %) imalo proteinuriju. Također je prisutna statistički značajna razlika ($P < 0,001$) između navedenih skupina u medijanu 24-satne proteinurije gdje u skupini bolesnika s TBMN-om ona iznosi 0,11 (0,08 - 0,38) g, a u skupini s FSGS-om i TBMN-om 1,67 (0,28 – 3,53) g.

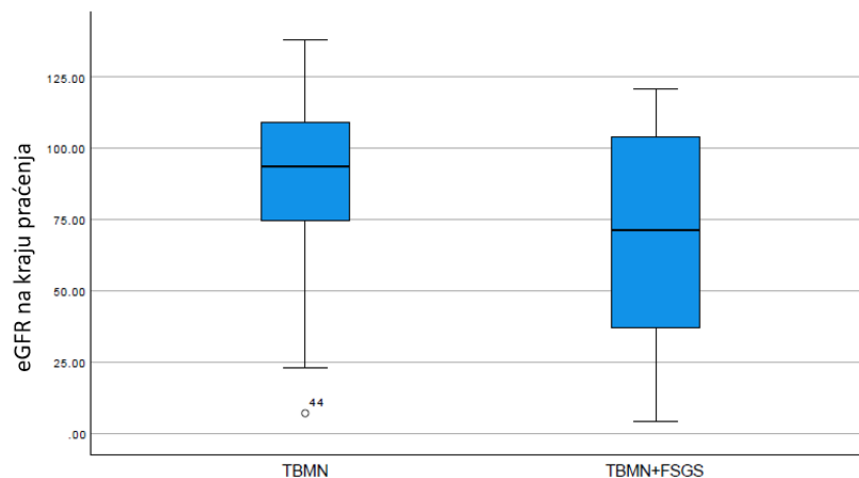
Tablica 5. Kliničke osobitosti na kraju praćenja svih uključenih bolesnika te bolesnika prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom.

Varijabla	Svi ispitanici N = 100	TBMN N = 68	TBMN + FSGS N = 32	P
Spol				0,171
Muško	33 (33,0)	19 (27,9)	14 (43,8)	
Žensko	67 (67,0)	49 (72,1)	18 (56,3)	
Dob (godine)	34,0 (27,43 - 54,33)	40,1 (20,13 - 52,25)	45,8 (34,38 - 59,0)	0,054
Nedostaju podaci za 10 ispitanika	10	8	2	
Hematurija				> 0,999
Da	79 (87,8)	53 (88,3)	26 (86,7)	
Ne	11 (12,2)	7 (11,7)	4 (13,3)	
Nedostaju podaci za 10 ispitanika	10	8	2	
Proteinurija				< 0,001
Da	42 (46,7)	18 (30,0)	24 (80,0)	
Ne	48 (53,3)	42 (70,0)	6 (20,0)	
Nedostaju podaci za 10 ispitanika	10	8	2	
24-satna proteinurija (g)	0,18 (0,08 - 1,26)	0,11 (0,08 - 0,38)	1,67 (0,28 - 3,53)	< 0,001

Nedostaju podaci za 14 ispitanika	14	10	4	
Serumski kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	76,0 (63,0 - 100,0)	72,5 (61,0 - 85,5)	94,5 (68,5 - 154,3)	0,006
Nedostaju podaci za 12 ispitanika	12	10	2	
eGFR CKD-EPI (ml/min/1,73m^2)	83,17 $\pm$ 31,08	89,67 $\pm$ 26,94	70,62 $\pm$ 34,98	0,012
Nedostaju podaci za 12 ispitanika	12	10	2	
CKD stadij				0,011
1	44 (50,0)	34 (58,6)	10 (33,3)	
2	25 (28,4)	15 (25,9)	10 (33,3)	
3a	8 (9,1)	6 (10,3)	2 (6,7)	
3b	4 (4,5)	0 (0,0)	4 (13,3)	
4	2 (2,3)	1 (1,7)	1 (3,3)	
5	5 (5,7)	2 (3,4)	3 (10,0)	
Nedostaju podaci za 12 ispitanika	12	10	2	
Promjena CKD stadija od biopsije do kraja praćenja				0,002
Nema promjene	62 (71,3)	48 (82,8)	14 (48,3)	
Pogoršanje	15 (17,2)	5 (8,6)	10 (34,5)	
Poboljšanje	10 (11,5)	5 (8,6)	5 (17,2)	
Nedostaju podaci za 13 ispitanika	13	10	3	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza; eGFR - procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*) po CKD-EPI formuli; CKD - kronična bubrežna bolest (engl. *chronic kidney disease*).

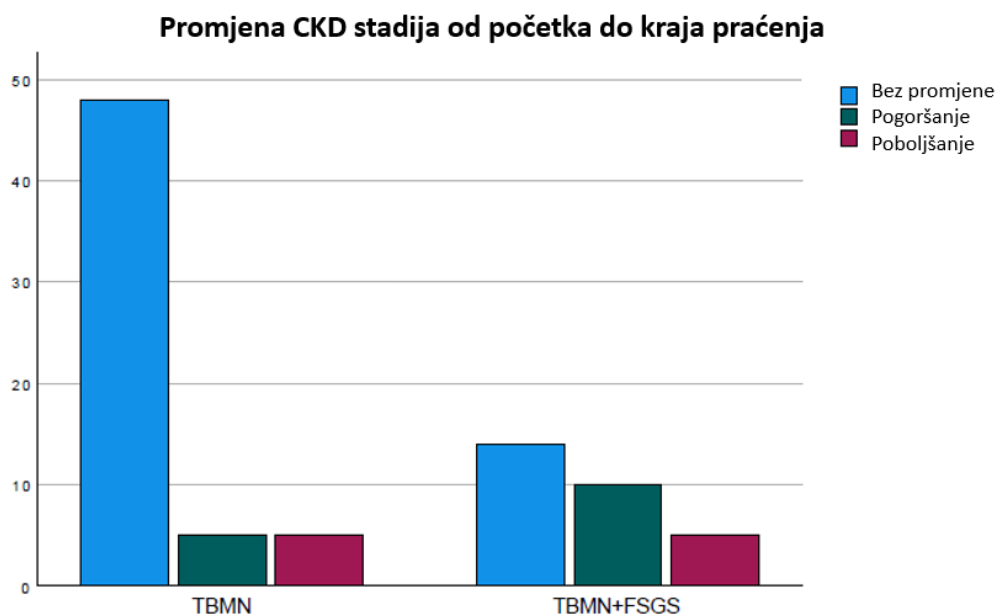
Srednja vrijednost kreatinina za sve ispitanike je iznosila $104,95 \pm 111,22 \mu\text{mol/l}$, a eGFR-a $83,17 \pm 31,08 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Postoji statistički značajna razlika u srednjoj vrijednosti eGFR-a ($P = 0,012$) između ispitivanih skupina koja za skupinu bolesnika s TBMN-om iznosi $89,67 \pm 26,94 \text{ ml/min/1,73m}^2$, a za skupinu s FSGS-om i TBMN-om $70,62 \pm 34,98 \text{ ml/min/1,73m}^2$ (sl. 20).



Slika 20. Histogram koji prikazuje statistički značajnu razliku ($P = 0.012$) u srednjoj vrijednosti eGFR-a između skupine bolesnika s TBMN-om i bolesnika s FSGS-om i TBMN-om. Odnosi se na sve uključene ispitanike na kraju praćenja.

Najviše pacijenata imalo je CKD stadij 1 tj. urednu bubrežnu funkciju (44; 50 %), njih 25 (28,4 %) imalo je CKD stadij 2, 8 (9,1 %) je imalo CKD stadij 3a, 4 (4,5 %) CKD stadij 3b, 2 (2,3 %) CKD stadij 4, a 5 (5,7 %) CKD stadij 5. Postoji statistički značajna razlika ($P = 0,011$) u CKD stadijima između ispitivanih skupina gdje u skupini bolesnika s TBMN-om njih 34 (58,6 %) imalo urednu bubrežnu funkciju dok je kod bolesnika s FSGS-om i TBMN-om ona uredna u njih samo 10 (33,3 %). Kao i u trenutku biopsije, teži stadiji (CKD 3 – 5) javljaju u većem postotku (33,3 %) u bolesnika s FSGS-om i TBMN-om nego u onih s TBMN-om (15,4 %). Ako usporedimo CKD stadije bolesnika u trenutku biopsije s onima na kraju praćenja, vidimo da u najvećem broju bolesnika nije bilo promjene (62; 71,3 %), u 15 (17,2 %) bolesnika došlo je do pogoršanja bubrežne funkcije, a u njih 10 (11,5 %) do djelomičnog oporavka. Statistički je značajna razlika ($P = 0,002$) u promjeni CKD stadija odnosno bubrežne funkcije od trenutka biopsije do kraja praćenja između bolesnika s TBMN-om i bolesnika s FSGS-om i TBMN-om. U skupini s TBMN-om bubrežna funkcija je održana ili se djelomično poboljšala u čak 53 (91,4 %) bolesnika, dok je u samo 5 (8,6 %) bolesnika došlo do pogoršanja. U skupini s FSGS-om i TBMN-om 19 (65,5 %) bolesnika je imalo održanu ili djelomično oporavljenu bubrežnu funkciju, dok je kod 10 (34,5 %) došlo do pogoršanja bubrežne funkcije (sl. 21).

Analiza doživljenja ciljnih ishoda nije provedena jer je tek dvoje bolesnika od 100 uključenih doživjelo neki od navedenih ciljnih ishoda. Takav je uzorak premalen da bi polučio statistički značajne rezultate Kaplan-Meierovom analizom i log-rank (Mantel-Cox) testom.



Slika 21. Razlike u promjenama CKD od početka do kraja praćenja između istraživanih skupina ($P = 0,002$). Odnosi se na sve uključene ispitanike.

5.3. Patohistološki podaci svih ispitanika

U tablici 6 prikazane su patohistološke osobitosti svih uključenih bolesnika te bolesnika prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom. Prosječno je po biopsiji bubrega na SM-u nađeno $25,02 \pm 24,69$ glomerula, potpuno vezivno promijenjenih $2,72 \pm 4,86$ i glomerula sa segmentalnim sklerozama $0,87 \pm 2,09$. Od 32 bolesnika s FSGS-om, za 24 su bili dostupni podaci o vrsti FSGS. Perihilarnu FSGS je imalo 18 (75 %) bolesnika, vršnu 1 (4,2 %) i klasičnu njih 5 (20,8 %). Pjenušave stanice bile su prisutne u 3 (3 %) biopsije.

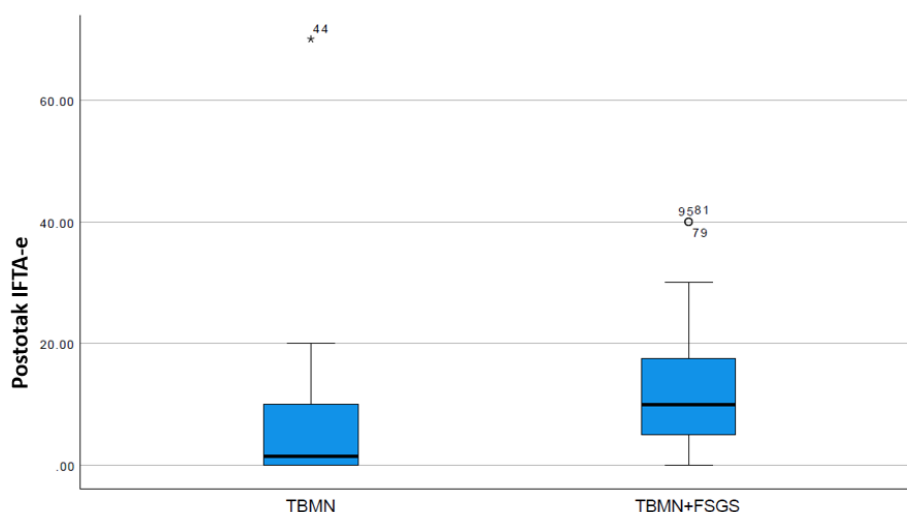
Tablica 6. Patohistološke osobitosti svih uključenih bolesnika te bolesnika prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom.

Varijabla	Svi ispitanici N = 100	TBMN N = 68	TBMN + FSGS N = 32	P
Broj glomerula	20,0 (13,00 - 29,25)	22,0 (14,25 - 30,0)	16,50 (11,50 - 25,75)	0,112
Broj potpuno vezivno promijenjenih glomerula	2,0 (0,0 - 3,0)	1,0 (0,0 - 3,0)	2,0 (1,0 - 3,75)	0,034
Broj glomerula sa segmentalnim sklerozama	0,0 (0,0 - 1,0)	0,0 (0,0 - 0,0)	2,0 (1,0 - 3,0)	< 0,001
Pjenušave stanice u intersticiju				0,239
Da	3 (3,0)	1 (1,5)	2 (6,3)	
Ne	97 (97,0)	67 (98,5)	30 (93,8)	
IFTA (%)	5,0 (0,0 - 10,0)	1,5 (0,0 - 10,0)	10,0 (5,0 - 18,75)	< 0,001
IFTA stupanj				< 0,001
do 25 %	93 (93,0)	67 (98,5)	26 (81,3)	
26 - 50 %	6 (6,0)	0 (0,0)	6 (18,8)	
> 50 %	1 (1,0)	1 (1,5)	0 (0,0)	
Upala u intersticiju				0,078
Da	23 (23,0)	12 (17,6)	11 (34,4)	
Ne	77 (77,0)	56 (82,4)	21 (65,6)	
Arteriolskleroz				0,001
Ne	50 (50,0)	39 (57,4)	11 (34,4)	
Nodularna hijalinoza u jednoj arterioli	5 (5,0)	4 (5,9)	1 (3,1)	
Nodularna hijalinoza u više arteriola	25 (25,0)	19 (27,9)	6 (18,8)	
Hijalinoza u cijelom opsegu stijenke arteriola	20 (20,0)	6 (8,8)	14 (20,0)	
Fibrointimalno suženje lumena arterija				0,472
Nema suženja	71 (71,0)	50 (73,5)	21 (65,6)	
do 25 %	11 (11,0)	8 (11,8)	3 (9,4)	
26 – 50 %	9 (9,0)	6 (8,8)	3 (9,4)	
> 50 %	9 (9,0)	4 (5,9)	5 (15,6)	
Prosječna debljina GBM-a (nm)	186,0 (172,2 - 209,75)	191,0 (170,5 - 209,75)	186,0 (174,0 - 210,5)	0,859
Minimalna debljina GBM-a (nm)	187,7 ± 23,47	109,0 ± 23,66	108,06 ± 23,41	0,853
Maksimalna debljina GBM-a (nm)	312,5 (275,0 - 363,0)	307,5 (263,25 - 359,25)	322,5 (299,25 - 363,00)	0,318
Standardna devijacija debljine GBM-a (nm)	47,0 (39,0 - 61,75)	44,5 (38,0 - 60,5)	49,5 (43,3 - 63,5)	0,260
Lameliranje GBM-a				0,073
Nema	66 (66,0)	49 (72,1)	17 (53,1)	
Fokalno	34 (34,0)	19 (27,9)	15 (46,9)	
Izraženo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Izmjena tankih dijelova i zadebljanja GBM-a				0,262
Nema	65 (65,0)	47 (69,1)	18 (56,3)	

Ima	35 (35,0)	21 (30,9)	14 (43,7)	
-----	-----------	-----------	-----------	--

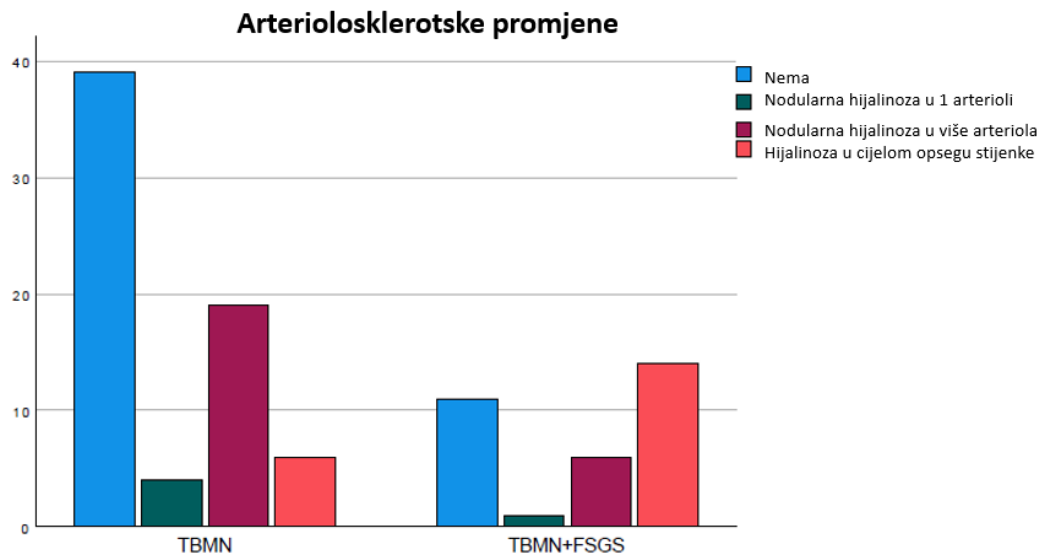
TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza; IFTA – intersticijska fibroza i tubularna atrofija; GBM – glomerularna bazalna membrana.

U najvećem broju biopsija (93; 93 %) je IFTA bila blagog stupnja (zahvaća do 25 % kore), u 6 (6 %) biopsija je bila umjerena (zahvaća 26 – 50 % kore), a u jednoj (1 %) izražena (zahvaća više od 50 % kore). Prisutna je statistički značajna razlika ($P < 0,001$) u stupnju IFTA-e između bolesnika s TBMN-om kod kojih je u 67 (98,5 %) biopsija bila blagog stupnja i samo u jednoj (1,5 %) teškog te bolesnika s FSGS-om i TBMN-om kod kojih se u 26 (81,3 %) nalazi blagi, a u 6 (18,8 %) umjereni stupanj IFTA-e (sl. 22).



Slika 22. Izraženost IFTA-e u biopsijama bubrega s dijagnozom TBMN-a i FSGS-a s TBMN-om ($P < 0,001$). Odnosi se na sve uključene ispitanike.

U 50 (50 %) biopsija arteriole su imale urednu morfologiju, u 30 (30 %) je bila prisutna nodularna hijalinoza, a u 20 (20 %) hijalinoza u cijelom opsegu stijenke arteriole. Postoji statistički značajna razlika ($P = 0,001$) između skupine bolesnika s TBMN-om gdje 37 (59,4 %) ima uredan nalaz, a tek 6 (8,8 %) ima hijalinozu u cijelom opsegu stijenke te skupine s FSGS-om i TBMN-om gdje samo 11 (34,4 %) ima uredan nalaz, a čak 14 (20 %) ima hijalinozu u cijelom opsegu (sl. 23).



Slika 23. Razlika u intenzitetu arteriolsklerotskih promjena između ispitivanih skupina ($P = 0,001$). Odnosi se na sve uključene ispitanike.

Fibrointimalnog suženja lumena arterija nije bilo u većini slučajeva (71; 71 %), u 11 (11 %) je nađeno blago suženje (do 25 % lumena), u 9 (9 %) umjereno suženje (26 – 50 % lumena), a također u 9 (9 %) je bilo prisutno teško suženje lumena (više od 50 % lumena).

Za sve biopsije provedena je ultrastrukturalna analiza i ponovna mjerenja debljine GBM-a modificiranom metodom po Haasu (12) i prema standardizaciji Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava (92). Podaci o debljini GBM-a navedeni su u tbl 6. U većini biopsija (66; 66 %) nije bilo lameliranja, a fokalno lameliranje nađeno je u njih 34 (34 %), dok su izmjene tankih dijelova i zadebljanja GBM-a nađene u 35 (35 %) biopsija. Fokalnim lameliranjem smatra se lameliranje koje zahvaća do 10 % površine analiziranih GBM-a. Nije bilo statističke značajne razlike u izraženosti lameliranja i izmjenama tankih dijelova i zadebljanja GBM-a između bolesnika s TBMN-om i bolesnika s FSGS-om i TBMN-om.

5.4. Klinički podaci ispitanika s varijantama COL4A3, COL4A4 i/ili COL4A5 gena u trenutku biopsije bubrega

Kliničke osobitosti u trenutku biopsije bubrega bolesnika s varijantama u COL4A3, COL4A4 i/ili COL4A5 genima prikazane su u tablici 7. Od 100 testiranih ispitanika kod njih 62 nađene su varijante u navedenim genima, od čega 27 (43,5 %) u muškaraca, a 35 (56,5 %) u žena.

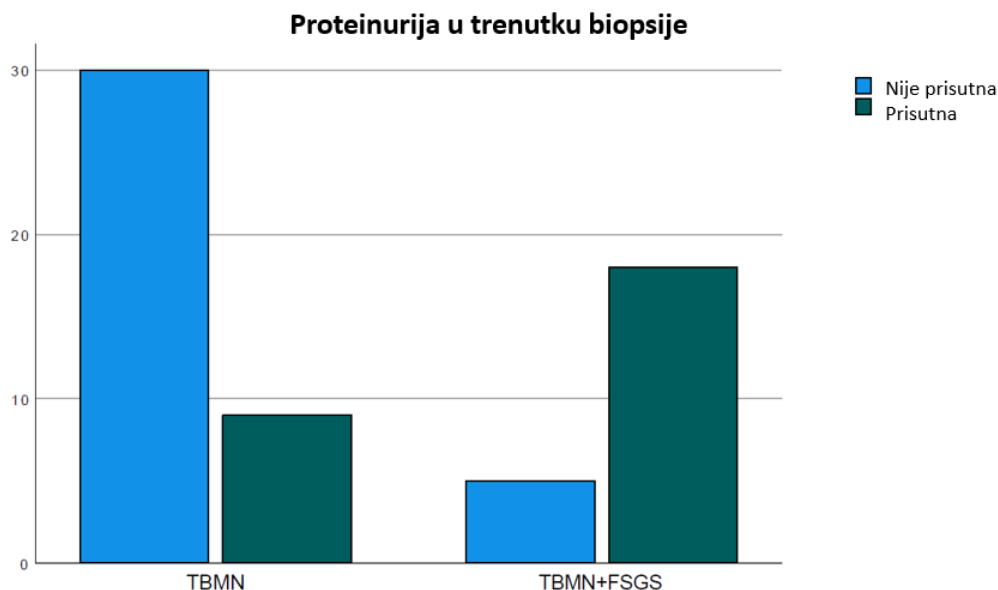
Tablica 7. Kliničke osobitosti bolesnika s varijantama COL4A3, COL4A4 i/ili COL4A5 gena u trenutku biopsije bubrega prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom.

Varijabla	Svi ispitanici s varijantama N = 62	TBMN N = 39	TBMN + FSGS N = 23	P
Spol				0,791
Muško	27 (43,5)	23 (59,0)	12 (52,2)	
Žensko	35 (56,5)	16 (41,0)	11 (47,8)	
Dob (godine)	38,65 (17,0 - 51,63)	36,5 (15,0 - 48,0)	44,5 (26,5 - 58,0)	0,030
Dob prilikom pojave simptoma (godine)	25,0 (10,5 - 37,5)	25,5 (10,0 - 39,25)	18,0 (13,0 - 31,0)	0,958
Nedostaju podaci za 1 ispitanika	1	1	-	
Sindrom				0,142
Izolirana hematurijai/ili proteinurija	54 (87,1)	36 (92,3)	18 (78,3)	
Nefrotski sindrom	5 (8,1)	1 (2,6)	4 (17,4)	
Kronični nefritički sindrom	2 (3,2)	1 (2,6)	1 (4,3)	
Nespecificirano oštećenje bubrega	1 (1,6)	1 (2,6)	0 (0,0)	
Tjelesna masa (kg)	69,53 ± 26,50	62,52 ± 27,67	79,28 ± 21,92	0,039
Visina (cm)	170,0 (163,0 - 176,0)	166,0 (157,5 - 175,5)	173,0 (167,75 - 177,0)	0,136
BMI (kg/m²)	24,39 ± 6,07	22,71 ± 5,89	26,72 ± 5,66	0,031
Hematurija				> 0,999
Da	59 (95,2)	37 (94,9)	22 (95,7)	
Ne	3 (4,8)	2 (5,1)	1 (4,3)	
Proteinurija				< 0,001
Da	27 (43,5)	9 (23,1)	18 (78,3)	
Ne	35 (56,5)	30 (76,9)	5 (21,7)	
24-satna proteinurija (g)	0,19 (0,08 - 1,37)	0,11 (0,08 - 0,25)	1,88 (0,30 - 2,86)	< 0,001
Serumski kreatinin (μmol/l)	76,0 (59,75 - 97,25)	74,0 (58,0 - 81,0)	87,0 (69,0 - 139,0)	0,002
eGFR CKD-EPI (ml/min/1,73m²)	83,33 ± 26,92	90,75 ± 22,97	70,75 ± 28,89	0,004
CKD stadij				0,003

1	28 (45,2)	22 (56,4)	6 (26,1)	
2	22 (35,5)	14 (35,9)	8 (34,8)	
3a	6 (9,7)	2 (5,1)	4 (17,4)	
3b	4 (6,5)	0 (0,0)	4 (17,4)	
4	1 (1,6)	0 (0,0)	1 (4,3)	
5	1 (1,6)	1 (2,6)	0 (0,0)	
Anti-RAAS terapija				0,006
Da	29 (50,9)	13 (36,1)	16 (76,2)	
Ne	28 (49,1)	23 (63,9)	5 (23,8)	
Nedostaju podaci za 5 ispitanika	5	3	2	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza; BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*); eGFR - procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*) po CKD-EPI formuli; CKD - kronična bubrežna bolest (engl. *chronic kidney disease*); RAAS - renin-angiotenzin-aldosteronski sustav.

Prosječna dob u trenutku biopsije iznosila je $36,39 \pm 18$ godina. Većina bolesnika (54; 87,1 %) se klinički manifestirala izoliranom hematurijom i/ili proteinurijom, 5 (8,1 %) ih je imalo nefrotski sindrom, a ostali su se prezentirali kroničnim nefritičkim sindromom (2; 3,2 %) ili nespecificiranim oštećenjem bubrega (1; 1,6 %). Prisutna je statistički značajna razlika u tjelesnoj masi ($P = 0,039$) i BMI-u ($P = 0,031$) između istraživanih skupina gdje bolesnici s TBMN-om prosječno teže 62.52 ± 27.67 kg uz prosječan BMI 22.71 ± 5.89 kg/m², a bolesnici s FSGS-om i TBMN-om prosječno teže 79.28 ± 21.92 kg uz prosječan BMI 26.72 ± 5.66 kg/m². Hematurija je bila prisutna kod 59 (95,2 %) ispitanika, a proteinurija kod njih 27 (43,5 %). Postoji statistički značajna razlika ($P < 0,001$) između bolesnika s patohistološkom dijagnozom TBMN-a kod kojih 9 (23,1 %) ima proteinuriju i bolesnika s dijagnozom FSGS-a i TBMN-a kod kojih čak 18 (78,3 %) ima proteinuriju (sl. 24).



Slika 24. Razlika u prisutnosti proteinurije između ispitivanih skupina u trenutku biopsije bubrega ($P < 0,001$). Odnosi se na ispitanike s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena.

Prisutna je i statistički značajka razlika ($P < 0,001$) između navedenih skupina u medijanu 24-satne proteinurije gdje u skupini bolesnika s TBMN-om ona iznosi 0,11 (0,08 – 0,25) g, a u skupini s FSGS-om i TBMN-om 1,88 (0,3 – 2,86) g. Srednja vrijednost kreatinina za sve ispitanike iznosila je $88,21 \pm 51,71 \mu\text{mol/l}$, a eGFR-a $83,33 \pm 26,92 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Postoji statistički značajna razlika ($P = 0,004$) u srednjoj vrijednosti eGFR-a između ispitivanih skupina koja u skupini bolesnika s TBMN-om iznosi $90,75 \pm 22,97$, a u bolesnika s FSGS-om i TBMN-om $70,75 \pm 28,89 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Najviše pacijenata imalo je CKD stadij 1 tj. urednu bubrežnu funkciju (28; 45,2 %), 22 (35,5 %) ih je imalo CKD stadij 2, 6 (9,7 %) CKD stadij 3a, 4 (6,5 %) CKD stadij 3b, 1 (1,6 %) CKD stadij 4, a 1 (1,6 %) CKD stadij 5. Postoji statistički značajna razlika ($P = 0,003$) u CKD stadijima između ispitivanih skupina gdje u skupini bolesnika s TBMN-om njih 22 (56,4 %) ima urednu bubrežnu funkciju dok ju kod bolesnika s FSGS-om i TBMN-om ona uredna u samo 6 (26,1 %) bolesnika. Podjednak postotak (35,9 % za skupinu s TBMN-om, a 34,8 % za skupinu s FSGS-om i TBMN-om) u obje skupine ima CKD stadij 2. U skupini s TBMN-om samo 3 (7,7 %) bolesnika imaju CKD stadije 3 – 5, a u skupini s FSGS-om i TBMN-om njih čak 9 (39,1 %). U trenutku biopsije, 29 (50,9 %) bolesnika je primalo anti-RAAS terapiju.

U tablici 8 prikazani su vanbubrežni simptomi kod bolesnika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena. Smetnje sluha potvrđene audiometrijom bile su prisutne u svega 4 (6,9 %) bolesnika, a bez audiometrije u još jednoga (1,7 %). Nije bilo bolesnika sa smetnjama vida.

Tablica 8. Vanbubrežni simptomi kod bolesnika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena.

Varijabla	Svi ispitanici s varijantama N = 62	TBMN N = 39	TBMN + FSGS N = 23	P
Nagluhost				0,758
Ne	53 (91,4)	34 (91,9)	19 (90,5)	
Da bez audiometrije	1 (1,7)	1 (2,7)	0 (0,0)	
Da s audiometrijom	4 (6,9)	2 (5,4)	2 (9,5)	
Nedostaju podaci za 4 ispitanika	4	2	2	
Smetnje vida				NA
Ne	58 (100,0)	37 (100,0)	21 (100,0)	
Da	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 4 ispitanika	4	2	2	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza.

U tablici 9 prikazani su komorbiditeti kod bolesnika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena. Pušača je bilo 29 (34,1 %), a hipertoničara 30 (34,5 %). Postoji statistički značajna razlika između ispitivanih skupina u pušenju ($P < 0,001$) i hipertenziji ($P = 0,002$) gdje je u skupini bolesnika s TBMN-om 17,1 % pušača i 19,4 % hipertoničara, a u skupini s FSGS-om i TBMN-om je 63,2 % pušača i 63,2 % hipertoničara. Dijabetes je bio prisutan u 3 (3,4 %), bolesti dišnog sustava u 8 (9,3 %), a bolesti srca u 3 (3,5 %) bolesnika. Niti u jednog bolesnika nisu zabilježene cerebrovaskularne niti periferne vaskularne bolesti.

Tablica 9. Komorbiditeti prisutni kod bolesnika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena.

Varijabla	Svi ispitanici s varijantama N = 62	TBMN N = 39	TBMN + FSGS N = 23	P
Pušenje				< 0,001
Ne	36 (66,7)	29 (82,9)	7 (36,8)	
Da	18 (33,3)	6 (17,1)	12 (63,2)	
Nedostaju podaci za 8 ispitanika	8	4	4	
Hipertenzija				0,002
Ne	36 (65,5)	29 (80,6)	7 (36,8)	
Da	19 (34,5)	7 (19,4)	12 (63,2)	

Nedostaju podaci za 7 ispitanika	7	3	4	
Dijabetes				> 0,999
Ne	52 (94,5)	34 (94,4)	18 (94,7)	
Da	3 (5,5)	2 (5,6)	1 (5,3)	
Nedostaju podaci za 7 ispitanika	7	3	4	
Bolesti pluća				0,302
Ne	48 (88,9)	30 (85,7)	18 (94,7)	
Da	6 (11,1)	5 (14,3)	1 (5,3)	
Nedostaju podaci za 8 ispitanika	8	4	4	
Bolesti srca				0,280
Ne	51 (94,4)	34 (97,1)	17 (89,5)	
Da	3 (5,6)	1 (2,9)	2 (10,5)	
Nedostaju podaci za 8 ispitanika	8	4	4	
Cerebrovaskularne bolesti				
Ne	54 (100,0)	35 (100,0)	19 (100,0)	NA
Da	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 8 ispitanika	8	4	4	
Periferne vaskularne bolesti				
Ne	53 (100,0)	34 (100,0)	19 (100,0)	NA
Da	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 9 ispitanika	9	5	4	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza.

5.5. Klinički podaci ispitanika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena na kraju praćenja

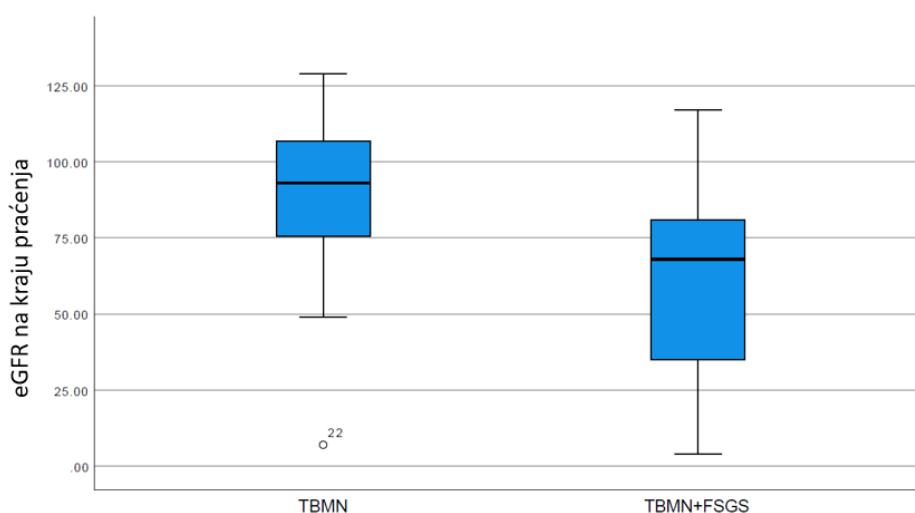
U tablici 10 prikazane su kliničke osobitosti bolesnika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena na kraju praćenja prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom. Prosječna dob za sve ispitanike na zadnjoj kontroli iznosila je $40,77 \pm 16,92$ godina. Postoji statistički značajna razlika u prosječnoj dobi između ispitivanih skupina ($P = 0,018$) koja za ispitanike s TBMN-om iznosi $36,94 \pm 17,0$ godina, a za one s FSGS-om i TBMN-om $47,71 \pm 14,75$ godina. Hematurija je bila prisutna u 52 (88,1 %) bolesnika, a proteinurija u njih 28 (47,5 %).

Tablica 10. Kliničke osobitosti bolesnika s varijantama COL4A3, COL4A4 i/ili COL4A5 gena na kraju praćenja prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom.

Varijabla	Svi ispitanici s varijantama N = 62	TBMN N = 39	TBMN + FSGS N = 23	P
Spol				0,791
Muško	27 (43,5)	23 (59,0)	12 (52,2)	
Žensko	35 (56,5)	16 (41,0)	11 (47,8)	
Dob (godine)	40,77 ± 16,92	36,94 ± 17,0	47,71 ± 14,75	0,018
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	1	2	
Hematurija				> 0,999
Da	52 (88,1)	33 (86,8)	19 (90,5)	
Ne	7 (11,9)	5 (13,2)	2 (9,5)	
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	1	2	
Proteinurija				< 0,001
Da	28 (47,5)	11 (28,9)	17 (81,0)	
Ne	31 (52,5)	27 (71,7)	4 (19,0)	
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	1	2	
24-satna proteinurija (g)	0,19 (0,08 - 1,86)	0,12 (0,08 - 0,31)	2,20 (1,23 - 4,20)	< 0,001
Nedostaju podaci za 6 ispitanika	6	4	2	
Serumski kreatinin (μmol/l)	78,0 (66,0 - 100,0)	73,5 (63,25 - 83,5)	100,0 (73,5 - 178,5)	0,002
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	1	2	
eGFR CKD-EPI (ml/min/1,73m²)	85,6 (65,0 - 103,0)	93,0 (75,28 - 107,43)	68,0 (34,45 - 88,90)	0,009
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	1	2	
CKD stadij				0,005
1	27 (45,8)	22 (57,9)	5 (23,8)	
2	21 (35,6)	12 (31,6)	9 (42,9)	
3a	2 (3,4)	2 (5,3)	0 (0,0)	
3b	4 (6,8)	0 (0,0)	4 (19,0)	
4	1 (1,7)	0 (0,0)	1 (4,8)	
5	4 (6,8)	2 (5,3)	2 (9,5)	
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	1	2	
Promjena CKD stadija od biopsije do kraja praćenja				0,003
Nema promjene	41 (69,5)	32 (84,2)	9 (42,9)	
Pogoršanje	10 (16,9)	3 (7,9)	7 (33,3)	
Poboljšanje	8 (13,6)	3 (7,9)	5 (23,8)	
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	1	2	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza; eGFR - procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*) po CKD-EPI formuli; CKD - kronična bubrežna bolest (engl. *chronic kidney disease*).

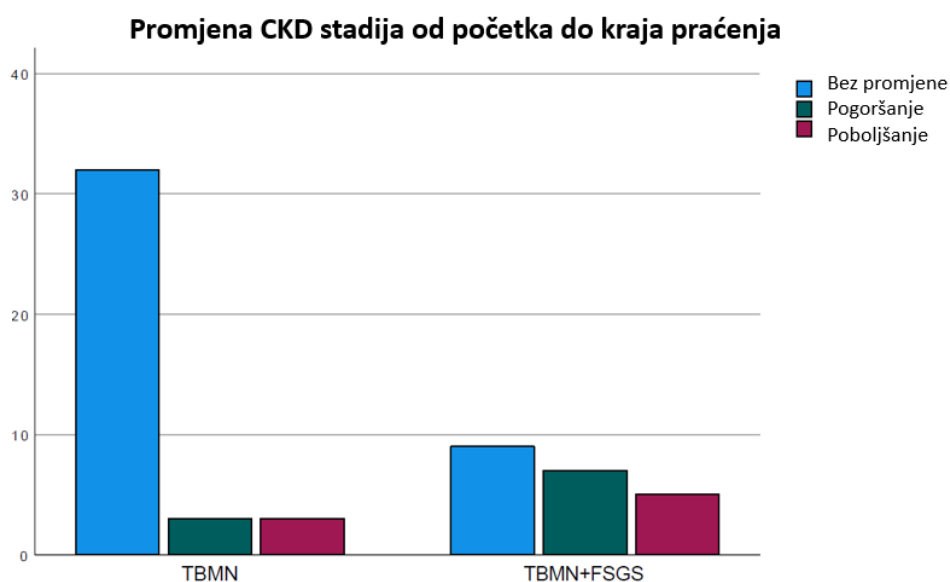
Postoji statistički značajna razlika ($P < 0,001$) između bolesnika s patohistološkom dijagnozom TBMN-a kod kojih 11 (28,9 %) ima proteinuriju i bolesnika s dijagnozom FSGS-a i TBMN-a kod kojih čak 17 (81 %) ima proteinuriju. Također je prisutna statistički značajna razlika ($P < 0,001$) između navedenih skupina u medijanu 24-satne proteinurije gdje u skupini bolesnika s TBMN-om ona iznosi 0,12 (0,08 - 0,31) g, a u skupini s FSGS-om i TBMN-om 2,2 (1,23 – 4,2) g. Srednja vrijednost kreatinina za sve ispitanike iznosila je $112,2 \pm 126,9 \mu\text{mol/l}$, a eGFR-a $81,2 \pm 30,06 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Postoji statistički značajna razlika ($P = 0,009$) u medijanu eGFR-a između ispitivanih skupina koji za skupinu bolesnika s TBMN-om iznosi 93 (75,28 – 107,43) ml/min/1,73m^2 , a za skupinu s FSGS-om i TBMN-om 68 (34,45 – 88,9) ml/min/1,73m^2 (sl. 25).



Slika 25. Histogram koji prikazuje statistički značajnu razliku ($P = 0,009$) u medijanu eGFR-a između ispitivanih skupina. Odnosi se na ispitanike s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena.

Najviše pacijenata imalo je CKD stadij 1 tj. urednu bubrežnu funkciju (27; 45,8 %), njih 21 (35,6 %) imalo je CKD stadij 2, 2 (3,4 %) je imalo CKD stadij 3a, 4 (6,8 %) CKD stadij 3b, 1 (1,7 %) CKD stadij 4, a 4 (6,8 %) CKD stadij 5. Postoji statistički značajna razlika ($P = 0,005$) u CKD stadijima između ispitivanih skupina gdje u skupini bolesnika s TBMN-om njih 22 (57,9 %) ima urednu bubrežnu funkciju dok ju kod bolesnika s FSGS-om i TBMN-om ona uredna u samo 5 (23,8 %) bolesnika. U bolesnika s FSGS-om i TBMN-om teži CKD stadiji (3 – 5) bili su zastupljeni u većem postotku (33,3 %) nego u bolesnika s TBMN-om (10,6 %). Usporedbom CKD stadija bolesnika u trenutku biopsije s onima na kraju praćenja vidimo da u najvećem broju bolesnika nije bilo promjene stadija

(41; 69,5 %), u 10 (16,9 %) bolesnika došlo je do pogoršanja bubrežne funkcije, a u njih 8 (13,6 %) do djelomičnog oporavka. Statistički je značajna razlika ($P = 0,003$) u promjeni CKD stadija odnosno bubrežne funkcije od trenutka biopsije do kraja praćenja između bolesnika s TBMN-om i bolesnika s FSGS-om i TBMN-om. U skupini s TBMN-om bubrežna funkcija je održana ili se djelomično poboljšala u čak 35 (92,1 %) bolesnika, dok je u 3 (7,9 %) bolesnika došlo do pogoršanja. U skupini s FSGS-om i TBMN-om 14 (66,7 %) bolesnika je imalo održanu ili djelomično oporavljenu bubrežnu funkciju, dok je kod 7 (33,3 %) došlo do pogoršanja bubrežne funkcije (sl. 26).



Slika 26. Razlike u promjenama CKD stadija od početka do kraja praćenja između ispitivanih skupina ($P = 0,003$). Odnosi se na ispitanike s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena.

5.6. Patohistološki podaci ispitanika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena

U tablici 11 prikazane su patohistološke osobitosti bolesnika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom. Prosječno je po biopsiji bubrega na svjetlosnoj mikroskopiji nađeno $27,53 \pm 30,1$ glomerul, potpuno vezivno promijenjenih bilo je $3,35 \pm 5,94$, a glomerula sa segmentalnim sklerozama $1,09 \pm 2,44$. Pjenušave stanice bile su prisutne u 3 (4,8 %) biopsije.

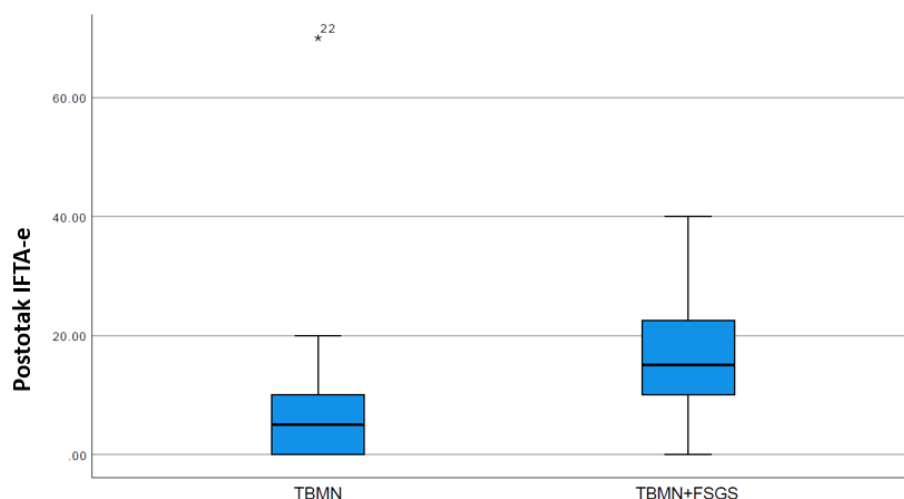
Tablica 11. Patohistološke osobitosti bolesnika s varijantama COL4A3, COL4A4 i/ili COL4A5 gena prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom.

Varijabla	Svi ispitanici s varijantama N = 62	TBMN N = 39	TBMN + FSGS N = 23	P
Broj glomerula	21,0 (12,75 - 33,50)	23,0 (13,0 - 36,0)	15,0 (10,0 - 27,0)	0,114
Broj potpuno vezivno promijenjenih glomerula	2,0 (1,0 - 4,0)	2,0 (0,0 - 4,0)	2,0 (1,0 - 5,0)	0,149
Broj glomerula sa segmentalnim sklerozama	0,0 (0,0 - 1,0)	0,0 (0,0 - 0,0)	2,0 (1,0 - 3,0)	< 0,001
Pjenušave stanice u intersticiju				0,549
Da	3 (4,8)	1 (2,6)	2 (8,7)	
Ne	59 (95,2)	38 (97,4)	21 (91,3)	
IFTA (%)	6,5 (0,0 - 15,0)	5,0 (0,0 - 10,0)	15,0 (10,0 - 25,0)	< 0,001
IFTA stupanj				0,005
do 25 %	56 (90,3)	38 (97,4)	18 (78,3)	
26 – 50 %	5 (8,1)	0 (0,0)	5 (21,7)	
> 50 %	1 (1,6)	1 (2,6)	0 (0,0)	
Upala u intersticiju				0,169
Da	20 (32,3)	10 (25,6)	10 (43,5)	
Ne	42 (67,7)	29 (74,4)	13 (56,5)	
Arteriolskleroz				0,001
Ne	30 (48,4)	24 (61,5)	6 (26,1)	
Nodularna hijalinoza u jednoj arterioli	2 (3,2)	1 (2,6)	1 (4,3)	
Nodularna hijalinoza u više arteriola	16 (25,8)	11 (28,2)	5 (31,3)	
Hijalinoza u cijelom opsegu stijenke	14 (22,6)	3 (7,7)	11 (47,8)	
Fibrointimalno suženje lumena arterija				0,125
Nema suženja	41 (66,1)	28 (71,8)	13 (56,5)	
< 25 %	9 (14,5)	6 (15,4)	3 (13,0)	
25 - 50 %	6 (9,7)	4 (10,3)	2 (8,7)	
> 50 %	6 (9,7)	1 (2,6)	5 (21,7)	
Prosječna debljina GBM (nm)	187,37 ± 31,1	184,62 ± 31,78	192,04 ± 29,92	0,367
Minimalna debljina GBM (nm)	102,0 (89,75 - 118,25)	103,0 (89,0 - 117,0)	98,0 (90,0 - 120,0)	0,810
Maksimalna debljina GBM (nm)	289,0 (275,0 - 377,75)	301,0 (262,0 - 386,0)	331,0 (302,0 - 371,0)	0,440
Standardna devijacija debljine GBM (nm)	50,0 (39,0 - 67,25)	49,0 (38,0 - 68,0)	50,0 (44,0 - 64,0)	0,427
Lameliranje GBM-a				0,195
Nema	34 (54,8)	24 (61,5)	10 (43,5)	
Fokalno	28 (45,2)	15 (38,5)	13 (56,5)	
Izraženo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Izmjena tankih dijelova i zadebljanja GBM				0,602
Nema	33 (53,2)	22 (56,4)	11 (47,8)	

Ima	29 (46,8)	17 (43,6)	12 (52,2)	
-----	-----------	-----------	-----------	--

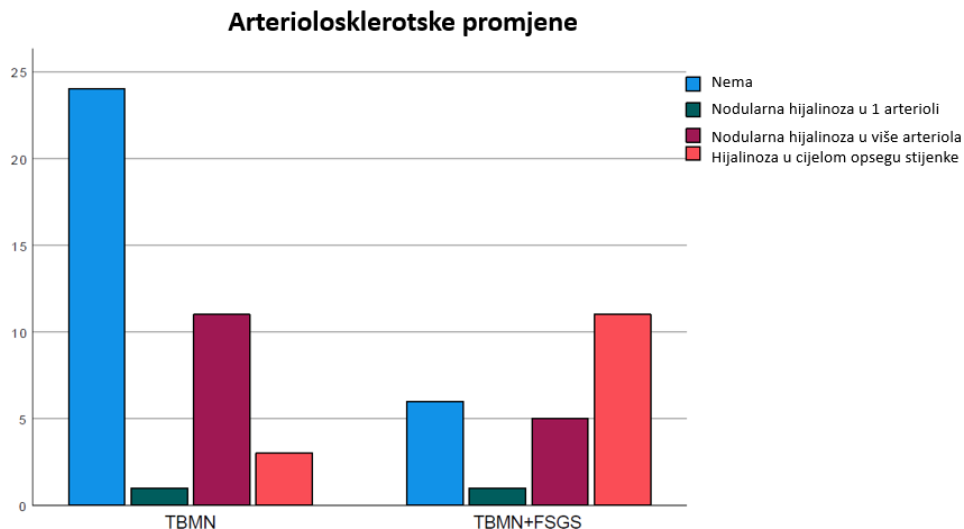
TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza; IFTA – intersticijska fibroza i tubularna atrofija; GBM – glomerularna bazalna membrana.

U najvećem broju biopsija (56; 90,3 %) je IFTA bila blagog stupnja (zahvaća do 25 % kore), u 5 (8,1 %) biopsija je bila umjerena (zahvaća 26 – 50 % kore), a u jednoj (1,6 %) izražena (zahvaća više od 50 % kore). Prisutna je statistički značajna razlika ($P = 0,005$) u stupnju IFTA-e između bolesnika s TBMN-om kod kojih je u 38 (97,4 %) biopsija ona bila blagog stupnja, a samo u jednoj (2,6 %) teškog, i bolesnika s FSGS-om i TBMN-om kod kojih se u 18 (78,3 %) nalazi blagi, a u 5 (21,7 %) umjereni stupanj IFTA-e (sl. 27).



Slika 27. Izraženost IFTA-e u biopsijama bubrega između ispitivanih skupina ($P < 0,001$). Odnosi se na bolesnike s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena.

U 30 (48,4 %) biopsija arteriole imaju urednu morfologiju, u 18 (29 %) je prisutna nodularna hijalinoza, a u 14 (22,6 %) hijalinoza u cijelom opsegu stijenke arteriola. Postoji statistički značajna razlika ($P = 0,001$) između skupine bolesnika s TBMN-om gdje 24 (61,5 %) ima uredan nalaz, 12 (30,8 %) ima nodularnu, a samo 3 (7,7 %) hijalinozu u cijelom opsegu stijenke arteriola te skupine s FSGS-om i TBMN-om gdje samo 6 (26,1 %) ima uredan nalaz, 6 (26,1 %) ima nodularnu, a 11 (47,8 %) hijalinozu u cijelom opsegu stijenke (sl. 28).



Slika 28. Razlika u intenzitetu arteriolsklerotskih promjena između ispitivanih skupina ($P = 0,001$). Odnosi se na ispitanike s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena.

Fibrointimalnog suženja lumena arterija u većini slučajeva nije bilo (41; 66,1 %), u 9 (4,5 %) biopsija je nađeno blago suženje (do 25 % lumena), u 6 (9,7 %) umjereno suženje (26 – 50 % lumena) i u 6 (9,7 %) teško suženje lumena (više od 50 % lumena).

Ultrastrukturnom analizom tkiva bubrega izmjerena je debljina GBM-a, a podaci su prikazani u tbl 11. U nešto više biopsija (34; 54,8 %) nije bilo lameliranja, a samo fokalno lameliranje nađeno je u njih 28 (45,2 %), dok su izmjene tankih dijelova i zadebljanja GBM-a nađene u 29 (46,8 %) biopsija. Nije bilo statistički značajne razlike u izraženosti lameliranja i izmjenama tankih dijelova i zadebljanja GBM-a između bolesnika s TBMN-om i bolesnika s FSGS-om i TBMN-om.

5.7. Rezultati sekvenciranja nove generacije za gene *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5*

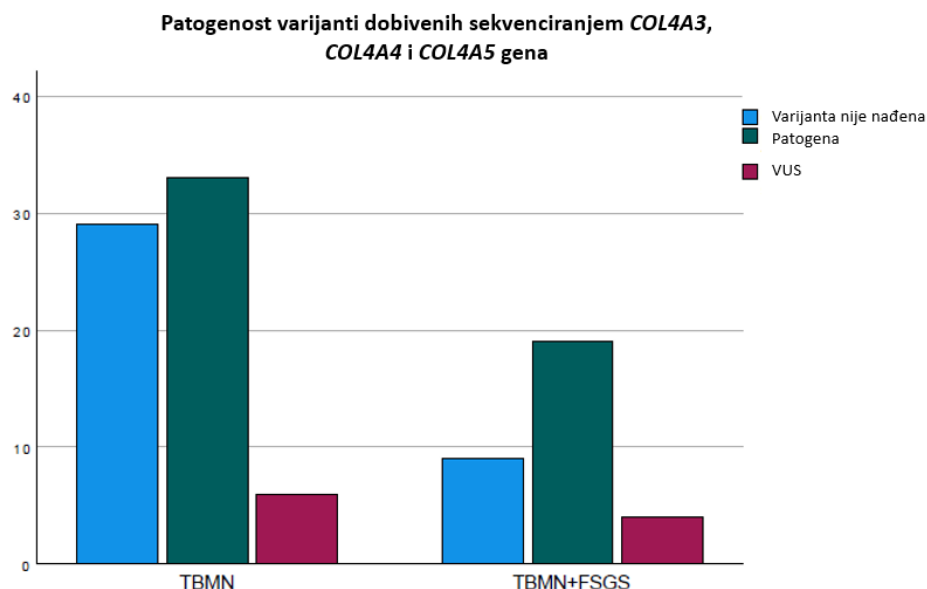
U tablici 12 prikazane su osobitosti varijanti dobivenih NGS-om za gene *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* u svih bolesnika s varijantom te istih bolesnika prema skupinama određenima patohistološkom dijagnozom. U 52 od 100 testiranih ispitanika nađena je patogena, a u 10 VUS. Među nađenim varijantama 45 je različitih, a među njima su sve, osim tri, novootkrivene varijante koje nisu prijavljene niti opisane u HGMD-u.

Tablica 12. Osobitosti varijanti *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena dobivenih sekvenciranjem nove generacije.

Varijabla	Ispitanici s varijantom N = 62	TBMN N = 39	TBMN + FSGS N = 23	P
Spol				0,791
Muško	27 (43,5)	16 (41,0)	11 (47,8)	
Žensko	35 (56,5)	23 (59,0)	12 (52,2)	
Zahvaćeni geni				0,182
<i>COL4A3</i>	22 (35,5)	15 (38,5)	7 (30,4)	
<i>COL4A4</i>	26 (41,9)	13 (33,3)	13 (56,5)	
<i>COL4A5</i>	14 (22,6)	11 (28,2)	3 (13,0)	
Oblik nasljeđivanja				0,218
Autosomno	48 (77,4)	28 (71,7)	20 (87,0)	
X-vezano	14 (22,6)	11 (28,2)	3 (13,0)	
Patogenost varijanti				
Patogeno	52 (83,87)	33 (84,6)	19 (82,6)	> 0,999
VUS	10 (16,13)	6 (15,4)	4 (17,4)	
Genotip				> 0,999
Heterozigot	55 (88,7)	34 (87,2)	21 (91,3)	
Hemizigot	7 (11,3)	5 (12,8)	2 (8,7)	
Tip varijante				0,436
Besmislena (engl, <i>nonsense</i>)	11 (17,7)	5 (12,8)	6 (26,1)	
Pogrešna (engl, <i>missense</i>)	28 (45,2)	20 (51,3)	8 (34,8)	
Alternativno prekranje (engl. <i>alternative splicing</i>)	21 (33,9)	13 (33,3)	8 (34,8)	
Pomak okvira čitanja (engl. <i>frameshift</i>)	2 (3,2)	1 (2,6)	1 (4,3)	

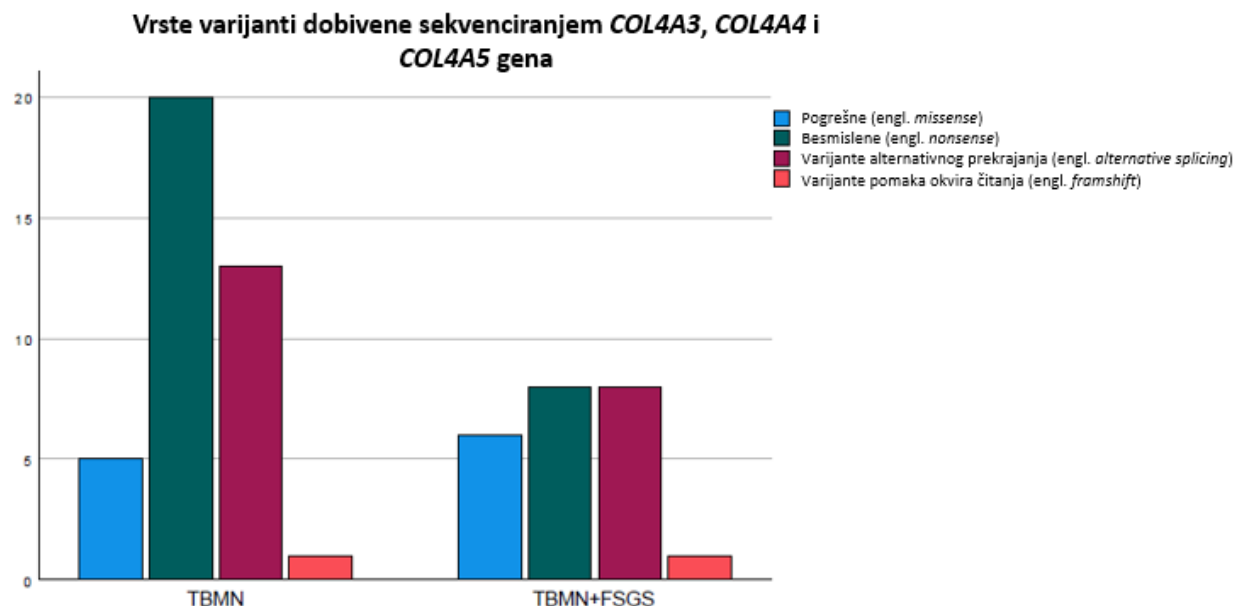
TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza; VUS - varijanta nepoznatog značana (engl. *variant of uncertain significance*).

Iako statistički neznajno, među bolesnicima s varijantom u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genu, patogenih i VUS varijanti nađeno je u većem postotku (71,9 %) u skupini bolesnika s FSGS-om i TBMN-om u odnosu na skupinu s TBMN-om (57,4 %) (sl. 29).



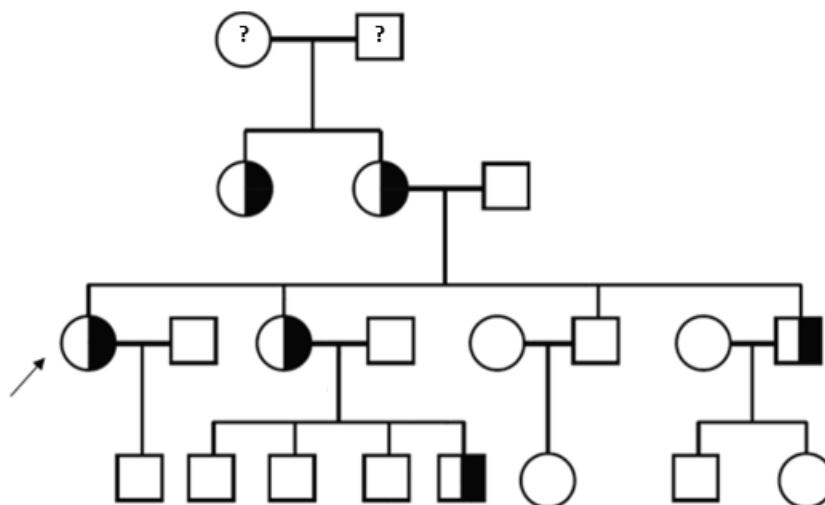
Slika 29. Raspodjela varijanti COL4A3, COL4A4 i/ili COL4A5 gena po skupinama bolesnika prema patogenosti.

Neznatno više žena (35; 56,5 %) je zahvaćeno varijantom COL4A3, COL4A4 i/ili COL4A5 gena u odnosu na muškarce (27; 43,5 %). Prema obliku nasljeđivanja prevladavaju autosomne varijante (48; 77,4 %) dok je X-vezanih manje (14; 22,6 %). Većina pronađenih varijanti je patogena (52; 83,87 %), a tek 10 (16,13 %) ih je nepoznatog značaja. Prema tipu varijante najviše (28; 45,2 %) je pogrešnih (engl. *missense*), slijede varijante alternativnog prekrajanja (engl. *alternative splicing*; 21; 33,9 %), zatim besmislene varijante (engl. *nonsense*; 11; 17,7 %), a najmanje je varijanti s pomakom okvira čitanja (engl. *frameshift*; 2; 3,2 %). U 5 (8,06 %) bolesnika nađene su po dvije varijante – jedna patogena i jedna VUS. Slika 30 prikazuje raspodjelu pojedinih tipova varijanti po skupinama bolesnika. Nije nađena statistički značajna razlika u patogenosti i tipu varijante između skupine bolesnika s TBMN-om i skupine s FSGS-om i TBMN-om.



Slika 30. Raspodjela varijanti *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena po skupinama bolesnika prema tipu varijante.

Za obitelji s više zahvaćenih članova izrađena su rodoslovna stabla kao što je prikazano na slici 31. Slika prikazuje obitelj s varijantom *COL4A3* c.2881+1G>A koja je zanimljiva jer izaziva raznolike fenotipe unutar iste obitelji, a detaljno je opisana u radu Horačeka i sur. (103).



Slika 31. Rodoslovno stablo obitelji s varijantom *COL4A3* c.2881+1G>A. Članovi obitelji označeni s „?“ nisu testirani NGS metodom niti je učinjen nalaz urina. Strelicom je označen proband. Preuzeto iz Horaček i sur. (103).

5.8. Genotip-fenotip korelacija

Osim usporedbe grupa bolesnika prema patohistološkoj dijagnozi, dodatno je učinjena usporedba prema tipu naslijeđene varijante, a odnosi se na: besmislene varijante (engl. *nonsense*), pogrešne varijante (engl. *missense*), varijante alternativnog prekrajanja (engl. *alternative splicing*) i varijante pomaka okvira čitanja (engl. *frameshift*).

Usporedbom navedenih grupa prema kliničkim parametrima (tbl. 13) na početku praćenja (u trenutku biopsije) nije nađena statistički značajna varijanta niti u jednom navedenom parametru.

Tablica 13. Kliničke osobitosti bolesnika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* u trenutku biopsije bubrega prema skupinama određenima po tipu naslijeđene varijante.

Varijabla	Ispitanici s varijantom N = 62	Besmislena N = 11	Pogrešna N = 28	Alternativno prekrajanje N = 21	Pomak okvira čitanja N = 2	P
Spol						0,173
Muško	27 (43,5)	6 (54,5)	9 (32,1)	12 (57,1)	0 (0,0)	
Žensko	35 (56,5)	5 (45,5)	19 (67,9)	9 (42,9)	2 (100,0)	
Dob (godine)	38,65 (17,0 - 51,63)	42,5 (23,0 - 57,3)	36,75 (14,75 - 47,70)	42,0 (25,5 - 55,5)	36,1 (34,5 - NA)	0,360
Dob prilikom pojave simptoma (godine)	25,0 (10,5 - 37,5)	36,0 (15,0 - 48,0)	18,0 (10,0 - 35,0)	16,0 (10,0 - 32,5)	26,0 (25,0 - NA)	0,629
Nedostaju podaci za 1 ispitanika	1	-	1	-	-	
Sindrom						0,096
Izolirana hematurija i/ili proteinurija	54 (87,1)	7 (63,6)	25 (89,3)	20 (95,2)	2 (100,0)	
Nefrotski sindrom	5 (8,1)	3 (27,3)	2 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Kronični nefritički sindrom	2 (3,2)	0 (0,0)	1 (3,6)	1 (4,8)	0 (0,0)	
Nespecificirano oštećenje bubrega	1 (1,6)	1 (9,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Tjelesna masa (kg)	69,53 ± 26,50	84,1 ± 20,54	63,9 ± 30,76	69,27 ± 22,63	64,0	0,354
Visina (cm)	170,0 (163,0 - 176,0)	173,0 (173,0 - 175,5)	166,0 (140,5 - 173,0)	170,0 (164,0 - 180,0)	NA	0,177
BMI (kg/m²)	24,39 ± 6,07	27,53 ± 6,31	24,01 ± 7,20	23,43 ± 4,04	21,1	0,422
Hematurija						0,206
Da	59 (95,2)	9 (81,8)	27 (96,4)	21 (100,0)	2 (100,0)	
Ne	3 (4,8)	2 (18,2)	1 (3,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Proteinurija						0,421

Da	27 (43,5)	6 (54,5)	9 (32,1)	11 (52,4)	1 (50,0)	
Ne	35 (56,5)	5 (45,5)	19 (67,9)	10 (47,6)	1 (50,0)	
24-satna proteinurija (g)	0,19 (0,08 - 1,37)	0,46 (0,18 - 2,34)	0,11 (0,08 - 0,54)	0,30 (0,08 - 2,14)	0,86 (0,15 - NA)	0,206
Serumski kreatinin (μmol/l)	76,0 (59,75 - 97,25)	82,0 (69,0 - 111,0)	72,0 (59,25 - 86,75)	81,0 (58,5 - 102,5)	66,0 (54,0 - NA)	0,451
eGFR CKD-EPI (ml/min/1,73m²)	83,33 ± 26,92	71,95 ± 29,21	86,47 ± 26,81	83,41 ± 25,84	101,0 ± 24,04	0,368
CKD stadij						0,694
1	28 (45,2)	3 (27,3)	15 (53,6)	9 (42,9)	1 (50,0)	
2	22 (35,5)	6 (54,5)	7 (25,0)	8 (38,1)	1 (50,0)	
3a	6 (9,7)	0 (0,0)	5 (17,9)	1 (4,8)	0 (0,0)	
3b	4 (6,5)	1 (9,1)	0 (0,0)	3 (14,3)	0 (0,0)	
4	1 (1,6)	0 (0,0)	1 (3,6)	0 (0,0)	0 (0,0)	
5	1 (1,6)	1 (9,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Anti-RAAS terapija						0,108
Da	29 (50,9)	8 (72,7)	9 (34,6)	11 (61,1)	1 (50,0)	
Ne	28 (49,1)	3 (27,3)	17 (65,4)	7 (38,9)	1 (50,0)	
Nedostaju podaci za 5 ispitanika	5	-	2	3	-	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza; BMI – indeks tjelesne mase (engl. *body mass index*); eGFR - procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*) po CKD-EPI formuli; CKD - kronična bubrežna bolest (engl. *chronic kidney disease*); RAAS - renin-angiotenzin-aldosteronski sustav.

Također, usporedbom vanbubrežnih simptoma (tbl. 14) i komorbiditeta (tbl. 15), nisu nađene statistički značajne razlike.

Tablica 14. Vanbubrežni simptomi kod bolesnika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena prema skupinama određenima po tipu naslijeđene varijante.

Varijabla	Ispitanici s varijantom N = 62	Besmislena N = 11	Pogrešna N = 28	Alternativno prekrajanje N = 21	Pomak okvira čitanja N = 2	P
Nagluhost						0,634
Ne	53 (91,4)	10 (90,9)	25 (96,2)	16 (84,2)	2 (100,0)	
Da bez audiometrije	1 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (5,3)	0 (0,0)	
Da s audiometrijom	4 (6,9)	1 (9,1)	1 (3,8)	2 (10,5)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 4 ispitanika	4	-	2	2	-	
Smetnje vida						NA
Ne	58 (100,0)	11 (100,0)	26 (100,0)	19 (100,0)	2 (100,0)	
Da	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 4 ispitanika	4	-	2	2	-	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza.

Tablica 15. Komorbiditeti prisutni kod bolesnika s varijantama COL4A3, COL4A4 i/ili COL4A5 gena prema skupinama određenima po tipu naslijeđene varijante.

Varijabla	Ispitanici s varijantom N = 62	Besmislena N = 11	Pogrešna N = 28	Alternativno prekranje N = 21	Pomak okvira čitanja N = 2	P
Pušenje						0,216
Ne	36 (66,7)	5 (45,5)	18 (78,3)	12 (63,2)	1 (100,0)	
Da	18 (33,3)	6 (54,5)	5 (21,7)	7 (36,8)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 8 ispitanika	8	-	5	2	1	
Hipertenzija						0,129
Ne	36 (65,5)	4 (36,4)	17 (70,8)	14 (73,7)	1 (100,0)	
Da	19 (34,5)	7 (63,6)	7 (29,2)	5 (26,3)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 7 ispitanika	7	-	4	2	1	
Dijabetes						> 0,999
Ne	52 (94,5)	11 (100,0)	22 (91,7)	18 (94,7)	1 (100,0)	
Da	3 (5,5)	0 (0,0)	2 (8,3)	1 (5,3)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 7 ispitanika	7	-	4	2	1	
Bolesti pluća						0,406
Ne	48 (88,9)	9 (81,8)	22 (95,7)	16 (84,2)	1 (100,0)	
Da	6 (11,1)	2 (18,2)	1 (4,3)	3 (15,8)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 8 ispitanika	8	-	5	2	1	
Bolesti srca						> 0,999
Ne	51 (94,4)	11 (100,0)	21 (91,3)	18 (94,7)	1 (100,0)	
Da	3 (5,6)	0 (0,0)	2 (8,7)	1 (5,3)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 8 ispitanika	8	-	5	2	1	
Cerebrovaskularne bolesti						NA
Ne	54 (100,0)	11 (100,0)	23 (100,0)	19 (100,0)	1 (100,0)	
Da	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 8 ispitanika	8	-	5	2	1	
Periferne vaskularne bolesti						NA
Ne	53 (100,0)	11 (100,0)	23 (100,0)	18 (100,0)	1 (100,0)	
Da	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 9 ispitanika	9	-	5	3	1	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza.

Usporedbom kliničkih parametara (tbl. 16) na kraju praćenja, nije nađena statistički značajna varijanta niti u jednom navedenom parametru.

Tablica 16. Kliničke osobitosti bolesnika s varijantama COL4A3, COL4A4 i/ili COL4A5 gena na kraju praćenja prema skupinama određenima po tipu naslijeđene varijante.

Varijabla	Ispitanici s varijantom N = 62	Besmislena N = 11	Pogrešna N = 28	Alternativno prekranjanje N = 21	Pomak okvira čitanja N = 2	P
Spol						0,173
Muško	27 (43,5)	6 (54,5)	9 (32,1)	12 (57,1)	0 (0,0)	
Žensko	35 (56,5)	5 (45,5)	19 (67,9)	9 (42,9)	2 (100,0)	
Dob (godine)	40,77 ± 16,92	44,01 ± 19,24	36,72 ± 16,68	45,34 ± 15,81	38,25 ± 5,30	0,242
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	-	3	-	-	
Hematurija						0,816
Da	52 (88,1)	9 (81,8)	22 (88,0)	19 (90,5)	2 (100,0)	
Ne	7 (11,9)	2 (18,2)	3 (12,0)	2 (9,5)	0 (0,0)	
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	-	3	-	-	
Proteinurija						0,517
Da	28 (47,5)	6 (54,5)	9 (36,0)	12 (57,1)	1 (50,0)	
Ne	31 (52,5)	5 (45,5)	16 (64,0)	9 (42,9)	1 (50,0)	
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	-	3	-	-	
24-satna proteinurija (g)	0,19 (0,08 - 1,86)	0,74 (0,08 - 2,60)	0,12 (0,08 - 0,72)	0,37 (0,095 - 1,93)	1,19 (0,19 - NA)	0,200
Nedostaju podaci za 6 ispitanika	6	-	6	-	-	
Serumski kreatinin (μmol/l)	78,0 (66,0 - 100,0)	77,0 (69,0 - 104,0)	75,0 (59,5 - 98,5)	83,0 (67,5 - 114,5)	77,5 (56,0 - NA)	0,571
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	-	3	-	-	
eGFR CKD-EPI (ml/min/1,73m²)	81,20 ± 30,06	77,65 ± 37,07	85,13 ± 29,65	77,65 ± 27,48	89,0 ± 39,60	0,808
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	-	3	-	-	
CKD stadij						0,160
1	27 (45,8)	5 (45,5)	14 (56,0)	7 (33,3)	1 (50,0)	
2	21 (35,6)	4 (36,4)	7 (28,0)	10 (47,6)	0 (0,0)	
3a	2 (3,4)	0 (0,0)	2 (8,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
3b	4 (6,8)	0 (0,0)	1 (4,0)	3 (14,3)	0 (0,0)	
4	1 (1,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,8)	0 (0,0)	
5	4 (6,8)	2 (18,2)	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (50,0)	
Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	-	3	-	-	
Promjena CKD stadija od biopsije do kraja praćenja						0,830
Nema promjene	41 (69,5)	6 (54,5)	18 (72,0)	15 (71,4)	2 (100,0)	
Pogoršanje	10 (16,9)	2 (18,2)	4 (16,0)	4 (19,0)	0 (0,0)	
Poboljšanje	8 (13,6)	3 (27,3)	3 (12,0)	2 (9,5)	0 (0,0)	

Nedostaju podaci za 3 ispitanika	3	-	3	-	-	
-------------------------------------	---	---	---	---	---	--

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza; eGFR - procijenjena brzina glomerularne filtracije (engl. *estimated glomerular filtration rate*) po CKD-EPI formuli; CKD - kronična bubrežna bolest (engl. *chronic kidney disease*).

Usporedbom patohistoloških parametara (tbl. 17), nije nađena statistički značajna varijanta niti u jednom navedenom parametru.

Tablica 17. Patohistološke osobitosti bolesnika s varijantama *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena prema skupinama određenima po tipu naslijeđene varijante.

Varijabla	Ispitanici s varijantom N = 62	Besmislena N = 11	Pogrešna N = 28	Alternativno prekranje N = 21	Pomak okvira čitanja N = 2	P
Spol						0,173
Muško	27 (43,5)	6 (54,5)	9 (32,1)	12 (57,1)	0 (0,0)	
Žensko	35 (56,5)	5 (45,5)	19 (67,9)	9 (42,9)	2 (100,0)	
Dob (godine)	38,65 (17,0 - 51,63)	42,5 (23,0 - 57,3)	36,75 (14,75 - 47,70)	42,0 (25,5 - 55,5)	36,1 (34,5 - NA)	0,360
Patohistološka dijagnoza						0,436
TBMN	39 (62,9)	5 (45,5)	20 (71,4)	13 (61,9)	1 (50,0)	
FSGS + TBMN	23 (37,1)	6 (54,5)	8 (28,6)	8 (38,1)	1 (50,0)	
Broj glomerula	21,0 (12,75 - 33,50)	21,0 (15,0 - 42,0)	23,0 (11,25 - 36,50)	16,0 (10,5 - 25,5)	30,5 (30,0 - NA)	0,204
Broj potpuno vezivno promijenjenih glomerula	2,0 (1,0 - 4,0)	2,0 (1,0 - 5,0)	1,5 (0,25 - 4,0)	2,0 (1,0 - 4,0)	2,0 (1,0 - NA)	0,869
Broj glomerula sa segmentalnim sklerozama	0,0 (0,0 - 1,0)	1,0 (0,0 - 2,0)	0,0 (0,0 - 1,0)	0,0 (0,0 - 1,5)	3,0 (0,0 - NA)	0,258
Pjenušave stanice u intersticiju						0,068
Da	3 (4,8)	0 (0,0)	2 (7,1)	0 (0,0)	1 (50,0)	
Ne	59 (95,2)	11 (100,0)	26 (92,9)	21 (100,0)	1 (50,0)	
IFTA (%)	6,5 (0,0 - 15,0)	10,0 (0,0 - 20,0)	5,0 (0,0 - 10,0)	5,0 (2,5 - 20,0)	7,5 (0,0 - NA)	0,395
IFTA stupanj						0,295
do 25 %	56 (90,3)	9 (81,8)	27 (96,4)	18 (85,7)	2 (100,0)	
25 – 50 %	5 (8,1)	1 (9,1)	1 (3,6)	3 (14,3)	0 (0,0)	
> 50 %	1 (1,6)	1 (9,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Upala u intersticiju						0,303
Da	20 (32,3)	2 (18,2)	8 (28,6)	10 (47,6)	0 (0,0)	
Ne	42 (67,7)	9 (81,8)	20 (71,4)	11 (52,4)	2 (100,0)	
Arterioloskleroza						0,284

Ne	30 (48,4)	3 (27,3)	16 (57,1)	11 (52,4)	0 (0,0)	
Nodularna hijalinoza u jednoj arterioli	2 (3,2)	0 (0,0)	2 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Nodularna hijalinoza u više arteriola	16 (25,8)	3 (27,3)	6 (21,4)	6 (28,6)	1 (50,0)	
Hijalinoza u cijelom opsegu stijenke	14 (22,6)	5 (45,5)	4 (14,3)	4 (19,0)	1 (50,0)	
Fibrointimalno suženje lumena arterija						0,069
Nema suženja	41 (66,1)	6 (54,5)	22 (78,6)	12 (57,1)	1 (50,0)	
do 25 %	9 (14,5)	0 (0,0)	3 (10,7)	6 (28,6)	0 (0,0)	
25 – 50 %	6 (9,7)	2 (18,2)	2 (7,1)	2 (9,5)	0 (0,0)	
> 50 %	6 (9,7)	3 (27,3)	1 (3,6)	1 (4,8)	1 (50,0)	
Prosječna debljina GBM-a (nm)	187,37 ± 31,1	196,09 ± 22,21	183,68 ± 28,81	187,67 ± 38,89	188,0 ± 8,49	0,747
Minimalna debljina GBM-a (nm)	106,18 ± 22,67	95,82 ± 17,46	105,71 ± 17,79	112,52 ± 29,67	103,0 ± 9,9	0,266
Maksimalna debljina GBM-a (nm)	330,39 ± 88,83	358,63 ± 103,52	317,5 ± 78,69	333,48 ± 97,12	323,0 ± 67,88	0,638
Standardna devijacija debljine GBM-a (nm)	50,0 (39,0 - 67,25)	55,0 (44,0 - 92,0)	46,5 (37,25 - 63,75)	50,0 (38,5 - 64,5)	54,5 (41,0 - NA)	0,338
Lameliranje GBM-a						0,534
Nema	34 (54,8)	7 (63,6)	13 (46,4)	12 (57,1)	2 (100,0)	
Fokalno	28 (45,2)	4 (36,4)	15 (53,6)	9 (42,9)	0 (0,0)	
Izraženo	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	
Izmjena tankih dijelova i zadebljanja GBM-a						0,558
Nema	33 (53,2)	7 (63,6)	13 (46,4)	11 (52,4)	2 (100,0)	
Ima	29 (46,8)	4 (36,4)	15 (53,6)	10 (47,6)	0 (0,0)	

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza; IFTA – intersticijska fibroza i tubularna atrofija; GBM – glomerularna bazalna membrana.

6. RASPRAVA

6.1. Prevalencija poremećaja Alportovog spektra i COL4 varijanti

Točna prevalencija AS-a nije poznata i varira u različitim regijama svijeta: u saveznoj državi Utah (SAD) 1 : 500, u Švedskoj 1 : 17 000, a u Finskoj 1 : 53 000. Osim AS-a, varijante *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* gena dovode i do TBMN-a za koji se smatra da mu je prevalencija u općoj populaciji 1 – 2,5 %. Analiza patogenih varijanti *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* gena u gnomAD bazi podataka pokazala je da je prevalencija X-vezanih varijanti u općoj populaciji 1 : 2 000, a autosomnih heterozigotnih 1 : 100. Međutim, ove prevalencije nisu sasvim precizne jer ne uključuju pojedince s već dijagnosticiranom bolešću i s dubokim intronskim delecijama koje nije moguće otkriti ciljanim sekvenciranjem već sekvenciranjem cijelog genoma (75, 104).

U sklopu projekta „Genotip-fenotip korelacija u Alportovom sindromu i nefropatiji tankih glomerularnih bazalnih membrana“ NGS metodom testirano je 428 bolesnika s dijagnozom TBMN-a ili AS-a te članova njihovih obitelji koji su imali hematuriju. Od toga su kod njih 237 (55,4 %) nađene patogene i/ili VUS varijante u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genima. Među bolesnicima s varijantama, 91 (38,4 %) je imalo X-vezano nasljeđivanje, a u 146 (61,6 %) je nasljeđivanje bilo autosomno, od čega je samo 1 (0,7 %) bolesnik bio homozigot (neobjavljeni podaci). U ovo istraživanje je uključeno 100 bolesnika s TBMN-om, od čega je 32 dodatno imalo i FSGS. Kod 62 bolesnika nađene su patogene i/ili VUS varijante u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genima. Među njima su većinom bili autosomni heterozigoti (77,4 %), a manji dio je imao X-vezanu bolest (22,6 %).

6.2. Povezanost tankih glomerularnih bazalnih membrana s fokalnom segmentalnom glomerulosklerozom

Pretragom registra biopsija bubrega Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava određena je učestalost TBMN-a od 4,1 %. To uključuje samo bolesnike kojima je rađena biopsija bubrega pa je pretpostavka da je u

općoj populaciji učestalost TBMN-a čak i veća. Na to su ukazali Dische i sur. koji su ultrastrukturnom analizom tkiva donorskih bubrega uočili da je u 9,2 % biopsija, srednja vrijednost debljine GBM-a odgovarala kriterijima za dijagnozu TBMN-a (105). Šenjug i sur. su u čak 31 % nultih biopsija ultrastrukturnom analizom dijagnosticirali TBMN prema standardizaciji Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava, a prema kriterijima WHO-a u njih čak 41,7 % (106).

Dijagnoza TBMN-a nije u potpunosti precizna. Jedan od razloga je što ne postoji strogo određeni referentni raspon normalne debljine GBM-a, a postoji i velika raznolikost u pojedinim referentnim rasponima određenima u različitim ustanovama. Osim toga, više je čimbenika koji utječu na debljinu GBM-a, a to su: spol i dob bolesnika, metodologija pripreme preparata za elektronsku mikroskopiju, metodologija informatičke provedbe mjerenja debljine GBM-a i, konačno, individualnost pojedinca koji provodi mjerenje. Nekoliko autora naglasilo je važnost standardizacije mjerenja i određivanja referentnog raspona debljine GBM-a (12, 107). Stoga je na Odjelu za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava provedena standardizacija i mjerenje debljine modificiranom metodom prema Haas-u (12, 92).

Osim toga, TBMN ne predstavlja zaseban kliničko-patološki entitet s jasnom kliničkom slikom i prognozom. Nalaz tankih membrana na EM-u prisutan je kod muškaraca u ranom stadiju XAS-a, žena bilo koje dobi s XAS-om, mladih muškaraca i žena s ARAS-om te muškaraca i žena s heterozigotnim varijantama *COL4A3* i *COL4A4* gena koji mogu i ne moraju doživjeti progresiju bolesti do ESRD-a (35).

Više istraživanja je pokazalo da neće svaki pojedinac s TBMN-om imati benignan tijek bolesti s izoliranom hematurijom već da će u dijela bolesnika biti prisutan i FSGS s progresijom u ESRD (50-54). Iz tog razloga, neki stručnjaci predlažu da se TBMN treba smatrati patohistološkom promjenom, a ne zasebnim kliničko-patološkim entitetom ili stanjem nosioca za AS. Bolesnike s nalazom TBMN-a na EM-u, sa ili bez FSGS-a i potvrđenom varijantom u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genu trebalo bi dijagnosticirati kao AS, a ne kao TBMN i gensku FSGS (108). U ovom istraživanju ustanovljeno je da 30,1 % bolesnika s TBMN-om ima i FSGS i da je učestalost FSGS-a s TBMN-om u Registru nativnih biopsija bubrega Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava 1,2 % te da su kod tih bolesnika simptomi i morfološke promjene

značajno izraženije nego u pacijenata samo s TBMN-om. Bolesnike s TBMN na EM-u i varijantom u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genu treba shvatiti kao pojedince s rizikom za razvoj FSGS-a s proteinurijom i progresijom u ESRD. Sam nalaz TBMN-a na EM-u nema nikakvu prognostičku vrijednost, niti u pedijatrijskoj niti u odrasloj populaciji, budući da se samo na temelju tog nalaza ne može reći u kojih će bolesnika bolest progredirati, a u kojih neće (109).

Iako kod svih 100 ispitanika uključenih u ovo istraživanje klinički i patohistološki nalazi upućuju na TBMN sa ili bez FSGS-a, u 38 % bolesnika nije nađena varijanta u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genu. Istraživanja su pokazala da NGS može otkriti približno 95 % besmislenih i pogrešnih varijanti, delecija i insercija te većinu varijanti alternativnog izrezivanja (110, 111). Prepoznavanje varijanti je slabije u slučaju autosomnih varijanti jer većina takvih bolesnika ima izoliranu hematuriju koja pak može biti posljedica druge bolesti (npr. IgA nefropatija, poststreptokokni glomerulonefritis, C3 nefropatija). Drugi razlozi neprepoznavanja varijanti uključuju slabu pokrivenost ciljnih regija, duboke intronske varijante koje nije moguće prepoznati sekvenciranjem egzona te nedostatan kapacitet uređaja za prepoznavanje određenih varijanti (75, 112).

Udruženost TBMN-a s FSGS-om su prvi opisali Deltas i sur. u istraživanju iz 2007. godine gdje su opisali 116 bolesnika iz 13 obitelji s Cipra sa simptomima od izolirane hematurije do CKD-a. U toj skupini učinjeno je 20 biopsija bubrega kojima je potvrđena FSGS na SM-u i TBMN na EM-u, bez znakova karakterističnih za AS. Provedeno je sekvenciranje *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* gena. U 70 % pacijenata bila je prisutna heterozigotna varijanta u *COL4A3* ili *COL4A4* genu čime je potvrđena dijagnoza TBMN-a udruženog s FSGS-om. Praćenjem 82 bolesnika iz 10 obitelji utvrđeno je da je u 38 % došlo do progresije u CKD, a u 19,5 % u ESRD. Zaključili su da je hematurija jedini znak bolesti do otprilike 3. desetljeća života nakon čega se javlja proteinurija, a nakon 50. godine života uz hipertenziju, javljaju se i znakovi CKD-a s konačnom progresijom u ESRD (49). Autori smatraju da kod bolesnika s COL4 varijantom i nalazom FSGS-a na SM-u i/ili izraženijom kliničkom slikom postoji dodatna, neprepoznata varijanta, genski modifikator ili neki drugi čimbenik koji je uz COL4 varijantu sinergistički odgovoran za razvoj težeg fenotipa (50).

Matthaiou i sur. su u sustavnom pregledu literature o heterozigotnim *COL4A3* i *COL4A4* varijantama, na uzorku 777 bolesnika iz 258 obitelji, pokazali sljedeće: hematurija je bila prisutna u 94,8 % bolesnika, a proteinurija u 46,4 %. U 15,1 % bolesnika srednje dobi 52,8 godina (raspon dobi 21 do 84 godina) došlo je do progresije u ESRD. Gubitak sluha zabilježen je u 15,6 %, a poteškoće vida u 3 % bolesnika. Biopsija bubrega učinjena je u 222 bolesnika, a na 174 biopsija provedena je ultrastrukturalna analiza. FSGS na SM-u je bio prisutan u 39,9 % biopsija. Na EM-u su u 81 % bile prisutne tanke GBM, u 18,4 % promjene karakteristične za AS, a lameliranje GBM-a u 6,9 % (113).

U ovom istraživanju, u uzorku svih uključenih bolesnika (N = 100), hematurija je bila prisutna u 93,9 % bolesnika, a proteinurija 44,4 %. Gubitak sluha je bio prisutan u 9,8 %, a poremećaji vida u 1,1 %. Završni stadij CKD-a doživjelo je 5,7 % bolesnika. Na SM-u je FSGS nađen u 32 % biopsija bubrega, a na EM-u je u 34 % bilo prisutno samo fokalno lameliranje. Kod bolesnika kojima je NGS-om nađena varijanta u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genu, hematurija je bila prisutna u 95,2 % bolesnika, a proteinurija 43,5 %. Gubitak sluha je bio prisutan u 8,6 %, a poremećaja vida nije bilo. Završni stadij CKD-a doživjelo je 6,8 % bolesnika. Na SM-u je FSGS nađen u 37,1 % biopsija bubrega, a na EM-u je u 45,2 % bilo prisutno samo fokalno lameliranje. Iako istraživanja Deltas i sur. te Matthaiou i sur. imaju dodirnih parametara s ovim istraživanjem koje je korisno usporediti, postoje određene razlike koje valja istaći. Obje istraživačke skupine ispitivale su autosomne varijante, dok je u ovom istraživanju polazišna točka bila patohistološka dijagnoza, a sekvenciranjem su, osim autosomnih, nađene i varijante u *COL4A5* genu. U ovom istraživanju uključeno je više patohistoloških parametara, kao i komorbiditeta (pušenje, hipertenzija, prekomjerna tjelesna masa) koji mogu dodatno utjecati na težinu bolesti, a koji nisu uključeni u navedena istraživanja.

6.3. Varijabilnost fenotipa među bolesnicima s *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* varijantom

Jais i sur. te Naito i sur. su u svojim istraživanjima X-vezanih varijanti u *COL4* genima zaključili da varijabilnost fenotipa ovisi o tipu naslijeđene varijante. Zaključili su da delecije, varijante pomaka okvira čitanja i besmislene varijante dovode do gubitka

ekspresije lanaca COL4 i težeg oblika bolesti, a pogrešne i varijante alternativnog izrezivanja do varijabilnog fenotipa (114, 115). U istraživanju Storey-a i sur. od 68 pronađenih patogenih varijanti, 37 % su bile pogrešne, 35 % su bile varijante s pomakom okvira čitanja, 18 % besmislene, 6 % su bila manje delecije ili duplikacije, a 4 % su činile varijante alternativnog izrezivanja. Besmislene mutacije u njihovom uzorku izazivale su ranu pojavu ESRD-a (116). U ovom istraživanju također je najviše bilo pogrešnih (45,2 %), ali je varijanti s pomakom okvira čitanja bilo tek 3,2 %, besmislenih 17,7 %, a varijanti alternativnog izrezivanja 33,9 %. Međutim, nije nađena statistički značajna razlika u težini kliničke slike između bolesnika s različitim tipovima varijanti.

Novija istraživanja pokazuju da bi varijante u ostalim genima koji kodiraju proteine GFB-a mogli imati utjecaj na varijabilnost fenotipa kod heterozigota s istim varijantama COL4A3 ili COL4A4 gena (36, 76-80). Deltas i sur. su opisali dvije varijante gena *NPHS2* (p.Arg229Gin i p.Glu237Gin) koji kodira podocin i jednu gena *NEPH3* koji kodira filtrin, koje predstavljaju povišeni rizik za progresiju u CKD u bolesnika s COL4 varijantama (76, 78, 80). Istraživanja Bullicha i sur. te Fresea i sur. dala su slične rezultate na temelju kojih su zaključili da varijante gena koji kodiraju proteine GFB-a i podocita kod bolesnika s COL4 varijantom doprinose dodatnom oštećenju bubrega, razvoju FSGS-a i ranijoj progresiji bolesti u CKD (89, 90). Nedostatak ovog istraživanja je što je sekvenciranje ciljano za COL4A3, COL4A4 i COL4A5 gene. Korisno bi bilo proširiti panel i uključiti gene koji kodiraju ostale proteine GFB-a kako bi se rasvijetlila genska pozadina bolesnika kojima unatoč dijagnozi TBMN-a sa ili bez FSGS-a sekvenciranjem nije nađena varijanta u COL4A3, COL4A4 i/ili COL4A5 genu.

Osim varijanti u drugim genima povezanim s GFB-om, određeni autori spominju i druge čimbenike (npr. hipertenzija, pušenje, prekomjerna tjelesna masa) koji mogu utjecati na klinički tijek i težinu simptoma kod bolesnika s COL4 varijantama (35). Uspoređujući sve bolesnike prema patohistološkoj dijagnozi, dobivena je statistički značajna razlika u pušenju ($P < 0,001$) i hipertenziji ($P < 0,001$) gdje je u skupini bolesnika s TBMN-om samo 22 % pušača i 21,3 % hipertoničara, a u skupini s FSGS-om i TBMN-om je 61,5 % pušača i 65,4 % hipertoničara. Također, dobivena je statistički značajna razlika u tjelesnoj masi ($P = 0,006$) i BMI-u ($P = 0,007$) između istraživanih skupina gdje bolesnici s TBMN-om prosječno teže 58.43 ± 27.14 kg uz prosječan BMI 21.95 ± 5.77

kg/m², a bolesnici s FSGS-om i TBMN-om prosječno teže 77.25 ± 23.90 kg uz prosječan BMI 26.09 ± 5.81 kg/m². Uspoređujući bolesnike kod kojih su nađene varijante u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genima, prisutna je slična, statistički značajna razlika u pušenju ($P < 0,001$) i hipertenziji ($P = 0,002$) gdje je u skupini bolesnika s TBMN-om 17,1 % pušača i 19,4 % hipertoničara, a u skupini s FSGS-om i TBMN-om je 63,2 % pušača i 63,2 % hipertoničara. Prisutna je i statistički značajna razlika u tjelesnoj masi ($P = 0,039$) i BMI-u ($P = 0,031$) između istraživanih skupina gdje bolesnici s TBMN-om prosječno teže 62.52 ± 27.67 kg uz prosječan BMI 22.71 ± 5.89 kg/m², a bolesnici s FSGS-om i TBMN-om prosječno teže 79.28 ± 21.92 kg uz prosječan BMI 26.72 ± 5.66 kg/m².

Šenjug i sur. te Horaček i sur. opisali su nove varijante *COL4A4* c.193-2A>C i *COL4A3* c.2881+1G>A u hrvatskoj populaciji koje dovode do raznolikih fenotipova (103, 117). Jedan bolesnik, homozigot s *COL4A4* c.193-2A>C varijantom, star dvije godine, imao je hematuriju, proteinuriju i održanu bubrežnu funkciju, a morfološki je na EM imao promjene karakteristične za AS. Od osmero heterozigota za istu varijantu, šest (75 %) je imalo hematuriju, od toga petero (62,5 %) i proteinuriju, a samo jedan (12,5 %) je imao umjereno sniženu bubrežnu funkciju (eGFR 45 ml/min/1,72m²). Od petero ispitanika s biopsijom bubrega, troje je imalo dijagnozu FSGS-a s TBMN-om, a dvoje AS. Ultrastrukturno, u jednoj biopsiji nije bilo lameliranja, u dvije je bilo samo fokalno, a u još dvije izraženo (117). Varijanta *COL4A3* c.2881+1G>A također dovodi do varijabilnih simptoma i kliničkog tijeka. Hematuriju je imalo 97,1 % bolesnika, proteinuriju 55,9%, a 14,7 % je razvilo CKD, započelo bubrežnu nadomjesnu terapiju dijalizom i/ili je podvrgnuto transplantaciji bubrega do medijana dobi 48 godina (raspon dobi 27 do 55 godina). FSGS je bila prisutna u 30,8 % biopsija, izraženo lameliranje GBM-a u 16,7 %, fokalno u 50 %, a u 33,3 % lameliranja nije bilo (103). Ovakva varijabilnost u fenotipu kod bolesnika s identičnom varijantom u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genu vjerojatno je posljedica komorbiditeta i nezdravih navika (pušenje, hipertenzija, dijabetes, pretilost) ili neotkrivene varijante u nekom drugom genu koji kodira proteine GFB-a (55).

6.4. Nove varijante *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena

Sekvenciranjem u ovom istraživanju pronađene su patogene i/ili VUS varijante *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* gena kod 62 bolesnika. Među njima je 45 različitih varijanti, a od toga su 42 nove, do sada neprijavljene u HGMD-u. Visok udio novih varijanti je očekivan, što potkrepljuju i istraživačke skupine čiji su rezultati sekvenciranja pokazali da se u 75 % uzoraka radi o novoj varijanti (110, 111).

Ograničenja ovog istraživanja pretežno su vezana uz genetsku analizu. Dostupnom metodom provedeno je sekvenciranje *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* gena, međutim ne i drugih gena, povezanih s nefrotskim sindromom i genskom FSGS, kao ni genetskih modifikatora koji u sunasljeđu s patogenom varijantom u nekome od *COL4* gena dovode do težeg oblika bolesti. Također, određene varijante u sekvenciranim genima, kao što su duboke intronske varijante koje mogu pridonjeti izraženijem fenotipu, nije moguće prepoznati provedenom NGS metodom.

7. ZAKLJUČCI

1. Bolesnici s FSGS-om i TBMN-om u odnosu na bolesnike samo s TBMN-om imaju statistički značajno lošije kliničke parametre (višu razinu proteinurije, višu razinu serumskog kreatinina, niži eGFR, viši CKD stadij u času postavljanja dijagnoze), češće komorbiditete (pušenje, hipertenzija, pretilost) i jače izražene morfološke promjene (postotak i stupanj IFTA-e, izraženost arteriolosklerotskih promjena). Iako statistički neznajčajno, među bolesnicima s varijantom u *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* genu, patogenih i VUS varijanti nađeno je u većem postotku (71,9 %) u skupini bolesnika s FSGS-om i TBMN-om u odnosu na skupinu s TBMN-om (57,4 %). Nije nađena statistički značajna razlika u patogenosti i tipu varijante između navedenih skupina.
2. Pretragom Registra biopsija bubrega Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju, Kliničke bolnice Dubrava u razdoblju od 2004. do 2018. godine učinjeno je 3973 nativnih biopsija bubrega, od čega je 163 (4,1 %) dijagnoza odgovaralo TBMN-u, a njih 49 je uz to imalo i FSGS. Stoga je prevalencija FSGS-a udruženog s TBMN-om u navedenom registru 1,2 %.
3. Mjerenje debljine GBM-a provedeno je modificiranom metodom po Haasu i prema standardizaciji Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju, Kliničke bolnice Dubrava. Prosječna debljina GBM-a iznosila je $187,17 \pm 31,12$ nm.
4. U ovo istraživanje uključeno je 100 bolesnika iz 97 obitelji, dakle, samo iz tri obitelji uključeno je po dva člana, a iz ostalih samo po jedan. Preostalim članovima obitelji ili nije učinjena biopsija bubrega ili su biopsijom nađene morfološke promjene u vidu izrazitih zadebljanja GBM-a s jasnim lameliranjem. Članovi obitelji bez biopsije bubrega, a koji imaju hematuriju, testirani su NGS metodom za *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* gene te su na temelju rezultata kreirana obiteljska stabla.

5. Provedena analiza za varijante gena *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* u 100 testiranih bolesnika pokazala je da je kod 62 (62 %) nađena patogena varijanta i/ili VUS. Nađeno je 45 različitih varijanti od kojih su 42 novootkrivene tj. nisu prethodno opisane u HGMD-u. Autosomnih varijanti (77,4 %) je više nego X-vezanih (22,6 %). Većina varijanti je patogena (83,87 %), a VUS varijanti je 16,13 %. Prema tipu varijante najviše je pogrešnih (45,2 %), slijede varijante alternativnog prekrajanja (33,9 %), zatim besmislene varijante (17,7 %), a najmanje je varijanti s pomakom okvira čitanja (3,2 %). Nije nađena statistički značajna razlika u patogenosti i tipu varijante između skupine bolesnika s TBMN-om i skupine s FSGS-om i TBMN-om.
6. Usporedbom kliničkih i patohistoloških parametara između skupina bolesnika određenima tipom naslijeđene varijante, nisu nađene statistički značajne razlike niti u jednom istraživanom parametru.

8. KRATKI SADRŽAJ NA HRVATSKOM JEZIKU

Svrha rada: Svrha ovog istraživanja je bila provesti sekvenciranje gena *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* NGS metodom u bolesnika s TBMN-om sa ili bez FSGS-a, a potom analizirati prikupljene genske, kliničke i histološke podatke i provesti genotip-fenotip korelaciju.

Ispitanici i metode: Bolesnici su identificirani pretragom registra bubrežnih biopsija Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava te podijeljeni u dvije skupine: 1. bolesnici s TBMN-om i 2. bolesnici s FSGS-om i TBMN-om. Nakon identifikacije prikupljeni su svi dostupni klinički i patohistološki podaci, provedeno je mjerenje debljine GBM, a bolesnicima je uzet uzorak krvi za NGS. Dobiveni rezultati i prikupljeni podaci su analizirani te je provedena genotip-fenotip korelacija.

Rezultati: Sekvenciranjem je u 52 % bolesnika nađena patogena varijanta, a u 10 % VUS. Bolesnici s FSGS-om i TBMN-om u odnosu na bolesnike samo s TBMN-om imaju statistički značajno izraženije kliničke simptome i znakove, morfološke promjene te komorbiditete. Nije nađena statistički značajna razlika u patogenosti i tipu varijante između skupine bolesnika s FSGS-om i TBMN-om i skupine s TBMN-om.

Zaključak: Bolesnici s FSGS-om i TBMN-om u odnosu na bolesnike samo s TBMN-om imaju izraženije kliničke simptome i morfološke promjene na bioptičkim uzorcima.

9. KRATKI SADRŽAJ NA ENGLESKOM JEZIKU

Characteristics of patients with thin basement membrane nephropathy combined with focal segmental glomerulosclerosis

Matija Horaček (2022)

Objective: The aim of this research was to perform sequencing of the *COL4A3*, *COL4A4* and *COL4A5* genes with NGS in patients with TBMN with or without FSGS, then to analyze the genetic, clinical and pathohistological data and perform genotype-phenotype correlation.

Patients and methods: The patients were identified by searching the kidney biopsy register of the Department of Nephropathology and Electron Microscopy of Dubrava University Hospital and divided into two groups: 1. patients with TBMN and 2. patients with FSGS and TBMN. Patients' clinical and pathohistological data were collected, GBM thickness was measured, and a blood sample was taken for NGS. The results and collected data were analyzed and genotype-phenotype correlation was performed.

Results: Sequencing detected a pathogenic variant in 52 % and VUS in 10 % of patients. Patients with FSGS and TBMN compared to patients with only TBMN have significantly more pronounced clinical symptoms and signs, morphological changes and comorbidities. No statistically significant difference was found in pathogenicity and variant type between the group of patients with FSGS and TBMN and the group with TBMN.

Conclusion: Patients with FSGS and TBMN have more severe clinical course and morphological changes on biopsy samples than patients with only TBMN.

10. POPIS LITERATURE

1. Rheault MN, Gbadegesin RA. The Genetics of Nephrotic Syndrome. *J Pediatr Genet*. 2016;5(1):15-24.
2. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton)*. 2006;11(4):274-81.
3. Holthofer H. Molecular architecture of the glomerular slit diaphragm: lessons learnt for a better understanding of disease pathogenesis. *Nephrol Dial Transplant*. 2007;22(8):2124-8.
4. Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med*. 2003;348(25):2543-56.
5. Kashtan CE, Michael AF. Alport syndrome. *Kidney Int*. 1996;50(5):1445-63.
6. Khoshnoodi J, Pedchenko V, Hudson BG. Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech*. 2008;71(5):357-70.
7. Deltas C, Pierides A, Voskarides K. The role of molecular genetics in diagnosing familial hematuria(s). *Pediatr Nephrol*. 2012;27(8):1221-31.
8. Deltas C, Pierides A, Voskarides K. Molecular genetics of familial hematuric diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(12):2946-60.
9. Casino P, Gozalbo-Rovira R, Rodriguez-Diaz J, Banerjee S, Boutaud A, Rubio V i sur. Structures of collagen IV globular domains: insight into associated pathologies, folding and network assembly. *IUCrJ*. 2018;5(Pt 6):765-79.
10. Lemmink HH, Nillesen WN, Mochizuki T, Schroder CH, Brunner HG, van Oost BA i sur. Benign familial hematuria due to mutation of the type IV collagen alpha4 gene. *J Clin Invest*. 1996;98(5):1114-8.
11. Miner JH. Pathology vs. molecular genetics: (re)defining the spectrum of Alport syndrome. *Kidney Int*. 2014;86(6):1081-3.
12. Haas M. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*. 2009;133(2):224-32.
13. Vizjak A, Ferluga D. Spectrum of Collagen Type Iv Nephropathies: From Thin Basement Membrane Nephropathy to Alport Syndrome. *Srp Ark Celok Lek*. 2008;136:323-6.

14. Alport AC. Hereditary Familial Congenital Haemorrhagic Nephritis. *Br Med J*. 1927;1(3454):504-6.
15. Spear GS, Slusser RJ. Alport's syndrome. Emphasizing electron microscopic studies of the glomerulus. *Am J Pathol*. 1972;69(2):213-24.
16. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC i sur. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science*. 1990;248(4960):1224-7.
17. Papazachariou L, Demosthenous P, Pieri M, Papagregoriou G, Savva I, Stavrou C i sur. Frequency of COL4A3/COL4A4 mutations amongst families segregating glomerular microscopic hematuria and evidence for activation of the unfolded protein response. Focal and segmental glomerulosclerosis is a frequent development during ageing. *PLoS One*. 2014;9(12):e115015.
18. Pierides A, Voskarides K, Athanasiou Y, Ioannou K, Damianou L, Arsali M i sur. Clinico-pathological correlations in 127 patients in 11 large pedigrees, segregating one of three heterozygous mutations in the COL4A3/ COL4A4 genes associated with familial haematuria and significant late progression to proteinuria and chronic kidney disease from focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(9):2721-9.
19. Cosgrove D. Glomerular pathology in Alport syndrome: a molecular perspective. *Pediatr Nephrol*. 2012;27(6):885-90.
20. Gross O, Licht C, Anders HJ, Hoppe B, Beck B, Tonshoff B i sur. Early angiotensin-converting enzyme inhibition in Alport syndrome delays renal failure and improves life expectancy. *Kidney Int*. 2012;81(5):494-501.
21. Kashtan CE. GeneReviews: Alport Syndrome [Internet]. Seattle (WA): University of Washington ; 2001 [ažurirano 21.02.2019; pristupljeno 07.08.2021.]. Dostupno na: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1207/>
22. Chan MM, Gale DP. Isolated microscopic haematuria of glomerular origin: clinical significance and diagnosis in the 21st century. *Clin Med (Lond)*. 2015;15(6):576-80.
23. Flinter F. Alport's syndrome. *J Med Genet*. 1997;34(4):326-30.
24. Savige J, Gregory M, Gross O, Kashtan C, Ding J, Flinter F. Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(3):364-75.

25. Hertz JM. Alport syndrome. Molecular genetic aspects. *Dan Med Bull*. 2009;56(3):105-52.
26. Kashtan CE. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane disease. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(9):1736-50.
27. Yoshikawa N, White RH, Cameron AH. Familial hematuria; clinico-pathological correlations. *Clin Nephrol*. 1982;17(4):172-82.
28. Hinglais N, Grunfeld JP, Bois E. Characteristic ultrastructural lesion of the glomerular basement membrane in progressive hereditary nephritis (Alport's syndrome). *Lab Invest*. 1972;27(5):473-87.
29. Rumpelt HJ. Hereditary nephropathy (Alport syndrome): correlation of clinical data with glomerular basement membrane alterations. *Clin Nephrol*. 1980;13(5):203-7.
30. Tan R, Colville D, Wang YY, Rigby L, Savige J. Alport retinopathy results from "severe" COL4A5 mutations and predicts early renal failure. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(1):34-8.
31. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A i sur. X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(10):2603-10.
32. Dagher H, Buzza M, Colville D, Jones C, Powell H, Fassett R i sur. A comparison of the clinical, histopathologic, and ultrastructural phenotypes in carriers of X-linked and autosomal recessive Alport's syndrome. *Am J Kidney Dis*. 2001;38(6):1217-28.
33. Artuso R, Fallerini C, Dosa L, Scionti F, Clementi M, Garosi G i sur. Advances in Alport syndrome diagnosis using next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(1):50-7.
34. Savige J. Should We Diagnose Autosomal Dominant Alport Syndrome When There Is a Pathogenic Heterozygous COL4A3 or COL4A4 Variant? *Kidney Int Rep*. 2018;3(6):1239-41.
35. Kashtan CE, Ding J, Garosi G, Heidet L, Massella L, Nakanishi K i sur. Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV alpha345: a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group. *Kidney Int*. 2018;93(5):1045-51.

36. Savige J, Ariani F, Mari F, Bruttini M, Renieri A, Gross O i sur. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(7):1175-89.
37. Deltas C. Digenic inheritance and genetic modifiers. *Clin Genet*. 2018;93(3):429-38.
38. Savige J, Rana K, Tonna S, Buzza M, Dagher H, Wang YY. Thin basement membrane nephropathy. *Kidney Int*. 2003;64(4):1169-78.
39. Gregory MC. The clinical features of thin basement membrane nephropathy. *Semin Nephrol*. 2005;25(3):140-5.
40. Foster K, Markowitz GS, D'Agati VD. Pathology of thin basement membrane nephropathy. *Semin Nephrol*. 2005;25(3):149-58.
41. Longo I, Porcedda P, Mari F, Giachino D, Meloni I, Deplano C i sur. COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int*. 2002;61(6):1947-56.
42. Buzza M, Wang YY, Dagher H, Babon JJ, Cotton RG, Powell H i sur. COL4A4 mutation in thin basement membrane disease previously described in Alport syndrome. *Kidney Int*. 2001;60(2):480-3.
43. Ozen S, Ertoyl D, Heidet L, Cohen-Solal L, Ozen H, Besbas N i sur. Benign familial hematuria associated with a novel COL4A4 mutation. *Pediatr Nephrol*. 2001;16(11):874-7.
44. Buzza M, Dagher H, Wang YY, Wilson D, Babon JJ, Cotton RG i sur. Mutations in the COL4A4 gene in thin basement membrane disease. *Kidney Int*. 2003;63(2):447-53.
45. Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M. Novel COL4A4 splice defect and in-frame deletion in a large consanguine family as a genetic link between benign familial haematuria and autosomal Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(6):1122-7.
46. Wang YY, Rana K, Tonna S, Lin T, Sin L, Savige J. COL4A3 mutations and their clinical consequences in thin basement membrane nephropathy (TBMN). *Kidney Int*. 2004;65(3):786-90.
47. Norby SM, Cosio FG. Thin basement membrane nephropathy associated with other glomerular diseases. *Semin Nephrol*. 2005;25(3):176-9.

48. Haas M. Thin glomerular basement membrane nephropathy: incidence in 3471 consecutive renal biopsies examined by electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;130(5):699-706.
49. Voskarides K, Damianou L, Neocleous V, Zouvani I, Christodoulidou S, Hadjiconstantinou V i sur. COL4A3/COL4A4 mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(11):3004-16.
50. Deltas C, Savva I, Voskarides K, Papazachariou L, Pierides A. Carriers of Autosomal Recessive Alport Syndrome with Thin Basement Membrane Nephropathy Presenting as Focal Segmental Glomerulosclerosis in Later Life. *Nephron.* 2015;130(4):271-80.
51. Gast C, Pengelly RJ, Lyon M, Bunyan DJ, Seaby EG, Graham N i sur. Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(6):961-70.
52. Xie J, Wu X, Ren H, Wang W, Wang Z, Pan X i sur. COL4A3 mutations cause focal segmental glomerulosclerosis. *J Mol Cell Biol.* 2015;7(2):184.
53. Malone AF, Phelan PJ, Hall G, Cetincelik U, Homstad A, Alonso AS i sur. Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2014;86(6):1253-9.
54. Hoefele J, Lange-Sperandio B, Ruessmann D, Glockner-Pagel J, Alberer M, Benz MR i sur. Novel heterozygous COL4A3 mutation in a family with late-onset ESRD. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(8):1539-42.
55. Savige J, Ariani F, Mari F, Bruttini M, Renieri A, Gross O i sur. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2019;34(7):1175-89.
56. Sethi S, Glassock RJ, Fervenza FC. Focal segmental glomerulosclerosis: towards a better understanding for the practicing nephrologist. *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30(3):375-84.
57. Churg J, Habib R, White RH. Pathology of the nephrotic syndrome in children: a report for the International Study of Kidney Disease in Children. *Lancet.* 1970;760(1):1299-302.

58. Fogo AB, Kashgarian M. Diagnostic Atlas of Renal Pathology. 3. izd. Philadelphia (PA): Elsevier Inc.; 2017.
59. D'Agati VD. The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2008;17(3):271-81.
60. Howie AJ, Brewer DB. The glomerular tip lesion: a previously undescribed type of segmental glomerular abnormality. *J Pathol*. 1984;142(3):205-20.
61. Stokes MB, Markowitz GS, Lin J, Valeri AM, D'Agati VD. Glomerular tip lesion: a distinct entity within the minimal change disease/focal segmental glomerulosclerosis spectrum. *Kidney Int*. 2004;65(5):1690-702.
62. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Glomerular Diseases Work Group. KDIGO 2021 Clinical Practice Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney Int*. 2021;100(Suppl 4):S1-276.
63. Deegens JK, Dijkman HB, Borm GF, Steenbergen EJ, van den Berg JG, Weening JJ i sur. Podocyte foot process effacement as a diagnostic tool in focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2008;74(12):1568-76.
64. Hommos MS, De Vriese AS, Alexander MP, Sethi S, Vaughan L, Zand L i sur. The Incidence of Primary vs Secondary Focal Segmental Glomerulosclerosis: A Clinicopathologic Study. *Mayo Clin Proc*. 2017;92(12):1772-81.
65. Wiggins RC. The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int*. 2007;71(12):1205-14.
66. McCarthy HJ, Bierzynska A, Wherlock M, Ognjanovic M, Kerecuk L, Hegde S i sur. Simultaneous sequencing of 24 genes associated with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(4):637-48.
67. Brown EJ, Pollak MR, Barua M. Genetic testing for nephrotic syndrome and FSGS in the era of next-generation sequencing. *Kidney Int*. 2014;85(5):1030-8.
68. Gribouval O, Boyer O, Hummel A, Dantal J, Martinez F, Sberro-Soussan R i sur. Identification of genetic causes for sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in adults. *Kidney Int*. 2018;94(5):1013-22.
69. Chatterjee R, Hoffman M, Cliften P, Seshan S, Liapis H, Jain S. Targeted exome sequencing integrated with clinicopathological information reveals novel and rare

mutations in atypical, suspected and unknown cases of Alport syndrome or proteinuria. PLoS One. 2013;8(10):e76360.

70. Sen ES, Dean P, Yarram-Smith L, Bierzynska A, Woodward G, Buxton C i sur. Clinical genetic testing using a custom-designed steroid-resistant nephrotic syndrome gene panel: analysis and recommendations. J Med Genet. 2017;54(12):795-804.

71. Demir E, Caliskan Y. Variations of type IV collagen-encoding genes in patients with histological diagnosis of focal segmental glomerulosclerosis. Pediatr Nephrol. 2020;35(6):927-36.

72. Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M. Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. Nephrol Dial Transplant. 2002;17(7):1218-27.

73. Slajpah M, Gorinsek B, Berginc G, Vizjak A, Ferluga D, Hvala A i sur. Sixteen novel mutations identified in COL4A3, COL4A4, and COL4A5 genes in Slovenian families with Alport syndrome and benign familial hematuria. Kidney Int. 2007;71(12):1287-95.

74. Bekheirnia MR, Reed B, Gregory MC, McFann K, Shamshirsaz AA, Masoumi A i sur. Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome. J Am Soc Nephrol. 2010;21(5):876-83.

75. Daga S, Ding J, Deltas C, Savige J, Lipska-Zietkiewicz BS, Hoefele J i sur. The 2019 and 2021 International Workshops on Alport Syndrome. Eur J Hum Genet. 2022;30(5):507-16.

76. Stefanou C, Pieri M, Savva I, Georgiou G, Pierides A, Voskarides K i sur. Co-Inheritance of Functional Podocin Variants with Heterozygous Collagen IV Mutations Predisposes to Renal Failure. Nephron. 2015;130(3):200-12.

77. Voskarides K, Demosthenous P, Papazachariou L, Arsali M, Athanasiou Y, Zavros M i sur. Epistatic role of the MYH9/APOL1 region on familial hematuria genes. PLoS One. 2013;8(3):e57925.

78. Voskarides K, Arsali M, Athanasiou Y, Elia A, Pierides A, Deltas C. Evidence that NPHS2-R229Q predisposes to proteinuria and renal failure in familial hematuria. Pediatr Nephrol. 2012;27(4):675-9.

79. Tonna S, Wang YY, Wilson D, Rigby L, Tabone T, Cotton R i sur. The R229Q mutation in NPHS2 may predispose to proteinuria in thin-basement-membrane nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 2008;23(12):2201-7.
80. Voskarides K, Stefanou C, Pieri M, Demosthenous P, Felekis K, Arsali M i sur. A functional variant in NEPH3 gene confers high risk of renal failure in primary hematuric glomerulopathies. Evidence for predisposition to microalbuminuria in the general population. *PLoS One*. 2017;12(3):e0174274.
81. Cravedi P, Kopp JB, Remuzzi G. Recent progress in the pathophysiology and treatment of FSGS recurrence. *Am J Transplant*. 2013;13(2):266-74.
82. Sachs N, Sonnenberg A. Cell-matrix adhesion of podocytes in physiology and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(4):200-10.
83. Welsh GI, Saleem MA. The podocyte cytoskeleton-key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011;8(1):14-21.
84. Fidler AL, Vanacore RM, Chetyrkin SV, Pedchenko VK, Bhave G, Yin VP i sur. A unique covalent bond in basement membrane is a primordial innovation for tissue evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(1):331-6.
85. Tsukaguchi H, Sudhakar A, Le TC, Nguyen T, Yao J, Schwimmer JA i sur. NPHS2 mutations in late-onset focal segmental glomerulosclerosis: R229Q is a common disease-associated allele. *J Clin Invest*. 2002;110(11):1659-66.
86. Ozaltin F, Ibsirlioglu T, Taskiran EZ, Baydar DE, Kaymaz F, Buyukcelik M i sur. Disruption of PTPRO causes childhood-onset nephrotic syndrome. *Am J Hum Genet*. 2011;89(1):139-47.
87. Tory K, Menyhard DK, Woerner S, Nevo F, Gribouval O, Kerti A i sur. Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*. 2014;46(3):299-304.
88. Kerti A, Csohany R, Wagner L, Javorszky E, Maka E, Tory K. NPHS2 homozygous p.R229Q variant: potential modifier instead of causal effect in focal segmental glomerulosclerosis. *Pediatr Nephrol*. 2013;28(10):2061-4.
89. Frese J, Kettwig M, Zappel H, Hofer J, Grone HJ, Nagel M i sur. Kidney Injury by Variants in the COL4A5 Gene Aggravated by Polymorphisms in Slit Diaphragm Genes Causes Focal Segmental Glomerulosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(3):519.

90. Bullich G, Trujillano D, Santin S, Ossowski S, Mendizabal S, Fraga G i sur. Targeted next-generation sequencing in steroid-resistant nephrotic syndrome: mutations in multiple glomerular genes may influence disease severity. *Eur J Hum Genet.* 2015;23(9):1192-9.
91. Gross O, Kashtan CE, Rheault MN, Flinter F, Savige J, Miner JH i sur. Advances and unmet needs in genetic, basic and clinical science in Alport syndrome: report from the 2015 International Workshop on Alport Syndrome. *Nephrol Dial Transplant.* 2017;32(6):916-24.
92. Šenjug P, Krištić A, Bauer Šegvić A, Bacalja J, Bulimbašić S, Galešić Ljubanović D. Standardization of measurement and determination of normal glomerular basement membrane thickness at Department of Pathology and Cytology, Dubrava University Hospital, Zagreb. *Virchows Archiv.* 2015;467(Suppl 1):S33-4.
93. Schwartz GJ, Haycock GB, Edelmann CM Jr, Spitzer A. A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine. *Pediatrics.* 1976;58(2):259-63.
94. Schwartz GJ, Feld LG, Langford DJ. A simple estimate of glomerular filtration rate in full-term infants during the first year of life. *J Pediatr.* 1984;104(6):849-54.
95. Levin A, Stevens PE. Summary of KDIGO 2012 CKD Guideline: behind the scenes, need for guidance, and a framework for moving forward. *Kidney Int.* 2014;85(1):49-61.
96. Morita M, White RH, Raafat F, Barnes JM, Standring DM. Glomerular basement membrane thickness in children. A morphometric study. *Pediatr Nephrol.* 1988;2(2):190-5.
97. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J i sur. HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat.* 2016;37(6):564-9.
98. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J i sur. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-24.

99. Abou Tayoun AN, Pesaran T, DiStefano MT, Oza A, Rehm HL, Biesecker LG i sur. Recommendations for interpreting the loss of function PVS1 ACMG/AMP variant criterion. *Hum Mutat.* 2018;39(11):1517-24.
100. Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM i sur. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D980-5.
101. Weber S, Strasser K, Rath S, Kittke A, Beicht S, Alberer M i sur. Identification of 47 novel mutations in patients with Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *Pediatr Nephrol.* 2016;31(6):941-55.
102. Ernst C, Hahnen E, Engel C, Nothnagel M, Weber J, Schmutzler RK i sur. Performance of in silico prediction tools for the classification of rare BRCA1/2 missense variants in clinical diagnostics. *BMC Med Genomics.* 2018;11(1):35.
103. Horacek M, Nikuseva Martic T, Senjug P, Senjug Perica M, Oroz M, Kuzmac S i sur. Clinical and histopathological characteristics of COL4A3 c.2881+1G>A variant causing Alport spectrum disorders in Croatian population. *Biomol Biomed.* 2023;23(1):89-100.
104. Gibson J, Fieldhouse R, Chan MMY, Sadeghi-Alavijeh O, Burnett L, Izzi V i sur. Prevalence Estimates of Predicted Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in a Population Sequencing Database and Their Implications for Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2021;32(9):2273-90.
105. Dische FE, Anderson VE, Keane SJ, Taube D, Bewick M, Parsons V. Incidence of thin membrane nephropathy: morphometric investigation of a population sample. *J Clin Pathol.* 1990;43(6):457-60.
106. Šenjug P, Horaček M, Maksimović B, Vučur K, Horvatić I, Zagorec N i sur. Clinical significance of zero-time renal transplant biopsies and thin glomerular basement membranes in zero-time renal transplant biopsies. *Acta Clin Croat.* 2021;60(Suppl 1):S133-41.
107. Tryggvason K, Patrakka J. Thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(3):813-22.
108. Kashtan CE. Alport Syndrome: Achieving Early Diagnosis and Treatment. *Am J Kidney Dis.* 2021; 77(2):272-9.

109. Kashtan CE, Gross O. Clinical practice recommendations for the diagnosis and management of Alport syndrome in children, adolescents, and young adults-an update for 2020. *Pediatr Nephrol.* 2021;36(3):711-9.
110. Fallerini C, Baldassarri M, Trevisson E, Morbidoni V, La Manna A, Lazzarin R i sur. Alport syndrome: impact of digenic inheritance in patients management. *Clin Genet.* 2017;92(1):34-44.
111. Moriniere V, Dahan K, Hilbert P, Lison M, Lebbah S, Topa A i sur. Improving mutation screening in familial hematuric nephropathies through next generation sequencing. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(12):2740-51.
112. King K, Flinter FA, Nihalani V, Green PM. Unusual deep intronic mutations in the COL4A5 gene cause X linked Alport syndrome. *Hum Genet.* 2002;111(6):548-54.
113. Matthaïou A, Poulli T, Deltas C. Prevalence of clinical, pathological and molecular features of glomerular basement membrane nephropathy caused by COL4A3 or COL4A4 mutations: a systematic review. *Clin Kidney J.* 2020;13(6):1025-36.
114. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, Marchi M, Rizzoni G, Renieri A i sur. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11(4):649-57.
115. Naito I, Kawai S, Nomura S, Sado Y, Osawa G. Relationship between COL4A5 gene mutation and distribution of type IV collagen in male X-linked Alport syndrome. Japanese Alport Network. *Kidney Int.* 1996;50(1):304-11.
116. Storey H, Savige J, Sivakumar V, Abbs S, Flinter FA. COL4A3/COL4A4 mutations and features in individuals with autosomal recessive Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(12):1945-54.
117. Senjug P, Nikuseva Martić T, Senjug Perica M, Oroz M, Horacek M, Gotovac Jercić K i sur. Clinical and pathohistological characteristics of Alport spectrum disorder caused by COL4A4 mutation c.193-2A>C: a case series. *Croat Med J.* 2021;62(3):204-14.

11. ŽIVOTOPIS

Matija Horaček, dr. med. rođen je 28. srpnja 1992. godine u Karlovcu gdje je završio Gimnaziju (opći smjer) 2011. godine. Iste godine upisao je Medicinski fakultet u Zagrebu na kojem je diplomirao 2017. godine s temom „Učestalost i patohistološke osobitosti fokalne segmentalne glomeruloskleroze udružene s nefropatijom tankih glomerularnih bazalnih membrana” pod mentorstvom prof. dr. sc. Danice Galešić Ljubanović. Pripravnički staž je odradio u Specijalističkoj ordinaciji obiteljske medicine dr. Gordane Došen, a potom radio kao liječnik u sanitetu FAS d.o.o.

Od 1. listopada. 2018. godine zaposlen je na Medicinskom fakultetu u Zagrebu na poziciji znanstvenog novaka na HRZZ projektu „Genotip-fenotip korelacija u Alportovom sindromu i nefropatiji tankih glomerularnih bazalnih membrana“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Danice Galešić Ljubanović uz što je upisao poslijediplomski doktorski studij Biomedicina i zdravstvo na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Tijekom izrade disertacije u sklopu projekta aktivno je sudjelovao na nekoliko međunarodnih kongresa, objavio je 1 rad na kojemu je prvi autor te je koautor na još 5 radova, od čega su 4 indeksirana u Current Contents bazi podataka. Bio je tajnik organizacijskog odbora *5th International Renal Pathology Conference*, najvećeg međunarodnog skupa nefropatologa koji je održan na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu od 18. do 20. svibnja 2023. godine.