Obilježja glomerularne bazalne membrane u Alportovom sindromu i nefropatiji tankih bazalnih membrana

Šenjug, Petar

Doctoral thesis / Disertacija

2021

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:268515

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

MEDICINSKI FAKULTET

Petar Šenjug

Obilježja glomerularne bazalne membrane u Alportovom sindromu i nefropatiji tankih bazalnih membrana

DISERTACIJA



Zagreb, 2021.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Petar Šenjug

Obilježja glomerularne bazalne membrane u Alportovom sindromu i nefropatiji tankih bazalnih membrana

DISERTACIJA

Zagreb, 2021.

Disertacija je izrađena na Odjelu za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu

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

Zahvale: Prvenstveno zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Danici Galešić Ljubanović na stručnom vodstvu i pomoći pri izradi ove disertacije. Zahvaljujem doc. dr. sc. Ivici Horvatiću na pomoći oko statističke obrade i prikaza podataka, dr. Matiji Horačeku za pomoć pri prikupljanju podataka i mjerenju debljina glomerularne bazalne membrane te dr. sc. Bojani Maksimović, dr. Kseniji Vučur i dr. Nikoli Zagorcu za pomoć kod prikupljanja kliničkih podataka. Zahvaljujem prof. dr. sc. Krešimiru Galešiću i prof. dr. sc. Mladenu Knoteku na dozvolama za prikupljanje kliničkih podataka na zavodima za nefrologiju KB Dubrava i KB Merkur. Iznimno se zahvaljujem Ivani Mamuči, bacc. med. lab. dg. za provođenje imunohistokemijskog bojenja te Anamariji Bauer Šegvić dipl. ing. mol. biol., Karmeli Šuvak i Mirjani Jurešić za provođenje ostalih tehničkih postupaka vezanih uz istraživanje. Također, zahvaljujem se Ani Perici, dr. dent. med. i Matei Perici, mag. iur za pomoć pri obradi i lekturi teksta. Najveća hvala mojoj supruzi Mariji na neizmjernoj ljubavi, podršci i stručnim savjetima.

SADRŽAJ

1 UVOD 1
1.1 Kolagen tipa IV 1
1.2 Alportov sindrom 3
1.3 Nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana 12
1.4 Spektar Alportovog sindroma 14
1.5 Mjerenje debljine glomerularne bazalne membrane 14
1.6 Imunohistokemijsko / imunofluorescentno bojenje na lance kolagena tipa IV 17
1.7 Nulte biopsije bubrežnog presatka 18
1.8 Bolesnici s nefropatijom tankih glomerularnih bazalnih membrana kao darivatelji bubrežnog presatka 19
1.9 Svrha rada 20
2 HIPOTEZA 21
3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA 22
3.1 Opći cilj 22
3.2 Specifični ciljevi 22
4 ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA 23
4.1 Metodologija mjerenja debljine glomerularne bazalne membrane i određivanje referentnog raspona uredne debljine iste 23
4.2 Ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama nativnih bubrega 27
4.3 Ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama transplantiranih bubrega 30
4.4 Statistička analiza 32
5 REZULTATI 33
5.1 Određivanje referentnog raspona uredne debljine GBM-a 33
5.2 Istraživanje na biopsijama nativnih bubrega 34
5.2.1 Kliničke i patohistološke karakteristike uključenih ispitanika 34
5.2.2 Usporedba kategorija patohistoloških dijagnoza 39
5.2.3 Imunohistokemijsko bojenje na α3, α4 i α5 lance kolagena tipa IV 51
5.3 Ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama transplantiranih bubrega 55
6 RASPRAVA 64
6.1 Određivanje referentnog raspona uredne debljine GBM 64
6.2 Ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama nativnih bubrega 64
6.3 Ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama transplantiranih bubrega 69
7 ZAKLJUČCI 73

8 SAŽETAK 75
9 SUMMARY 76
10 LITERATURA 77
11 ŽIVOTOPIS 88

POPIS OZNAKA I KRATICA

APH – asimptomatska proteinurija i/ili eritrociturija

AS – Alportov sindrom

AUROC – analiza površine ispod krivulje odnosa specifičnosti i osjetljivosti klasifikatora (eng. *area under the receiver operating characteristic curve*)

BM – bazalna membrana

C – medijan

CI – interval pouzdanosti

COL4A1 – α1 lanac kolagena IV

COL4A2 – α2 lanac kolagena IV

COL4A3 – α3 lanac kolagena IV

COL4A4 – α4 lanac kolagena IV

COL4A5 – α5 lanac kolagena IV

DM – šećerna bolest (lat. *diabetes mellitus*)

dU – dnevni urin

eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije po CKD-EPI formuli (eng. estimated glomerular filtration rate*)*

EM – elektronska mikroskopija

ESKD – završni stadij zatajenja bubrega (eng. end stage kidney disease)

FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza

GBM – glomerularna bazalna membrana

GBM-max – maksimalna vrijednost debljine glomerularne bazalne membrane

GBM-min – minimalna vrijednost debljine glomerularne bazalne membrane

GBM-SD – standardna devijacija debljine glomerularnih bazalnih membrana

GBM- $\bar{x}$ – srednja vrijednost debljine glomerularne bazalne membrane

Gly – aminokiselina glicin

IFTA – intersticijska fibroza i tubularna atrofija

IKR – interkvartilni raspon (25.-75. percentila)

KB – klinička bolnica

KBB – kronična bubrežna bolest

KNS – kronični nefritički sindrom

N – broj bolesnika

NCI – karboksiterminalna nekolagena domena

NGS – metoda sekvenciranja druge generacije (eng. next generation sequencing)

NS – nefrotski sindrom

PAS – histokemijsko bojenje perjodnom kiselinom i Schiff-ovim reagensom

PCR – protein / kreatinin omjer (eng. protein creatinine ratio)

PHD – patohistološka dijagnoza

SD – standardna devijacija

SPKT – istovremena (simultana) transplantacija gušterače i bubrega (eng. simultaneous pancreas-kidney transplantation)

TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana (eng. thin basement membrane nephropathy)

TBS – tris puferirana fiziološka otopina

TKM – trikromno histokemijsko bojenje po Masson-u

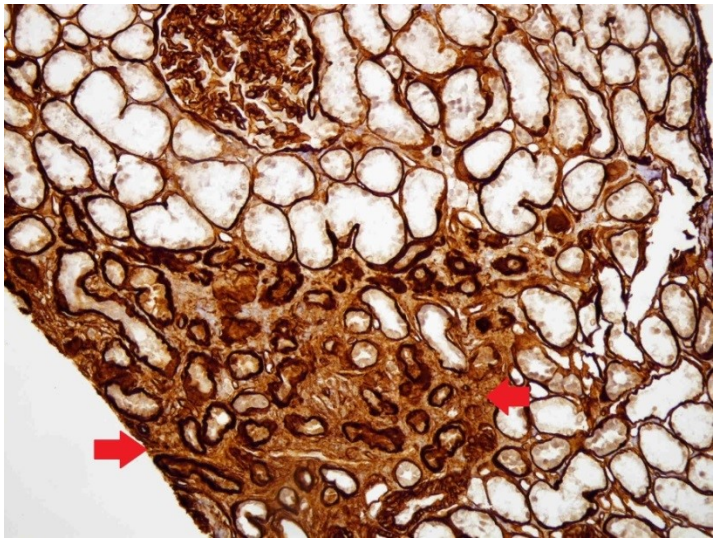
SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

$\bar{x}$ – srednja vrijednost

1 UVOD

1.1 Kolagen tipa IV

Bazalne membrane (BM) su složene strukture sastavljene od nekoliko glavnih i sporednih sastojaka. Kolagen tipa IV je ubikvitarni protein u BM-u i čini njihovu glavnu kolagenu komponentu. Molekule kolagena tipa IV, koje izlučuju endotelne i epitelne stanice, udružuju se u poligonalne mreže koje se povezuju s lamininskim mrežama te entaktinom, proteoglikanom heparan-sulfatom i drugim glikoproteinima koji formiraju BM-u. Kolagen tipa IV olakšava pričvršćivanje stanica na BM-u pomoću interakcija s α1β1 i α2β1 integrinskim receptorima.[1] Istraživanja su pokazala da bi α3β1 mogao biti glavni receptor uključen u vezanje glomerularnih epitelnih stanica na α3 izoformu kolagena tipa IV koji je osobito izražen u glomerularnim bazalnim membranama (GBM).[2] Iako kolagena tipa IV normalno nema u intersticijskim područjima bubrega, njegova ektopična ekspresija uobičajena je karakteristika intersticijske fibroze (slika 1).[3]

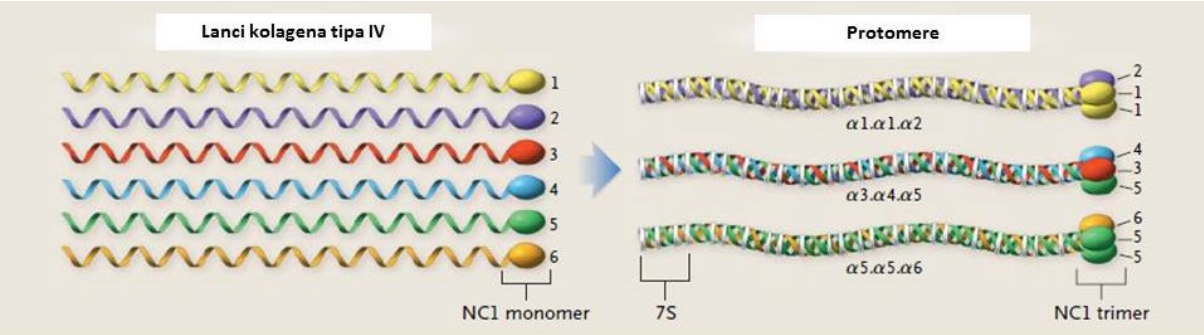


Slika 1. Ekspresija α1 lanaca kolagena tipa IV u području intersticijske fibroze i tubularne atrofije tkiva bubrega (strelice). Imunohistokemijsko bojenje na COL4A1, originalno povećanje 200 x.

Svaka molekula kolagena tipa IV je trimer koji se sastoji od tri α lanca. Pronađeno je šest genski različitih lanaca kolagena tipa IV te su klonirani i sekvencirani geni koji kodiraju te lance. Iako je niz aminokiselina svakog lanca jedinstven, lanci dijele

osnovne strukturne značajke i pokazuju opsežnu homologiju sekvenci. Glavne strukturne značajke lanaca kolagena tipa IV uključuju (slika 2):

1. veliku kolagenu domenu od oko 1400 ostataka koja sadrži ponavljajuće triplete sekvenci glicin (Gly)-X-Y, gdje X i Y predstavljaju razne druge aminokiseline,
2. karboksiterminalnu nekolagenu domenu od oko 230 ostataka,
3. nekolagenu aminoterminalnu sekvencu od 15 do 20 ostataka.[4]

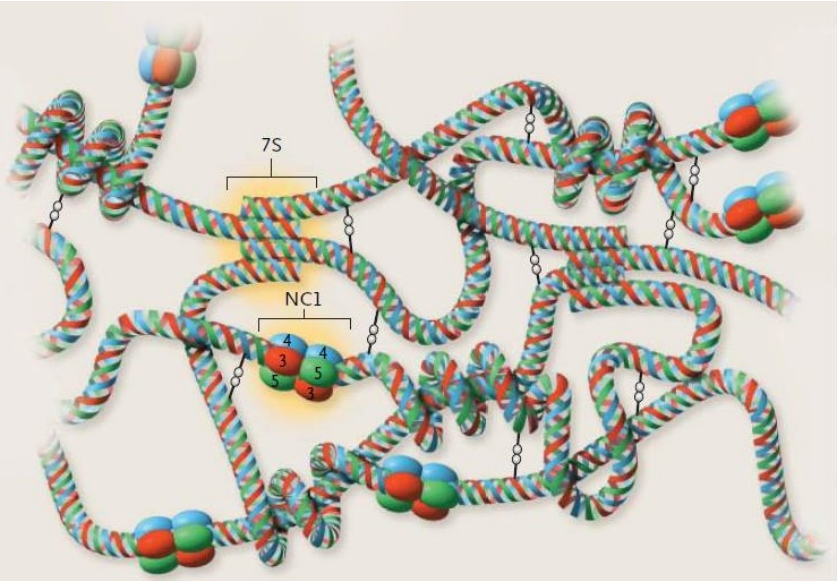


Slika 2. Struktura kolageni tipa IV (preuzeto i prilagođeno iz Hudson BG i sur., N Engl J Med 2003;348:2543).[5]

Mnogobrojni prekidi (oko 20) kolagenih triplet sekvenci prisutni su u glavnoj kolagenskoj domeni, dok svaka nekolagenska karboksiterminalna domena sadrži 12 potpuno očuvanih cisteinskih ostataka koji sudjeluju u unutarlančanim i međulančanim disulfidnim vezama.[3]

Lanci kolagena tipa IV formiraju trimere pomoću veza između njihovih karboksi terminalnih nekolagenih (NCI) domena, nakon čega slijedi uvijanje kolagenih domena u trostruke spirale. Promjenjivi ostaci u NCI domenama mogu posredovati specifičnost asocijacije lanaca, kao što su α1/α2 ili α3/α4 interakcije. Trostruke zavojnice kolagena tipa IV tvore mreže kroz nekoliko vrsta intermolekularnih interakcija koje uključuju: krajnje veze između karboksiterminalnih domena dviju trostrukih zavojnica kolagena tipa IV, kovalentne interakcije između četiri trostruke zavojnice na njihovim aminoterminalnim krajevima i bočne veze između trostrukih zavojnica preko vezanja karboksterminalnih domena na mjesta duž kolagene regije trostrukih zavojnica.[6,7] Disulfidne veze između cisteinskih ostataka ključne su za interakcije između NCI

domena. Opisane različite veze (slika 3) između molekula kolagena tipa IV čine sklop koji služi kao osnova za odlaganje drugih glikoproteina matriksa te za vezanje stanica.[3,8-10]



Slika 3. Intermolekularne interakcije kolagena tipa IV (preuzeto i prilagođeno iz Hudson BG i sur., N Engl J Med 2003;348:2543).[5]

1.2 Alportov sindrom

Alportov sindrom (AS) je genski heterogen, strukturni poremećaj GBM-a. Gensku pozadinu poremećaja čine mutacije gena koji kodiraju izoforme kolagena tipa IV.[11,12] Kao što je prethodno opisano, poput svih drugih podtipova kolagena, kolagen tipa IV je trimer koji nastaje kombinacijom tri od mogućih šest alfa lanaca (α1 - α6). Geni *COL4A1* i *COL4A2* nalaze se na trinaestom kromosomu 13q34, geni *COL4A3* i *COL4A4* na drugom kromosomu 2q36-q37, a geni *COL4A5* i *COL4A6* na X kromosomu Xq22-23. Svih šest gena kodirano je s približno 50 egzona i 1600 aminokiselina, te sadrže aminoterminalnu domenu, NCl te veliku kolagensku domenu koja, između ostalih elemenata, sadrži i karakteristične ponavljajuće sljedove Gly-X-Y koji su prisutni i u centralnom dijelu kolagenske domene.[5] Iako postoji veliki broj mogućih kombinacija sa šest navedenih lanaca, samo tri kombinacije su prisutne u BM-u: α1α1α2, α3α4α5, α5α5α6.

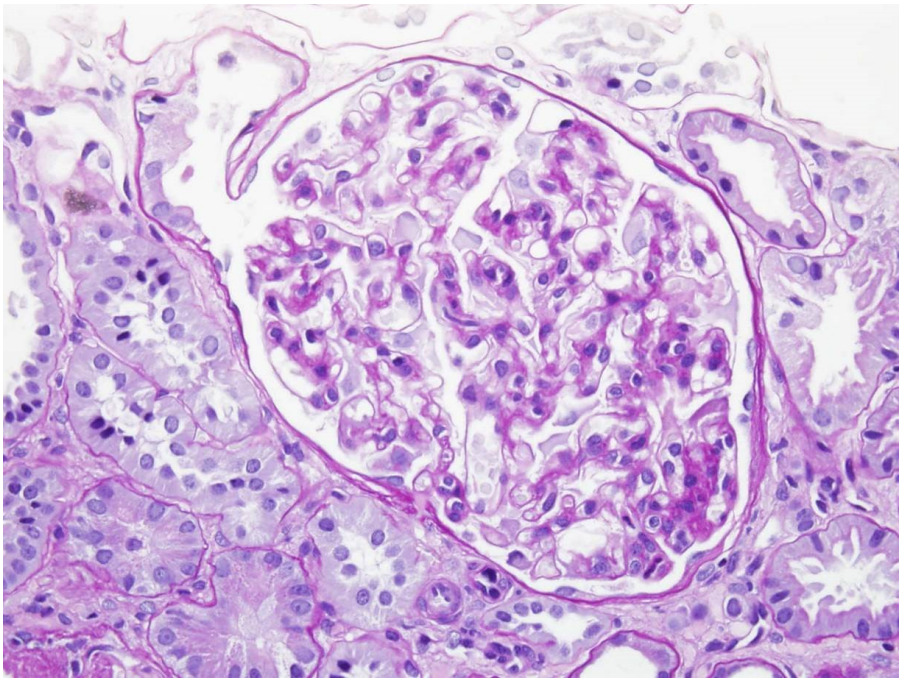
AS je prvi opisao Arthur Cecil Alport 1927. godine.[13] Devedesetih godina prošlog stoljeća dokazano je da AS nastaje kao posljedica defekta lanaca α3α4α5 kolagena tipa IV.[5]

Klinički se AS prezentira kao progresivna nasljedna nefropatija koju karakterizira progresivni hematurički nefritis uz ultrastrukturne promjene GBM-a (nepravilna stanjenja, zadebljanja i cjepkanja), gubitak sluha za tonove visokih frekvencija i oftalmološke probleme (prednji lentikonus, makularne pjege, kornealne endotelne vezikule, rekurentne kornealne erozije i katarakte).[3,13,14] Bolesnici s AS-om čine 1-2 % svih bolesnika na bubrežnoj nadomjesnoj terapiji.[15] Incidencija AS-a u Finskoj iznosi 1:53 000[16], a u južnoj Švedskoj 1:17 000.[17] Prevalencija AS-a se u zapadnim dijelovima Sjedinjenih Američkih Država procjenjuje na 1:5 000.[18]

Struktura kolagena u GBM-u bolesnika s AS-om je nepravilna kao posljedica mutacija u genima *COL4A5* ili *COL4A3* odnosno *COL4A4*.[19,20] U 85 % slučajeva genska osnova AS-a je mutacija X vezanog gena *COL4A5* smještenog na Xq22 regiji, koji kodira α5 lance kolagena tipa IV.[21] U ovom podtipu, muški spol ima težu kliničku sliku u odnosu na ženski spol. Muškarci s X-vezanim AS-om koji razviju završni stadij zatajenja bubrega (ESKD) prije dobi od 30 godina uglavnom imaju pridruženu većinu izvanbubrežnih manifestacija bolesti,[22,23] dok oni s kasnijim razvojem ESKD-a imaju pridružen samo gubitak sluha.[24] Gubitak sluha za spektar visokofrekventnih tonova javlja se u 70 %, a lentikonus u 30 % oboljelih muškaraca do četvrtog desetljeća života kada su zatajenje bubrega, gubitak sluha i retinopatija već zajedno prisutni.[24] Gotovo sve bolesnice (95 %) s X-vezanim AS-om imaju hematuriju te većina naposljetku razvije i ostale kliničke karakteristike bolesti: proteinuriju (75 %),[25] ESKD (8 – 30 %), gubitak sluha (40 %) i/ili retinopatiju (40 %).[23,24,26] Samo 15 % svih AS-a su posljedica autosomne mutacije gena koji kodiraju α3 i/ili α4 lance kolagena tipa IV (*COL4A3* i/ili *COL4A4*), koji se najčešće nasljeđuju recesivno[11,20,27]. U literaturi su opisani i daleko rjeđi slučajevi autosomno dominantnog nasljeđivanja, iako je taj termin u literaturi još uvijek predmet prijepora.[28-32] Kliničke karakteristike bolesnika s autosomno recesivnim AS-om su iste kao kod muških članova obitelji s X-vezanim tipom bolesti.[24] Na autosomno recesivni tip nasljeđivanja sumnjamo ukoliko je bolest sporadična te se pojavljuje u jednoj generaciji, ili u srodnim obiteljima, gdje su muški i ženski članovi obitelji zahvaćeni jednakom učestalošću i težinom kliničke slike, ukoliko otac djeteta s

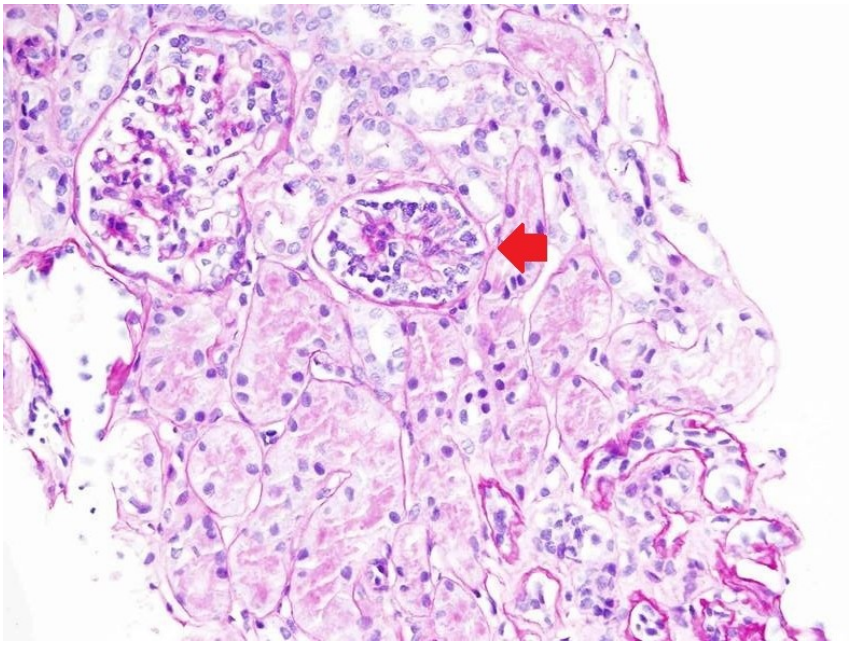
AS-om također ima hematuriju, ili ukoliko ženski član obitelji ima zatajenje bubrega, gubitak sluha ili poremećaje vida.[24,33] U slučajevima autosomno dominantnog AS-a, u literaturi je opisano da težina bubrežne bolesti i kod muških i ženskih članova obitelji može varirati od izolirane hematurije do ESKD-a, a u nekim slučajevima prisutan je i gubitak sluha.[28-30,34,35]

Ne postoje patognomonične promjene na svjetlosnoj mikroskopiji za AS. U ranijim fazama bolesti glomeruli najčešće imaju urednu morfologiju, kao što je prikazano na slici 4.



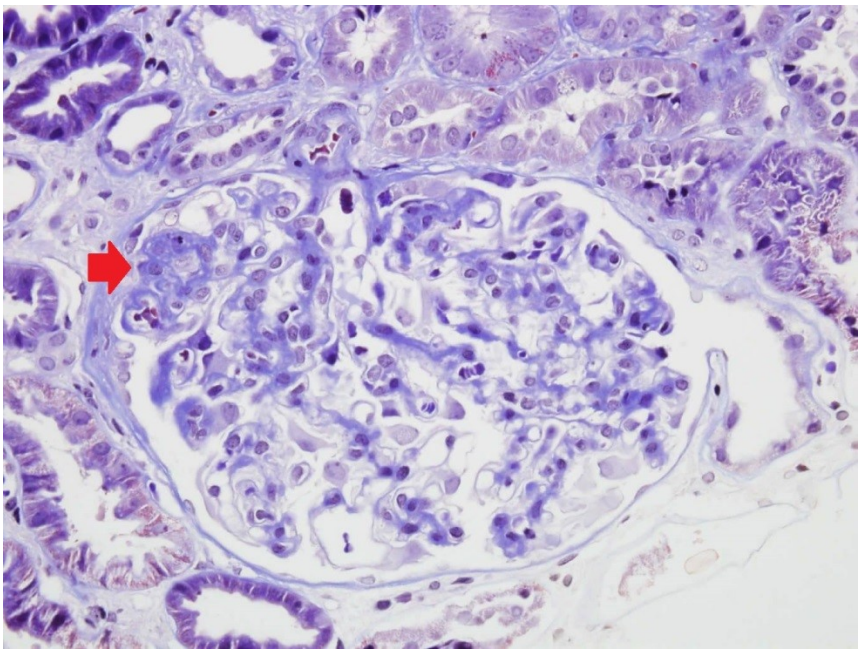
Slika 4. Glomerul uredne morfologije u bolesnika s AS-om. PAS, originalno povećanje 400 x.

Opisan je povećani udio fetalnih (nezrelih) glomerula u biopsijama bubrega djece s AS-om (Slika 5).[36,37]

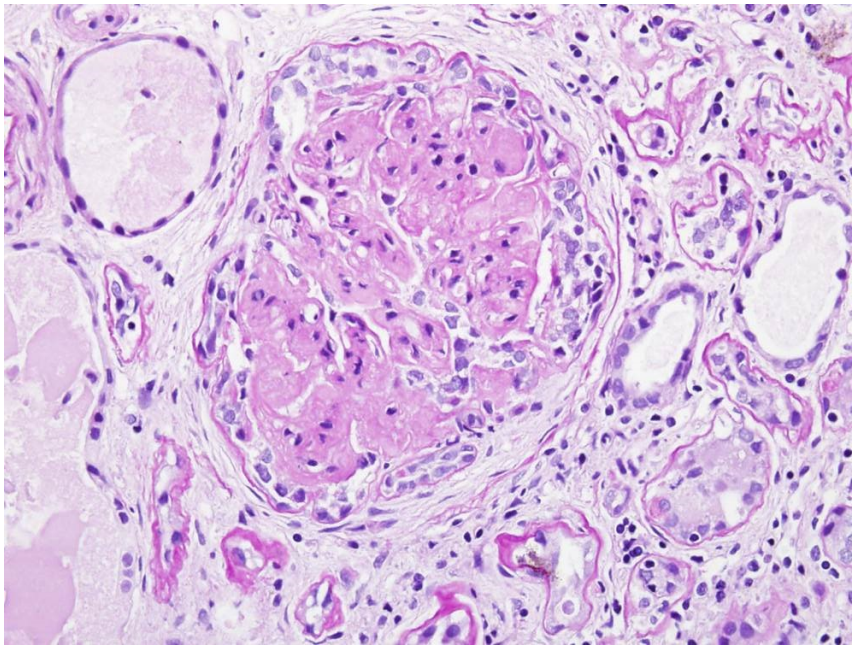


Slika 5. Glomerul nezrele morfologije (strelica) u bolesnika s AS-om. PAS, originalno povećanje 200 x.

Često su prisutne diskretne promjene glomerula koje uključuju blago fokalno proširenje mezangija (na račun povećane količine mezangijskog matriksa ili povećanog broja mezangijskih stanica). Kako bolest napreduje, pojavljuju se fokalne segmentalne (slika 6) ili globalne glomeruloskleroze (slika 7).

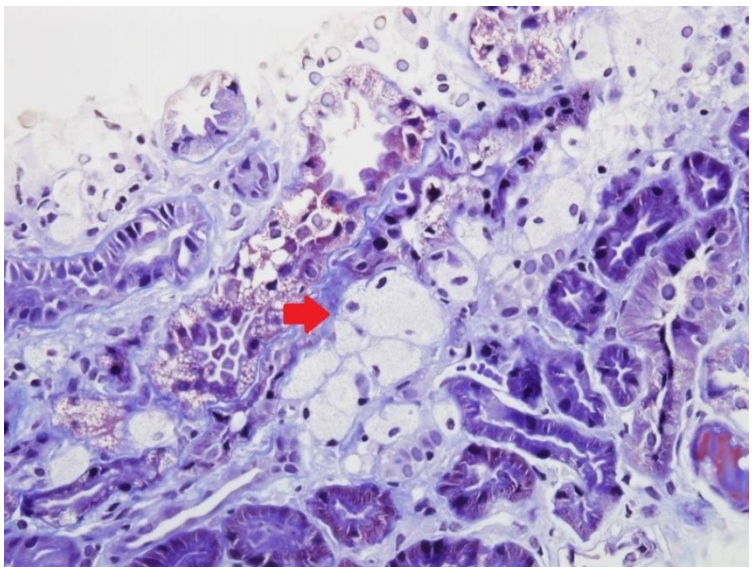


Slika 6. Segmentalna perihilarna skleroza glomerula u bolesnika s AS-om (crvena strelica). TKM, originalno povećanje 400 x.



Slika 7. Globalna glomeruloskleroza u bolesnika s AS-om. PAS, originalno povećanje 400 x.

Često se, čak i u ranijim fazama bolesti, mogu vidjeti eritrocitni cilindri u lumenima tubula. Relativno čest svjetlosno - mikroskopski nalaz u AS-u je prisutnost pjenušavih stanica u intersticiju bubrega (slika 8).

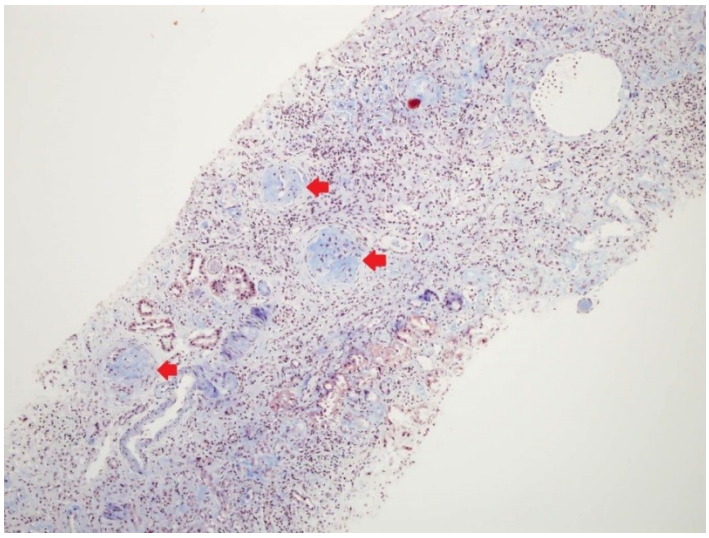


Slika 8. Pjenušave stanice (strelica) u intersticiju bubrega u bolesnika s AS-om. TKM, originalno povećanje 400 x.

Pjenušave stanice se najčešće nalaze u uzorcima biopsija bubrega starije djece i odraslih kod kojih su pronađene i kronične promjene, kao što su skleroza glomerula, atrofija tubula i intersticijska fibroza.[38-40] Pjenušave stanice nisu specifične za AS jer

se mogu naći i u drugim glomerularnim bolestima koje karakterizira dugotrajna proteinurija.[41]

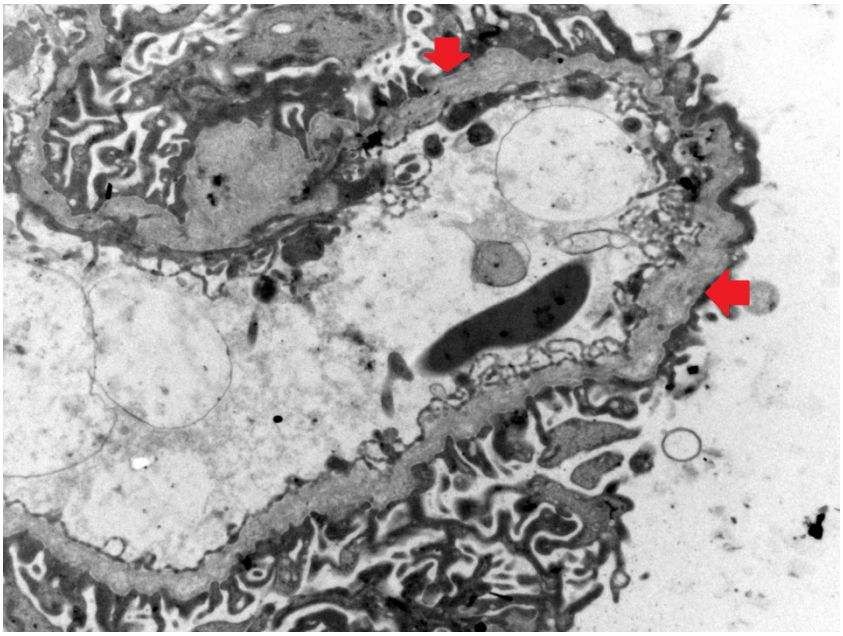
U kasnijim fazama bolesti, uz pojavu fokalne segmentalne i globalne glomeruloskleroze, posljedično se razvijaju intersticijska fibroza i tubularna atrofija (slika 7) te nespecifična arterioloskleroza.



Slika 9. Intersticijska fibroza i tubularna atrofija te potpuno vezivno promijenjeni glomeruli (strelice) u bolesnika s uznapredovalim AS-om. TKM, originalno povećanje 100 x.

U rutinskoj imunofluorescentnoj analizi glomeruli su tipično negativni za komponente komplementa i imunoglobuline. Ponekad su glomeruli nepravilno i uglavnom slabo do 1+ pozitivni za IgM i / ili C3 komponentu komplementa, naročito u područjima skleroze.

Glavna ultrastrukturna (elektronsko mikroskopska - EM) karakteristika X-vezanog AS-a je izmjena stanjenih i zadebljanih područja GBM-a, fragmentacija i lameliranje iste (slika 10), pojava sitnih granula unutar GBM-a te nepravilne vanjske kontura GBM-a.[3,40-44]



Slika 10. Promjene GBM-a karakteristične za AS. Stanjenja i zadebljanja GBM te lameliranje (strelice). Elektronska mikroskopija, originalno povećanje 8 000 x.

U autosomnim oblicima AS-a blage ultrastrukturne promjene u vidu stanjene GBM-a mogu nalikovati stanjenoj GBM prisutnoj u nefropatiji tankih glomerularnih bazalnih membrana (TBMN) ili kod heterozigotnih nositelja X-vezanog AS-a.[45]

U posljednja dva desetljeća u centru istraživanja AS-a, ali i TBMN-a, je genotip-fenotip korelacija. Postoje studije koje su opisale cijeli spektar kliničkih fenotipa mutacija gena *COL4A5* (studije genotip-fenotip korelacije za X-vezani AS). Navedene studije potvrdile su položaj i tip svake pojedine mutacije te opisali kako ta mutacija određuje kliničke karakteristike bolesti (težinu bolesti i brzinu progresije u ESKD).[22,25,46-48] Gross i suradnici su predložili klasifikaciju fenotipa bolesnika s X-vezanim AS-om u tri tipa: tip S (teški), tip MS (umjereni-teški) i tip M (umjereni).[46] Karakteristike tipa S (teškog tipa) su: razvijanje ESRD-a u juvenilnoj dobi (oko 20. godine starosti), prevalencija gubitka sluha od 80 % i abnormalnosti očiju od 40 %. Takva klasična slika je uzrokovana mutacijama gena kao što su: velike pregradnje, prerano zaustavljanje, pomak okvira čitanja, izrezivanje donorskog mjesta (eng. *donor splice site*) i mutacije u NCI domeni. U tip MS ili umjereno-teški tip spadaju bolesnici koji razviju ESRD-e oko 26. godine starosti, a imaju i nešto nižu učestalost izvanbubrežnih znakova bolesti. Kod ovog tipa u podlozi su neglicinske mutacije krivog smisla (eng. *missense mutations*), supstitucije glicina u egzonima 21 - 47, mutacije

unutar okvira čitanja i akceptorske mutacije gena unutar mjesta alternativnog izrezivanja. Tip M ili umjereni tip bolesti je povezan sa zamjenama glicina u eksonima 1-20, a karakteristike su: kasno pojavljivanje ESRD-a (poslije 30. godine života), gubitak sluha u 70 % bolesnika i lezije oka u manje od 30 % bolesnika. Bekherirnia i suradnici su na temelju istraživanja na kohorti američkih bolesnika sa X-vezanim AS-om podržali prijedlog Grossa i suradnika te zaključili da su najteži fenotipovi uzrokovani besmislenim mutacijama (eng. *nonsense mutations*) koje skraćuju protein, velikim i malim delecijama i mutacijama u mjestu alternativnog izrezivanja.[46,48] Martin i suradnici su prvi prikazali *COL4A5* G624D mutaciju u jednoj obitelji. Ova mutacija je zapravo supstitucija glicina s aspartatom na poziciji 624, a osobe s tom mutacijom imaju samo blagi hematurični fenotip.[49] Kasnije su Baker i suradnici prikazali istu mutaciju u drugoj obitelji, a Šlajpah i suradnici su također prikazali 13 bolesnika iz šest obitelji s tom mutacijom.[19,47] U slovenskoj studiji jednoj obitelji je dijagnosticiran AS sa adultnom pojavnošću na temelju EM nalaza, a u pet obitelji je postavljena dijagnoza benigne obiteljske hematurije sve dok molekularno-genetička analiza nije odredila dijagnozu.[47] Slično iskustvo s dvije obitelji koje su bile nosioci iste mutacije (G624D) prikazali su Demosthenous i suradnici.[50] Zanimljivo je da postoje i druge opisane mutacije koje su povezane s blažim oblikom bolesti.[50,51] Deltas i suradnici su, u preglednom radu o ulozi molekularne genetike u postupku dijagnosticiranja obiteljskih hematurija, pretpostavili da postoji više sličnih obitelji diljem svijeta koje nisu identificirane, upravo zbog toga što se za muškarce s mikrohematurijom ne posumnja da bi njihova bolest mogla biti posljedica X-vezane mutacije *COL4A5* i u skladu s time nisu adekvatno obrađeni.[52] Međutim, postoje i genotip-fenotip studije koje pokazuju teži tijek bolesti. Becknell i suradnici su na jednoj velikoj američkoj obitelji s F222C *COL4A5* mutacijom pokazali primjer bolesti gdje se kod muških bolesnika terminalno zatajenje bubrega pojavilo u dobi od 10 do 22 godine.[53] Zaključak je da velike delecije i reorganizacije gena, besmislene mutacije i mutacije krivog smisla prema karboksilnom kraju kolagenih lanaca za posljedicu imaju teži klinički tijek bolesti. Isto tako, neke zamjene aminokiselina (Arg, Glu, Asp) sa Gly-om u Gly-X-Y ponavljajućoj kolagenoj regiji su štetnije od drugih.[54]

Kao što je ranije spomenuto, na autosomno recesivno nasljeđivanje AS-a se pomišlja kod bolesnika sa sporadičnom bolesti koja se pojavljuje u jednoj generaciji ili

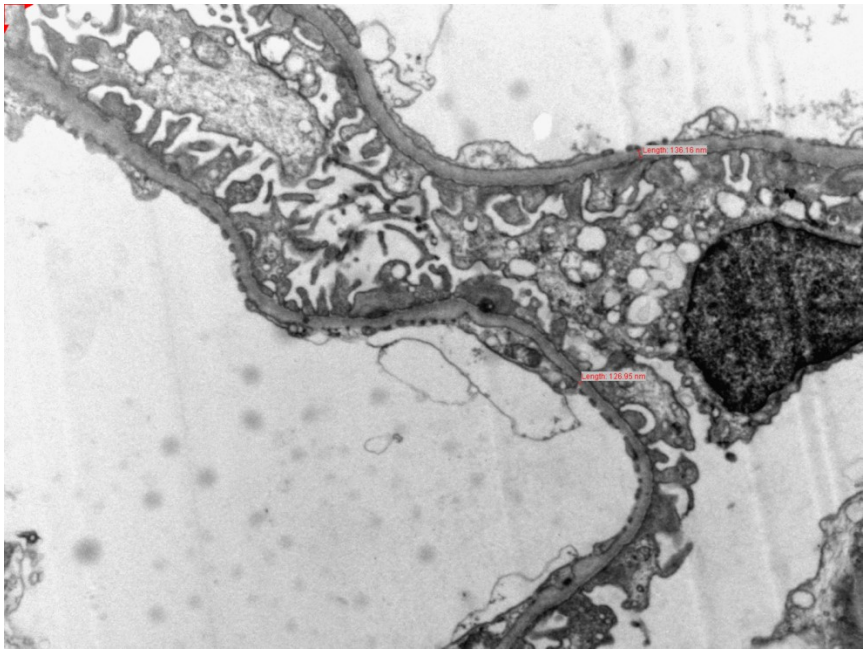
kod konsagviniteta u obitelji, kod obitelji u kojima su muškarci i žene zahvaćeni s jednakom učestalošću i težinom bolesti, kod obitelji gdje otac djeteta s AS-om također ima hematuriju ili gdje ženska osoba ima zatajenje bubrega, oštećenje sluha ili anomalije očiju. Opisano je manje mutacija koje uzrokuju autosomno recesivni AS od onih koje uzrokuju X-vezani AS. Također, u usporedbi sa X-vezanim AS-om, puno se manje zna o genotip-fenotip korelaciji u ovih bolesnika.[24,55]

Glede autosomno dominantnog nasljeđivanja AS-a, u literaturi se navodi da je ono vrlo rijetko i nastaje kao posljedica mutacije *COL4A3* ili *COL4A4*.[28-30,34,35] Savige i suradnici[24] navode da je prihvatljivije, ukoliko je identificirana samo jedna mutacija, pretpostaviti da postoji i druga mutacija, ali da nije detektirana, što odgovara autosomno recesivnom načinu nasljeđivanja, nego da se identificiranje samo jedne mutacije shvati kao iznimno rijetko autosomno dominantno nasljeđivanje. Međutim, Fallerini i suradnici[56], temeljem vlastitog rada metodom sekvenciranja druge generacije (eng. *next generation sequencing - NGS*) došli su do zaključka da se autosomno dominantni tip nasljeđivanja treba ozbiljno razmotriti ukoliko se radi o pojedincima iz obitelji u kojoj je svaka generacija zahvaćena bolešću. Moriniere i suradnici[57] su zamijetili u vlastitom istraživanju moguć autosomno dominantni obrazac nasljeđivanja u 18,9 % slučajeva na kohorti obitelji, potvrđujući tvrdnje Fallerinija i suradnika[56] da autosomno dominantno nasljeđivanje u AS-u ima značajan udio u slučajevima obiteljske zahvaćenosti. Nomenklatura pojedinaca koji su nosioci *COL4A3* ili *COL4A4* mutacije kao i autosomnih gena nije razriješena te je predmet rasprave stručnjaka. U nekoliko istraživanja uočena je korelacija TBMN-a s heterozigotnim *COL4A3* ili *COL4A4* mutacijama i benignom obiteljskom hematurijom.[12,34,58-67] Rezultati istraživanja su pokazali da nisu svi slučajevi heterozigotnih nosioca *COL4A3* ili *COL4A4* mutacija imali benigni tijek bolesti, već su pojedinci imali progresivni tijek s hematurijom, hipertenzijom i ESKD-om.[34,68-75] Rezultati tih istraživanja su pokazali da će se kod određenog broja bolesnika razviti proteinurija i fokalna segmentalna glomeruloskleroza (FSGS) s progresijom u ESKD.[76-81] Takvi rezultati dovode u pitanje naziv autosomno dominantnog AS-a. Dio stručnjaka odbacuje termin autosomno dominantnog AS-a i zalažu se za upotrebu TBMN-a kao valjanog termina.[31,82] Argumenti za korištenje TBMN-a kao valjanog termina su: 1. činjenica da većina bolesnika iz te skupine nema gubitak sluha,

oftalmološke promjene ili lameliranje GBM-a; 2. vjerojatnost progresije u ESKD je niska; 3. postavljanje dijagnoze AS-a vjerojatno bi imalo nepotreban negativan psihološki utjecaj na bolesnika zbog svih komplikacija koje se opisuju uz AS, a u većine ovih bolesnika će bubrežna funkcija ostati normalna.[24,82,83] Druga grupa stručnjaka zagovara klasificiranje heterozigotnih *COL4A3* ili *COL4A4* mutacija kao autosomni AS s ciljem redefiniranja termina TBMN-a, smatrajući kako je prisutnost tankih membrana samo patološka promjena prisutna kod nekih bolesnika sa X-vezanim AS-om, autosomno recesivnim AS-om i heterozigotnim *COL4A3* ili *COL4A4* mutacijama.[32] Savige i suradnici su u svojim smjernicama odbacili termin autosomno dominantnog AS-a te se priklonili terminu TBMN-a, iako prepoznaju nedostatke ovakve terminologije.[82]

1.3 Nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana

TBMN je najčešći uzrok perzistentne hematurije u djece i odraslih, a zajedno s AS-om i IgA nefropatijom čini većinu svih uzroka perzistentne hematurije.[84-86] Iako se TBMN doima kao jednostavan entitet, u literaturi postoje nedosljednosti glede imenovanja poremećaja, opisivanih kliničkih karakteristika, etiologije i ishoda. Obično TBMN predstavlja nositelje za autosomno recesivni AS. Glavna karakteristika TBMN-a je perzistentna mikroskopska hematurija[68,84,87-89] s povremeno pridruženom proteinurijom.[86,90-93] Najčešći nalaz na svjetlosnoj mikroskopiji je normalni izgled glomerularna. Na EM-u je vidljiva difuzno tanka GBM (Slika 11).[94]



Slika 11. Tanka GBM. Elektronska mikroskopija, originalno povećanje 8 000 x.

Svjetska zdravstvena organizacija (SZO) preporučuje graničnu vrijednost za TBMN od 250 nm za odrasle i 180 nm za djecu do 11. godine života neovisno o spolu.[95] Mogućnost superpozicije drugih poremećaja na TBMN također pridonosi kompleksnosti u diferencijalnoj dijagnozi između ranog AS-a i TBMN-a.[72] Ovakav scenarij je, naravno, očekivan jer je prevalencija TBMN-a u općoj populaciji 1 %.

Lemmink i suradnici su prvi opisali *COL4A4* mutaciju u bolesnika s TBMN-om.[12] Nakon njihovog istraživanja, uslijedio je cijeli niz istraživanja koja su ukazala na postojanje korelacije između TBMN-a i heterozigotnih mutacija *COL4A3* ili *COL4A4* s benignom obiteljskom hematurijom.[12,34,58-67] Posebno su zanimljiva istraživanja koja pokazuju da nemaju svi heterozigotni nosioci mutacije *COL4A3* ili *COL4A4* benigni tijek bolesti nego neki mogu imati progresiju bolesti s proteinurijom, hipertenzijom i razvojem ESKD-a.[34,68-72] Neka od prethodno navedenih istraživanja su ukazala na mogućnost udruženosti TBMN-a i glomerulonefritisa, što pridonosi kompleksnosti TBMN-a.[86] Voskarides i suradnici su 2007. godine zaključili da određene *COL4A3* ili *COL4A4* mutacije bolesnicima daju predispoziciju za razvoj FSGS-a ili da je TBMN ponekad u koegzistenciji s nekim drugim genskim modifikatorom koji je odgovoran za FSGS i progresivno zatajenje bubrežne funkcije. Također navode da njihovi rezultati ne opravdavaju proglašavanje TBMN-a benignim poremećajem izvrsne prognoze.[74]

1.4 Spektar Alportovog sindroma

Miner[96] je 2014. godine u časopisu Kidney International, osvrnuvši se na poremećaje uzrokovane mutacijama gena za kolagen tipa IV, napisao da su *COL4A3* *COL4A4* i *COL4A5* mutacije klinički različite, a ultrastrukturno slične manifestacije bolesti koje je najbolje shvatiti kao spektar AS-a. To bi obuhvatilo sve poremećaje koji nastaju mutacijama gena kolagena tipa IV, a koji se na jednom kraju spektra očituju kao benigna obiteljska hematurija (bez posljedičnog učinka na funkciju bubrega), a na drugom kao klasični AS sa nedetektabilnim kolagenom tipa IV u GBM-u, konačnom progresijom u ESKD, te slušnim i vidnim smetnjama. Sve između tih dviju krajnosti ulazi u spektar poremećaja AS-a. Između ostalog, i nasljedna FSGS, ukoliko se nađe mutacija kolagena tipa IV, ulazila bi u spektar AS-a.

S obzirom da mutacija koja uzrokuje hematuriju kod jednog pojedinca u drugoga može uzrokovati progresivnu bubrežnu bolest, Miner je također napisao da bi klasifikacija tih poremećaja u određene dijelove spektra AS-a bila korisna za kliničare, ali i za bolesnike i njihove obitelji, kako bi bili upoznati s realnim rizikom kronične bubrežne bolesti.

1.5 Mjerenje debljine glomerularne bazalne membrane

Dijagnoza TBMN-a, prije svega, zahtijeva dokaz prisustva difuzno tankih GBM-a na EM-u. Međutim, definicija tankih GBM-a razlikuje se od jednog do drugog centra izvrsnosti. Razlog tome je što ne postoje opće prihvaćeni standardni kriteriji za definiranje donje granice normalne debljine GBM-a. Naime, debljina GBM-a ovisi o načinu pripremanja uzoraka za EM analizu i o metodologiji mjerenja debljine GBM-a na EM snimkama, što je različito u pojedinim centrima. Dodatno, debljina GBM-a varira ovisno o spolu i dobi. Stoga više autora govori o nužnosti definiranja vlastitog raspona uredne debljine GBM za svaki EM laboratorij.[45,97] Dische,[98] je primjenom ortogonalne metode presijecanja / srednje harmonične debljine mjerenja GBM-a,[99] odredio

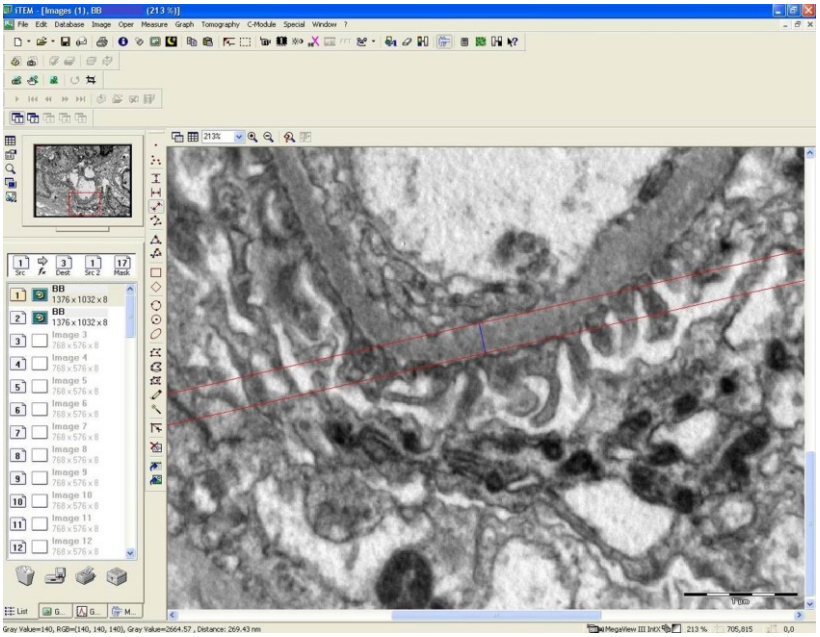
normalan raspon debljine GBM-a u odraslih od 330 do 460 nm, s definicijom TBMN-a kao prosječnom debljinom GBM-a manjom od 330 nm. Koristeći sličnu metodologiju, Tiebosch i suradnici[100] odredili su donju granicu normalnog raspona debljine GBM-a na 264 nm. U ovoj metodi koriste se EM fotografije glomerularnih kapilara. Ispisi EM fotografija (napravljeni pri konačnom uvećanju od 12 000 x u istraživanju Dischea[98]) prekriju se prozirnom plastičnom mrežom od 4 cm^2, a širina GBM-a (udaljenost između endotelnih i podocitnih staničnih membrana) bilježi se u „razredima“. Razredi su cijeli brojevi (1–9) temeljeni na mjerenjima izvedenima logaritamskim ravnalom, na mjestima gdje linije mreže presijecaju stanične membrane endotelne stanice, a ne uključuju mezangijska područja. U navedenom istraživanju Dische[98] je pregledao 9 ispisa fotografija po biopsiji, a ukupan broj takvih presjeka po biopsiji kretao se između 164 i 315 (prosjek 247). Značajno je da su uključeni svi presjeci, i oni izrađeni pod nagibom, čime su mjerenja debljine GBM-a ovom metodom potpuno slučajna. Nakon što su izvršena sva mjerenja, srednja harmonička debljina GBM-a izračunata je korištenjem skupa jednadžbi,[98,99] koje dopuštaju mjerenja kosog presjeka GBM-a. Prednosti ove metode, osim uistinu slučajnog uzorkovanja presjeka GBM-a, jesu što ona daje normalnu raspodjelu debljina te su rezultati metode reproducibilni kada se isti glomerul refotografira.[98] Glavni nedostatak ove metode je to što je izuzetno dugotrajna, vjerojatno i previše, da bi se koristila u većini rutinskih, dijagnostičkih laboratorija. Dodatno, provođenje ove metode zahtijeva znatno poznavanje matematike, koje većina patologa nema.[45]

Alternativa spomenutoj metodi je metoda izravnog mjerenje debljine GBM-a (udaljenost od endotelne do podocitne stanične membrane) i određivanje aritmetičke srednje vrijednosti tih mjerenja. Takva metoda se lako primjenjuje u rutinskim, dijagnostičkim laboratorijima bez specijaliziranog fotoaparata ili softvera, premda isključuje koso presječena područja GBM-a i pokazuje tendenciju davanja nižih normalnih raspona debljine GBM-a od metode ortogonalnog presjecanja/srednje harmonične debljine.[72,89,101,102] Das i suradnici[102] su otkrili da, ako se 16 mjerenja iz svakog od dva glomerula izvrši ovom metodom, rezultati se mogu reproducirati na iste rezultate dobivene primjenom ortogonalne metode presijecanja / srednje harmonične debljine, premda su vrijednosti otprilike 40 % veće ako se koristi potonja metoda.[102]

Na našem odjelu, Odjelu za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Kliničke bolnice Dubrava koristimo EM JEOL 1400 (slika 12) s programskom podrškom iTEM, Olympus Soft Imagin Solutions GmbH (slika 13).



Slika 12. EM JEOL 1400 Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju, Kliničke bolnice Dubrava u Zagrebu.



Slika 13. Sučelje programske podrške Olympus Soft Imagin Solutions GmbH (iTEM).

Za mjerenje debljine GBM na našem Odjelu rutinski smo godinama koristili digitalne EM fotografije i metodu izravnog mjerenja / mjerenja aritmetičke sredine. Do ovog istraživanja, na Odjelu nije bila provedena standardizacija mjerenja niti je bio određen referentni raspon debljine GBM-a.

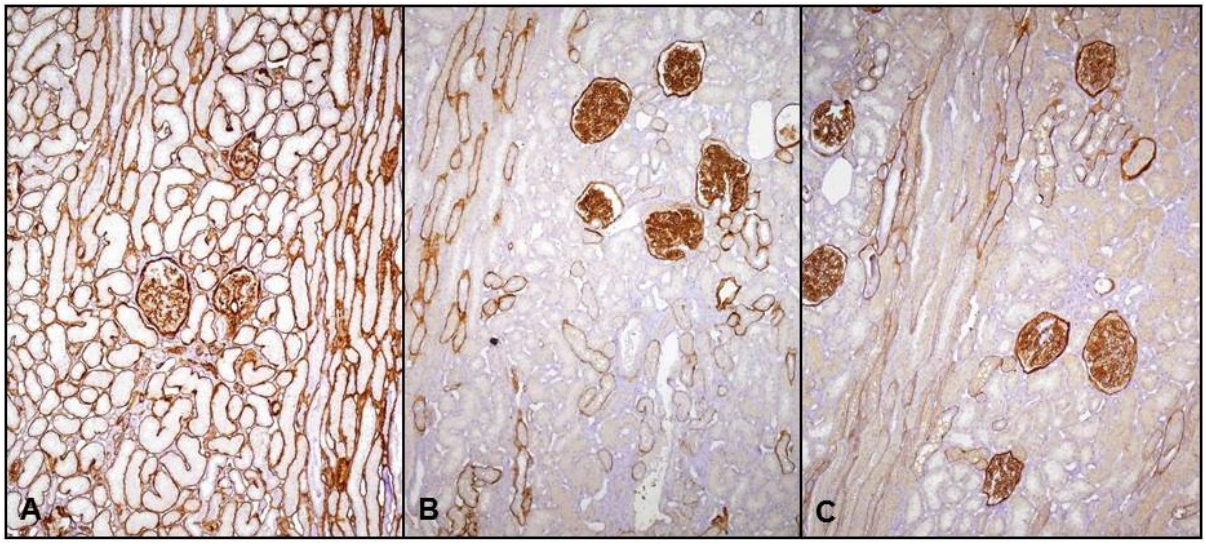
1.6 Imunohistokemijsko / imunofluorescentno bojenje na lance kolagena tipa IV

Prve studije iz 1980-ih pokazale su da bubrezi muških bolesnika s AS-om ne vežu protutijela protiv GBM-a bolesnika s Goodpasture-ovim sindromom, niti protutijela bolesnika s AS-om s post-transplantacijskim anti-GBM nefritisom. Takve su studije pomogle potvrditi patogenetsku vezu između AS-a i kolagena tipa IV koju je izvorno postavio Spear.[3,103,104]

U GBM-u muških bolesnika s X-vezanim AS-om obično nedostaje ekspresija α3, α4 i α5 lanaca kolagena tipa IV, ali su izraženi α1 i α2 lanci kolagena tipa IV.[105-108] Kod žena, heterozigotnih nositeljica X-vezane mutacije, pored dijelova GBM-a u kojima postoji ekspresija α3, α4 i α5 lanaca kolagena tipa IV, često postoje dijelovi GBM-a gdje ona nedostaje, dok je ekspresija α1 i α2 lanca kolagena tipa IV očuvana.[104-106,108,109]

U bolesnika s autosomno recesivnim AS-om, GBM obično ne izražava α3, α4 ili α5 lance kolagena tipa IV, ali su α5 lanci izraženi u Bowmanovoj kapsuli i tubularnim bazalnim membranama distalnih tubula.[110]

U bolesnika s TBMN-om održana je ekspresija lanaca kolagena tipa IV, kao i u zdravom bubregu (slika 14), s difuznim linearnim bojenjem GBM-a, Bowmanove kapsule i fokalnim linearnim bojenjem tubularnih bazalnih membrana za α3 i α5 lance.[45]



Slika 14. Imonohistokemijsko bojenje na lance kolagena tipa IV u zdravom bubregu. A) COL4A1; B) COL4A3; C) COL4A5. Originalno povećanje 100 x.

Treba napomenuti da su opisana nerijetka odstupanja od opisanih obrazaca bojenja.[42]

1.7 Nulte biopsije bubrežnog presatka

Nulte biopsije bubrežnog presatka su biopsije bubrega koje se provode za vrijeme transplantacije bubrega, bilo prije ili poslije perfuzije bubrežnog presatka. Svrha nultih biopsija je procjena histološkog stanja presatka kako bi se kod susljednih biopsija mogla vršiti usporedba s histologijom bubrega u trenutku transplantacije.[111] Nulte biopsije također djelomice pružaju informaciju o predviđanju dugotrajne funkcije presatka, iako su takva predviđanja limitirana drugim čimbenicima kao što su odbacivanje, toksični učinak imunosupresivne terapije ili pojava glomerularnih bolesti koje nisu povezane s transplantacijom.[112-114] Prilikom patohistološke analize nultih biopsija bubrežnog presatka često se pronađu određene abnormalnosti. Vrlo čest nalaz je nefroangioskleroza u bubregu darivatelja povezana s hipertenzijom. Nickleit i suradnici[111] su pronašli znakove nefroangioskleroze u 68 % bubrega darivatelja, od čega je 19 % nefroangioskleroza bilo umjerenog ili teškog stupnja. Istraživanja su također pokazala da vrlo često u bubrezima darivatelja postoje i drugi subklinički poremećaji. Najčešći je nalaz odlaganja imunoglobulina A koji je po jednom istraživanju bio prisutan u 11 %, a po drugom u 9 % živućih darivatelja.[115,116]

1.8 Bolesnici s nefropatijom tankih glomerularnih bazalnih membrana kao darivatelji bubrežnog presatka

S obzirom da poremećaji iz spektra AS mogu uzrokovati zatajenje bubrežne funkcije, nameće se pitanje podobnosti bolesnika s TBMN-om kao darivatelja bubrega. Literaturni podaci o tome su dosta oskudni. Opisani su slučajevi transplantacije gdje su darivatelji bili oboljeli od TBMN-a.[117] Prema našem saznanju o ovom pitanju nema konkretnih studija, a stavovi stručnjaka su različiti i variraju od potpunog odbacivanja bolesnika s TBMN-om kao darivatelja do suglasnosti da bolesnici s TBMN-om budu darivatelji bubrega jer je rizik razvoja kronične bubrežne bolesti, nakon darivanja, kod njih nizak.[118]

Choi i suradnici[119] su analizirali dokumentaciju 15 potencijalnih davatelja bubrega (14 ih je imalo perzistentnu mikrohematuriju, a 1 graničnu proteinuriju) koji su bili podvrgnuti biopsiji bubrega te su procijenili ulogu biopsije bubrega u kontekstu procjene funkcije presatka i usporedbe s biopsijama nakon transplantacije. Autori su također analizirali kliničke podatke darivatelja i primatelja. U njihovom istraživanju TBMN je bila najčešći uzrok nastanka perzistentne mikrohematurije kod darivatelja (n 7; 50 %), nakon toga slijede nespecifične, blage promjene mezangija i intersticija (n 4; 29 %), IgA nefropatija (n 2; 14 %) i FSGS (n 1; 7 %). Od 14 kandidata darivatelja s perzistentnom mikrohematurijom, 9 ih je prihvaćeno za davatelje bubrega: 5 s TBMN-om, 3 s blagim, nespecifičnim promjenama mezangija i 1 s nespecifičnim intersticijskim promjenama. Funkcije navedenih 9 presadaka su bile relativno stabilne (srednja vrijednost kreatinina u serumu bila je 2,38 mg/dL) tijekom prosječnog praćenja od 57 mjeseci. Zatajenje bubrežne funkcije se razvilo u 2 primatelja i nije bilo povezano s nalazima biopsije prije transplantacije. U jednoga bolesnika radilo se o akutnom odbacivanju, a u drugog o smrti bolesnika s funkcionirajućim presatkom. Zanimljivo je da je debljina GBM-a u 2 presatka od darivatelja s TBMN-om bila normalna u biopsiji praćenja, a primatelji nisu imali hematuriju. Štoviše, klinički ishodi darivatelja bili su povoljni (srednji kreatinin u serumu 0,94 ± 0,32 mg/dL) tijekom srednjeg praćenja od 34,7 ± 42,5 mjeseca. Nije primijećena novonastala hipertenzija niti proteinurija kod darivatelja.[119]

Choi i suradnici[120] su nastavili svoje istraživanje na ispitanicima s TBMN-om koji su darovali bubreg te su 2018. godine objavili istraživanje u kojem su prikazali 11 primatelja koji su dobili bubrežne presatke od darivatelja s dijagnozom TBMN-a. Njihove kliničke podatke su analizirali retrospektivno. Radilo se o živućim darivateljima kojima je na biopsiji prije transplantacije postavljena dijagnoza TBMN-a. Primatelji su praćeni nakon transplantacije 57,4 ± 28,6 mjeseci. Sedam primatelja imalo je akutno odbacivanje s medijanom pojavljivanja 9,7 mjeseci nakon transplantacije i kod svih se bubrežna funkcija oporavila nakon liječenja. Jedan bubreg je zatajio zbog okluzije arterije presatka. Funkcije ostalih presadaka su bile očuvane tijekom razdoblja praćenja. Darivatelji su praćeni kroz 41,0 ± 39,1 mjeseci, a nakon toga su bili kontaktirani telefonski (ukupno 56,8 ± 32,0 mjeseci). Svi su imali urednu bubrežnu funkciju tijekom vremena praćenja i nisu naveli nikakve poremećaje u vrijeme telefonskog razgovora. Autori zaključuju da je transplantacija bubrega kod darivatelja bubrega s TBMN-om sigurna.[120]

1.9 Svrha rada

Svrha ovog istraživanja je rasvjetljavanje kompleksne slike TBMN-a i AS-a, kako u histopatološkom i ultrastrukturnom, tako i u kliničkom smislu. Točna dijagnoza i kategoriziranje bolesnika s navedenim poremećajima omogućit će ispravan pristup u liječenju i praćenju bolesnika.

2 HIPOTEZA

Imunohistokemijska analiza na lance α3, α4 i α5 kolagena tipa IV znatno pridonosi razlikovanju TBMN-a od AS-a i subtipiziranju AS-a, kako u analizi nativnih tako i u analizi transplantiranih biopsija bubrega.

3 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3.1 Opći cilj

Opći cilj istraživanja je rasvijetliti kompleksni pojam "tankih GBM" i utvrditi ulogu imunohistokemijskog bojenja na lance α3, α4 i α5 kolagena tipa IV u razlikovanju TBMN-a od AS-a i subtipiziranju AS-a.

3.2 Specifični ciljevi

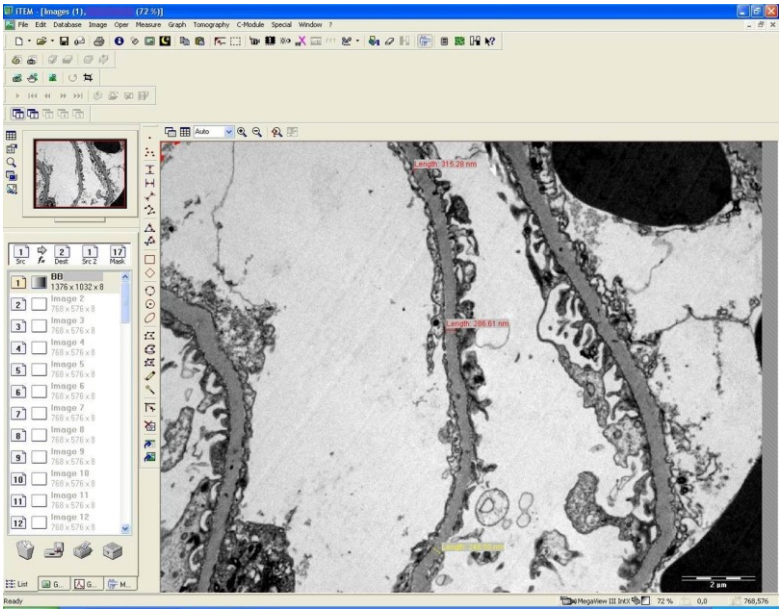
1. Definirati debljinu uredne GBM na Odjelu za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju, Kliničkog zavoda za patologiju i citologiju Kliničke bolnice Dubrava, Zagreb;
2. Odrediti patohistološka obilježja AS-a i TBMN-a;
3. Usporediti patohistološka obilježja AS-a i TBMN-a s pokazateljima bubrežne funkcije;
4. Odrediti imunohistokemijske obrasce bojenja na lance α3, α4 i α5 kolagena tipa IV u bolesnika s patohistološkom dijagnozom AS-a i TBMN-a;
5. Usporediti debljinu GBM-a između nultih biopsija i skupine ispitanika korištene za određivanje uredne debljine GBM-a;
6. Utvrditi učestalost tankih GBM-a u nultim biopsijama transplantiranih bubrega;
7. Imunohistokemijskom analizom na α3, α4 i α5 lance kolagena tipa IV u nultim biopsijama s tankim GBM-om utvrditi radi li se o TBMN-u ili podtipovima AS-a.
8. Usporediti debljine GBM-a između nultih biopsija i biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije;
9. Usporediti kliničke parametre bubrežne funkcije i stupnjeve kroničnih promjena prema Banff klasifikaciji[121] transplantiranih ispitanika s TBMN-om i mogućim AS-om u odnosu na ispitanike bez navedenih dijagnoza.

4 ISPITANICI I METODE ISTRAŽIVANJA

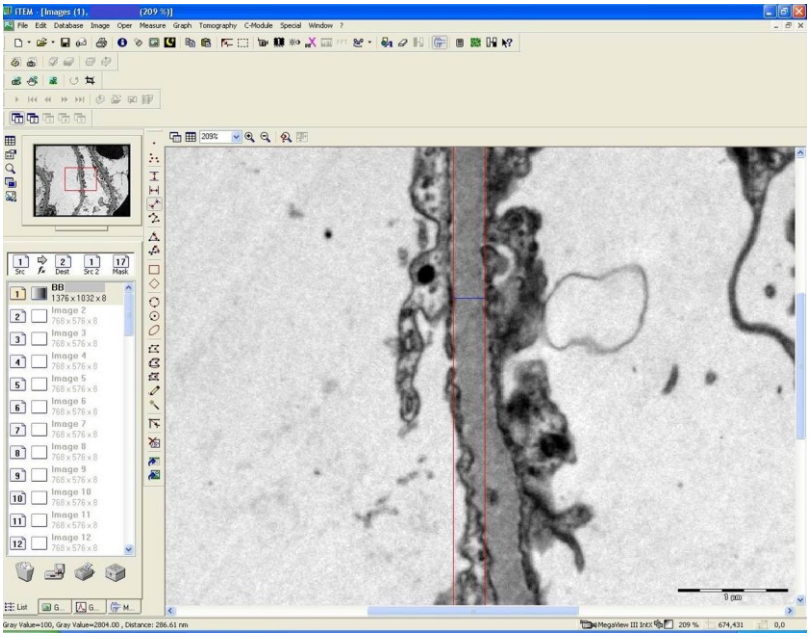
Materijal dobiven biopsijom bubrega rutinski se dijeli na tri dijela: za svjetlosnu, imunofluorescentnu (IF) i EM analizu. Na Odjelu za nefropatologiju Kliničke bolnice Dubrava koristi se EM JEOL 1400. Područja značajna za postavljanje dijagnoze fotografiraju se digitalnom kamerom koja je sastavni dio EM-a. Debljina GBM-a rutinski se određuje modifikacijom metode direktnog mjerenja GBM-a (mjerenje udaljenosti od endotelne do podocitne stanične membrane) na digitalnim EM fotografijama. Mjerenje se vrši na minimalno 10 mjesta (povećanje 8 000x) koristeći program Olympus Soft Imaging Solutions GmBH (iTEM), a rezultat mjerenja se izražava kao raspon od minimalne do maksimalne vrijednosti mjerenja izražene u nanometrima, uz izračun aritmetičke sredine i standardne devijacije.

4.1 Metodologija mjerenja debljine glomerularne bazalne membrane i određivanje referentnog raspona uredne debljine iste

Budući da do ovog istraživanja nije bila provedena standardizacija mjerenja debljine GBM-a na našem Odjelu, prvi korak u ovom istraživanju bilo je određivanje referentnih vrijednosti debljine GBM-a za naš Odjel. Pri tome smo koristili modifikaciju metode direktnog mjerenja GBM-a i računanja aritmetičke sredine tih mjerenja na 30 mjesta u glomerulu prema metodologiji mjerenja koju je opisao Haas.[45,72] Korištena je programska podrška iTEM, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH. Mjerenja su vršena na digitalnim fotografijama povećanja 4 000 – 8 000 x (slika 15), uz korištenje digitalnog uvećanja od 150 – 400 % za točnije pozicioniranje i mjerenje udaljenosti od endotelne do podocitne stanične membrane (slika 16).

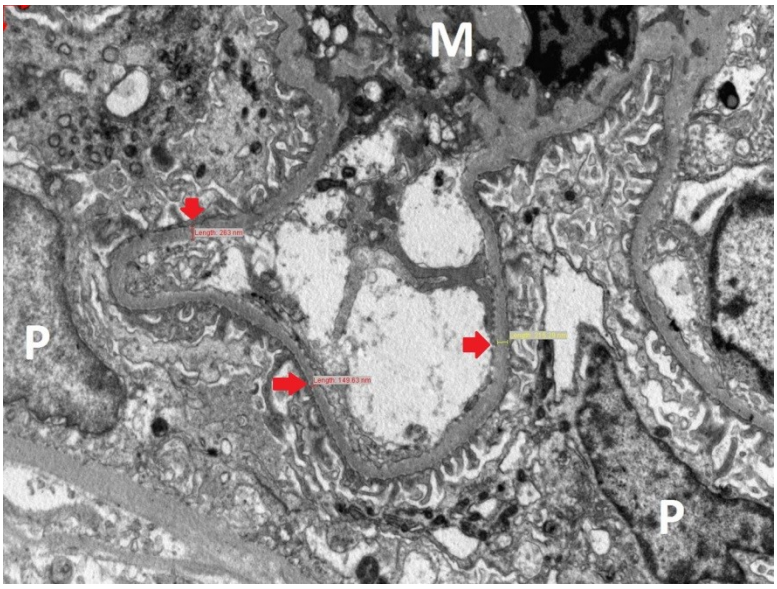


Slika 15. Sučelje programske podrške Olympus Soft Imaging Solutions GmBH (iTEM) s digitalnom fotografijom glomerula, povećanje 8 000 x.



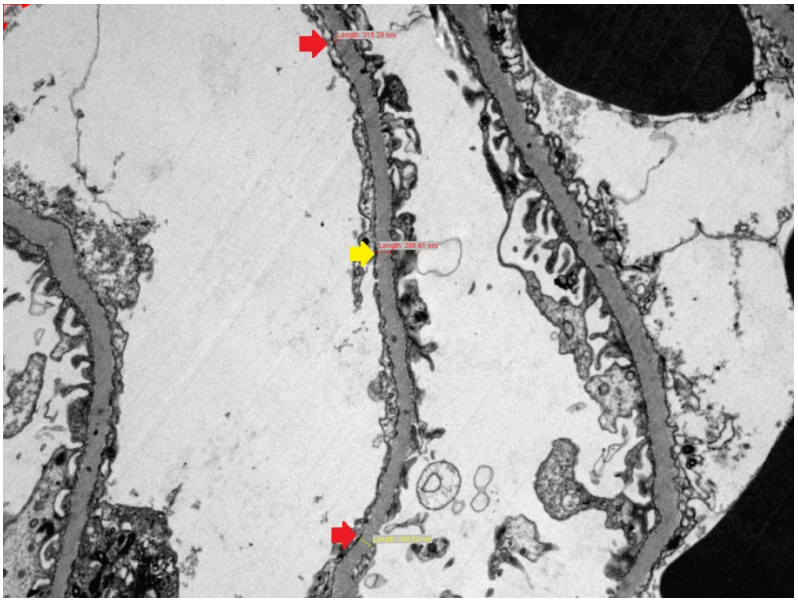
Slika 16. Sučelje programske podrške Olympus Soft Imaging Solutions GmBH (iTEM). Korištenje digitalnog povećanja na digitalnoj slici glomerula originalnog povećanja 8 000 x (cijela fotografija prikazana je u malom prozoru u lijevom gornjem dijelu slike).

Za kapilarne petlje zastupljene cijelim opsegom na digitalnim EM fotografijama izravna mjerenja debljine GBM-a izvršena su u 3 točke njihovog presjeka, pritom nisu mjereni kosi presjeci. Ako se pretpostavi da je mezangijsko područje smješteno na 12 sati, mjerenja su izvršena na pozicijama najbliže 3, 6 i 9 sati, kao što je prikazano na slici 17.



Slika 17. Pozicije direktnog mjerenja GBM-a za kapilarne petlje zastupljene u cijelom opsegu na EM fotografiji. Mezangijsko područje (M) nalazi se na 12 sati, a mjerenja su izvršena na 3, 6 i 9 sati (strelice). EM, originalno povećanje 8 000 x.

Za ostale kapilare, mjesta mjerenja GBM-a bile su dvije točke presjeka GBM-a najbliže rubovima fotografije ili prijelazu prema mezangijskom području (ne uključujući stvarni mezangijalni dio niti kose prereze GBM-a). Treće mjerenje GBM-a učinjeno je što bliže srednjoj točki (s obzirom na dužinu GBM-a) između gore navedene dvije točke (slika 18).



Slika 18. Pozicije direktnog mjerenja GBM na EM fotografijama bez cijelog opsega kapilarne petlje. Mjesta mjerenja GBM-a su dvije točke presjeka GBM-a najbliže rubovima fotografije (crvene strelice), dok je treće mjerenje određeno kao točka mjerenja GBM-a što bliže srednjoj točki između gore navedene dvije točke mjerenja (žuta strelica).

Normalni raspon debljine GBM-a za svaki spol definirali smo kao raspon unutar dvije standardne devijacije (SD) dobivenih srednjih vrijednosti. U svrhu definiranja urednih vrijednosti debljine GBM-a na našem Odjelu, analizirane su digitalne EM fotografije tkiva bubrega 23 muška i 22 ženska ispitanika starija od 9 godina (raspon dobi od 19 do 84 godine), kojima je tijekom rutinskog dijagnostičkog rada postavljena dijagnoza stanja koja ne utječu na debljinu GBM-a (bolest minimalnih promjena, akutni intersticijski nefritis, akutno tubularno oštećenje, uredan parenhim bubrega). Isključni kriteriji bili su hematurija i klinički podatak o dijabetesu. Za ispitanike mlađe od 9 godina, referentne vrijednosti izračunate su prema formulama koje su objavili Haas i suradnici[45]. Naime, Morita i suradnici[122] su pokazali da debljina GBM-a do 9. godine života raste linearno, a nakon toga dolazi do platoa koji postaje stalan.

Ovo istraživanje je podijeljeno u dva dijela: 1. ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama nativnih bubrega; 2. ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijom bubrežnog presatka.

4.2 Ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama nativnih bubrega

Provedeno je retrospektivno istraživanje. Ispitanici su identificirani pretragom registra bubrežnih biopsija Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava u periodu od 2006. do 2019. godine. Uključni kriteriji su bili patohistološka dijagnoza (PHD) AS-a, TBMN-a i hereditarnog nefritisa (termina korištenog kada nefropatolog na temelju nalaza patohistologije nije bilo mogao odlučiti radi li se o AS-u ili TBMN-u).

Na EM snimkama glomerula 33 ispitanika kojima je postavljena dijagnoza AS-a, 87 ispitanika kojima je postavljena dijagnoza TBMN-a, i 10 ispitanika kojima je postavljena dijagnoza hereditarnog nefritisa, prethodno opisanom metodom, određena je točna debljina GBM-a.

Nakon provedenog mjerenja debljine GBM-a, tkiva bubrega su analizirana imunohistokemijskom metodom protutijelima na α3, α4 i α5 lance kolagena tipa IV. Kao pozitivna kontrola korišteno je protutijelo na α1 lance kolagena tipa IV.

Korišteni su uzorci tkiva dobiveni biopsijom bubrega fiksirani u 10 %-om puferiranom formalinu, koji su dehidrirani i uklopljeni u parafin. Parafinski blokovi su rezani rotacijskim mikrotomom na rezove debljine 5 μm i stavljeni na silanizirana predmetna stakalca. Stakalca su sušena preko noći na 56 - 60°C. Slijedila je deparafinizacija u ksilolu i rehidracija kroz silazni niz alkohola.

Za imuhistokemijsko određivanje COL4A1, COL4A3 i COL4A5 korišten je *Alport's syndrome kit* (Wieslab, Eurodiagnostica, Švedska). Demaskiranje antigena provedeno je s citratnim puferom - pH 2,0 i kuhanjem u mikrovalnoj pećnici 9 minuta na 700 W te nakon toga 19 minuta na 360 W. Preparati za COL4A5 analizu dodatno su inkubirani u glincin / urea otopini 5 minuta te nakon toga 2 puta po dvije minute natopljeni u TBS puferu. Aktivnost endogene peroksidaze blokirana je 3 %-tnim vodikovim peroksidom (otopina koja blokira peroksidazu, S2023, Dako ChemMate, Glostrup, Danska) kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi. Protutijela na COL4A1 (monoklonalno mišje protutijelo na α1 lanac kolagena tipa IV u razrjeđenju 1:50), COL4A3 (monoklonalno mišje protutijelo na α3 lanac kolagena tipa IV u razrjeđenju 1:50) i COL4A5 (monoklonalno štakorsko protutijelo na α5 lanac kolagena tipa IV u

razrjeđenju 1:100), dodana su na stakalca i inkubirana preko noći na 4 °C. Za COL4A1 i COL4A3 korišten je anti-mišji detekcijski sustav (LINK mouse Dako, HRP rabbit / mouse inkubacije 60 min i EnVision sustav). Za COL4A5 korišten je anti-štakorski vizualizacijski sustav (rabbit anti-rat IgG H&L (HRP), Abcam, u razrjeđenju 1:50, inkubacija 30 min). Vizualizacija peroksidaze postignuta je inkubacijom u otopini DAB kromogena 10 minuta, čime je dobiveno smeđe bojenje. Svi koraci uključivali su pranje tris puferiranom fiziološkom otopinom (TBS), pH 7,4. Preparati su kontrastirani hematoksilinom, dehidrirani, izbistreni ksilolom i prekriveni pokrivnim stakalcima učvršćenima medijem za pokrivanje.

Za imunohistokemijsko bojenje COL4A4 korišteno je anti-COL4A4 protutijelo (COL4A4, Covalab SAS, Francuska). Demaskiranje antigena provedeno je PT Link-om (Dako, Danska). Aktivnost endogene peroksidaze suzbijena je 3 %-tnim vodikovim peroksidom (Otopina koja blokira peroksidazu, S2023, Dako ChemMate, Danska) kroz 5 minuta na sobnoj temperaturi. Protutijelo na COL4A4 (poliklonalno zečje protutijelo na α4 lanac kolagena tipa IV u razrjeđenju 1:100), dodano je na stakalca i inkubirano preko noći na 7 °C. Korišten je EnVision anti-zečji sustav (Dako, Danska). Vizualizacija peroksidaze postignuta je inkubacijom u otopini DAB kromogena 10 minuta, čime je dobiveno smeđe bojenje. Svi koraci uključivali su pranje TBS-om, pH 7,4. Preparati su kontrastirani hematoksilinom, dehidrirani, izbistreni ksilolom i prekriveni pokrivnim stakalcima učvršćenima medijem za pokrivanje.

Prema obrascima imunohistokemijske analize (kvalitativne analize distribucije vezanja protutijela), ispitanici su raspodijeljeni u skupine:

1. Skupina ispitanika s diskontinuiranim obrascem bojenja glomerularnog klupka i ekstraglomerularnih bazalnih membrana na COL4A3, COL4A4 i COL4A5 (X-vezani nosioci - heterozigotni AS);
2. Skupina ispitanika s izostankom bojenja glomerularnog klupka i ekstraglomerularnih bazalnih membrana na COL4A3, COL4A4, COL4A5 (bolesnici s X vezanim AS-om);

3. Skupina ispitanika kojima bojenje na COL4A5 pokazuje pozitivitet u Bowmanovoj čahuri i tubularnim bazalnim membranama (bolesnici s autosomno recesivnim AS-om);
4. Skupina ispitanika s urednim obrascima bojenja na COL4A3, COL4A4, COL4A5 (ispitanici s TBMN-om);[45]
5. Skupina ispitanika s atipičnim obrascem bojenja;

S obzirom da bolesnici s dijagnozom TBMN-a pokazuju urednu ekspresiju (dokazanu imunohistokemijski ili pomoću IF-a) α3, α4 i α5 lanaca kolagena tipa IV,[123,124] ispitanici kod kojih su na EM nađene tanke GBM, a imunohistokemijski su imali nepravilni obrazac ekspresije lanaca kolagena tipa IV svrstani su u grupu AS-a.

Za sve ispitanike pretragom zapisa podataka (povijesti bolesti i patohistoloških nalaza) prikupljeni su podaci o patohistološkoj slici, ultrastrukturi GBM-a, klinički podaci u trenutku biopsije te podaci o komorbiditetima i obiteljskoj anamnezi. Od patohistoloških podataka prikupljeni su podaci o ukupnom broju glomerula, broju i udjelu potpuno vezivno promijenjenih glomerula, broju i udjelu glomerula sa segmentalnom sklerozom, prisustvu pjenušavih stanica u intersticiju, udjelu i stupnju intersticijske fibroze i tubularne atrofije, prisustvu intersticijske upale, te prisustvu i stupnju arterioloskleroze i fibrointimalnog zadebljanja arterija. Potpuno vezivno promijenjen glomerul je definiran kao vezivna promjena cijelog kapilarnog klupka glomerula u svim analiziranim rezovima preparata. Segmentalna skleroza je definirana kao vezivna promjena bilo kojeg dijela površine kapilarnog klupka, ali ne i cijelog kapilarnog klupka u svim rezovima dostupnima analizi. Intersticijska upala je definirana kao prisustvo mononuklearnog upalnog infiltrata u intersticiju kore bubrega u bilo kojem udjelu. Klinički podaci u trenutku biopsije su uključivali: procijenjenu brzinu glomerularne filtracije (eGFR) izračunatu po CKD-EPI formuli (ml/min/1,73m^2), prisustvo i razinu proteinurije te prisustvo eritrociturije. Razina proteinurije određena je kao masa ukupnih proteina u dnevnom urinu (g/24h), gdje je uredan nalaz smatran do 0,14 g/24 h. Eritrociturijom je smatran nalaz više od 2 eritrocita po vidnom polju velikog povećanja u sedimentu urina.

4.3 Ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama transplantiranih bubrega

U postupku ispitivanja tkiva dobivenih biopsijama transplantiranih bubrega analizirali smo nalaze svjetlosne i IF / imunohistokemijske mikroskopije te digitalne EM fotografije 90 ispitanika s nultim biopsijama bubrega. Na EM snimkama biopsija bubrega navedenih ispitanika prethodno opisanom metodom (str. 23) na najmanje 30 mjesta u glomerulu odredili smo točnu debljinu GBM-a.

Također smo usporedili debljine GBM-a nultih biopsija s referentnim vrijednostima za urednu debljinu GBM-a (našeg Odjela i SZO-a) i time odredili točnu učestalost tankih GBM-a u grupi nultih biopsija transplantiranih bubrega. Tkiva bubrega ispitanika s tankim GBM na nultim biopsijama analizirana su imunohistokemijskom analizom i kategorizirana na isti način kako je prethodno opisano za biopsije nativnih bubrega (str. 27).

Usporedili smo razliku u debljini GBM-a između nulte biopsije i biopsije koja je napravljena kod istog ispitanika 12 mjeseci nakon transplantacije, ako je za nju postojala EM analiza. Debljina GBM-a u navedenim biopsijama izmjerena je metodom direktnog mjerenja GBM-a i računanja aritmetičke sredine mjerenja na najmanje 30 mjesta kako je prethodno opisano za nativne bubrege (str. 23).

Za ispitanike s transplantiranim bubregom, prikupljeni su podaci o kroničnim patohistološkim promjenama presatka prema Banff klasifikaciji (tablica 1).[121] Također su prikupljeni podaci o eGFR-u, prisustvu eritrociturije te prisustvu (urin test traka) i razini proteinurije. Uredne vrijednosti definirane su jednako kao i u ispitivanju nativnih bubrega (str. 29). Razina proteinurije određena je omjerom proteina i kreatinina u urinu, pri čemu je urednim smatrana vrijednost manja od 15 mg/mmol. Navedeni parametri su uspoređeni između skupina ispitanika s i bez tankih GBM-a.

Tablica 1. Vrsta i stupanj kroničnih patohistoloških promjena presatka prema Banff klasifikaciji.[121]

Kvantitativni kriteriji za dupliranje GBM-a:	
cg0	Bez dupliranja GBM-a na svjetlosnoj mikroskopiji ili EM
cg1a	Bez dupliranja GBM-a na svjetlosnoj mikroskopiji, ali dupliranje GBM-a (nepotpuno ili u cijeloj cirkumferenciji) u barem tri glomerularne kapilare na EM s udruženim bubrenjem endotela i/ili subendotelnim elektronski svijetlim proširenjem
cg1b	Dupliranje GBM-a na svjetlosnoj mikroskopiji u 1 - 25 % kapilarnih petlji nezahvaćenijeg nesklerozirano glomerula, EM potvrda je preporučena ako je EM dostupna
cg2	Dupliranje GBM-a koje zahvaća 26 - 50 % kapilarnih petlji najzahvaćenijeg glomerula
cg3	Dupliranje GBM-a koje zahvaća > 50 % kapilarnih petlji najzahvaćenijeg glomerula
Kvantitativni kriteriji za proširenje mezangijskog matriksa:	
mm0	Ne više od blagog mezangijskog proširenja u bilo kojem glomerulu
mm1	Najmanje umjereno proširenje mezangijskog matriksa u do 25 % nesklerotičnih glomerula
mm2	Najmanje umjereno proširenje mezangijskog matriksa u 26 - 50 % nesklerotičnih glomerula
mm3	Najmanje umjereno proširenje mezangijskog matriksa u >50 % nesklerotičnih glomerula
Kvantitativni kriteriji za hijalinozu arteriola:	
ah0	Bez PAS pozitivnog hijalinog zadebljanja arteriola
ah1	Blago do umjereno PAS pozitivno hijalino zadebljanje u barem jednoj arterioli
ah2	Umjereno do znatno PAS pozitivno hijalino zadebljanje u više od jedne arteriole
ah3	Teško PAS pozitivno hijalino zadebljanje u mnogo arteriola
Kvantitativni kriteriji za fibrointimalno zadebljanje arterija:	
cv0	Bez kroničnih promjena arterija
cv1	Suženje lumena arterije fibrointimalnim zadebljanjem do 25 %
cv2	Suženje lumena arterije fibrointimalnim zadebljanjem 26 - 50 %
cv3	Suženje lumena arterije fibrointimalnim zadebljanjem > 50 %
Kvantitativni kriteriji za intersticijsku fibrozu:	
ci0	Intersticijska fibroza u do 5 % kortikalnog područja
ci1	Intersticijska fibroza u 6 - 25 % kortikalnog područja (blaga intersticijska fibroza)
ci2	Intersticijska fibroza u 26 - 50 % kortikalnog područja (umjerena intersticijska fibroza)
ci3	Intersticijska fibroza u > 50 % kortikalnog područja (teška intersticijska fibroza)
Kvantitativni kriteriji za tubularnu atrofiju:	
ct0	Bez tubularne atrofije
ct1	Tubularna atrofija zahvaća do 25 % kortikalnih tubula (blaga tubularna atrofija)
ct2	Tubularna atrofija zahvaća 26 - 50 % kortikalnih tubula (umjerena tubularna atrofija)
ct3	Tubularna atrofija u > 50 % područja kortikalnih tubula (teška tubularna atrofija)

4.4 Statistička analiza

Podaci su prikazani tablično i grafički. Kategorijski podaci su predstavljeni apsolutnim i relativnim frekvencijama. Razlike između kategorijskih varijabli testirane su χ^2 - testom, a po potrebi Fisherovim egzaktnim testom. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli je testirana Shapiro - Wilkovim testom. Numerički podaci su opisani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, medijanom s interkvartilnim rasponom te minimalnom i maksimalnom vrijednosti. Razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli između dviju nezavisnih skupina su testirane Studentovim t testom, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Mann-Whitneyevim U testom. U slučaju 3 i više skupina, razlike normalno raspodijeljenih numeričkih varijabli testirane su analizom varijance (ANOVA s Bonferronijevom korekcijom), a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele Kruskal-Wallisovim testom (Dunnova korekcija). Za usporedbu zavisnih kontinuiranih varijabli (na nultoj biopsiji i biopsiji 12 mjeseci nakon transplantacije) korišten je, za normalno raspodijeljene varijable, t-test parnih uzoraka, a u slučaju odstupanja od normalne raspodjele, Wilcoxonov test sume rangova. Za sve analize razina značajnosti je postavljena na $\alpha = 0,05$. Sve P vrijednosti su dvostrane. Analiza je provedena pomoću računalnih programa SPSS 19.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) i MedCalc 11.4.2.0. (MedCalc Software bvba).

5 REZULTATI

5.1 Određivanje referentnog raspona uredne debljine GBM-a

Kao kontrolna skupina za određivanje uredne debljine GBM-a na našem Odjelu korišteno je tkivo bubrega 23 muška i 22 ženska ispitanika starija od 9 godina (raspon dobi od 19 do 84 godine), kojima je tijekom rutinske dijagnostičke obrade tkiva nativnih bubrega postavljena dijagnoza stanja kod kojih nema promjene debljine GBM-a (bolest minimalnih promjena, akutni intersticijski nefritis, akutno tubularno oštećenje, uredan parenhim bubrega). Isključni kriteriji bili su hematurija i klinički podatak o dijabetesu.

Određena je srednja debljina od 340 nm uz SD-u 36 nm za muškarce i 301 nm uz SD-u 44 nm za žene. Urednu debljinu GBM-a za svaki spol definirali smo kao raspon unutar 2 SD-a srednjih vrijednosti te je normalna debljina GBM-a za muškarce iznosila 268 - 412 nm, a za žene 213 - 389 nm (tablica 2).

Tablica 2. Srednja vrijednost i raspon vrijednosti uredne debljine GBM-a Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju, KB Dubrava.

	$\bar{x}$ ± SD debljine GBM-a, nm	Uredna debljina GBM-a ($\bar{x}$ ± 2SD), nm
Muškarci (n=23)	340 ± 36	268 - 412
Žene (n=22)	301 ± 44	213 - 389

$\bar{x}$ – aritmetička sredina, SD – standardna devijacija, GBM – glomerularna bazalna membrana

Vrijednosti uredne debljine GBM-a za ispitanike mlađe od 9 godina izračunate su prema formulama koje je objavio Haas[45] kao što je prikazano u tablici 3.

Tablica 3. Raspon uredne debljine GBM-a za ispitanike mlađe od 9 godina (preuzeto iz Haas M. Arch Pathol Lab Med. 2009;133(2):224-32).

	Uredna debljina GBM-a, nm	
Dob, godine	**Dječaci**	**Djevojčice**
Rođenje	135 – 253	137 – 251
1	146 – 273	146 – 267
2	156 – 292	154 – 283
3	167 – 312	163 – 299
4	177 – 332	172 – 315
5	188 – 351	180 – 331
6	198 – 371	189 – 347
7	209 – 391	198 – 363
8	219 – 410	206 – 379

GBM – glomerularna bazalna membrana

5.2 Istraživanje na biopsijama nativnih bubrega

5.2.1 Kliničke i patohistološke karakteristike uključenih ispitanika

U dio istraživanja na biopsijama nativnih bubrega uključeno je 130 ispitanika s PHD-om AS-a, TBMN-a ili hereditarnog nefritisa (termin korišten kada na temelju patohistološke analize nije bilo moguće sa sigurnošću utvrditi radi li se o AS-u ili TBMN-u). Uključeno je 39 muškaraca (30 %) i 91 žena (70 %), prosječne dobi 42 godine (od 3 do 73 godine).

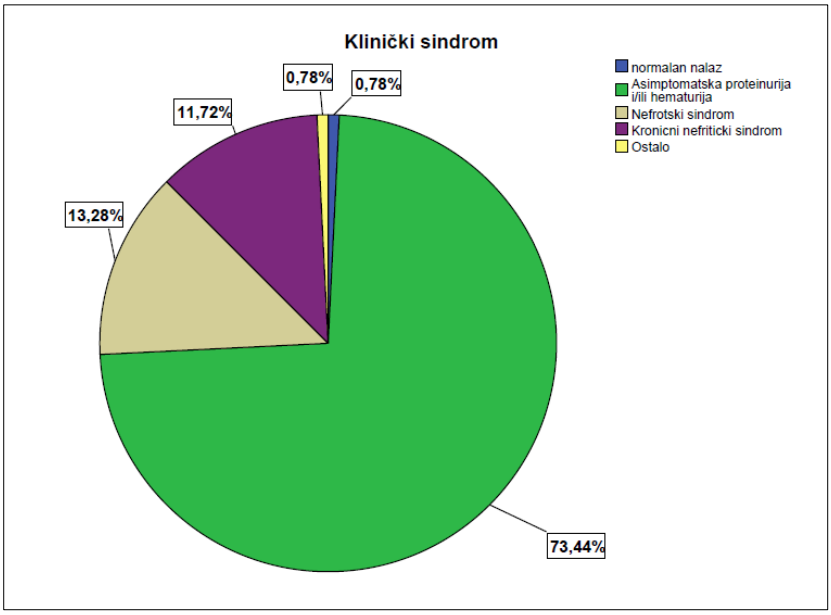
Kliničke karakteristike ovih ispitanika prikazane su u tablici 4. Većina ispitanika (114; 94,2 %) je imala eritrocituriju, dok je manji udio (79; 65,3 %) imao proteinuriju sa srednjom vrijednosti od 1,61 g/24h. Srednja vrijednost serumskog kreatinina je iznosila 98,9 µmol/l, a eGFR 81,3 ml/min/1,73m^2.

Tablica 4. Kliničke karakteristike ispitanika s biopsijom nativnog bubrega.

Spol N = 130 (%)	Žene	91 (70,0)
	Muškarci	39 (30,0)
Dob kod biopsije (godine) N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	42 ± 15
	C (IKR)	43 (32 – 52)
	Najmanja vrijednost	3
	Najveća vrijednost	73
Eritrociturija N = 121 (%)	Ne	7 (5,8)
	Da	114 (94,2)
Proteinurija N = 121	Ne	42 (34,7)
	Da	79 (65,3)
24-satna proteinurija (g/dU) N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	1,61 ± 2,64
	C (IKR)	0,61 (0,12 – 1,95)
	Najmanja vrijednost	0,00
	Najveća vrijednost	19,80*
Serumski kreatinin (umol/L) N = 130	$\bar{x} \pm$ stan SD	98,9 ± 64,9
	C (IKR)	82,5 (70,0 – 102,5)
	Najmanja vrijednost	41,0
	Najveća vrijednost	599,0
eGFR CKD-EPI (ml/min/1,73m2) N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	81,3 ± 28,5
	C (IKR)	81,5 (65,3 – 96,9)
	Najmanja vrijednost	12,0
	Najveća vrijednost	150,0

C – medijan; $\bar{x}$ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon; eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije; *Proteinurija u bolesnika koji je imao TBMN udruženu s primarnim FSGS-om

Većina ispitanika (95; 73,4 %) se prezentirala s asimptomatskom proteinurijom i/ili eritrociturijom. Slijedeći po učestalosti je bio nefrotski sindrom (17; 13,3 %) potom kronični nefritički sindrom (15; 11,7 %), što je prikazano na slici 19.



Slika 19. Raspodjela ispitanika s biopsijom nativnog bubrega prema kliničkom sindromu.

Podaci o komorbiditetima ispitanika prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Podaci o komorbiditetetima ispitanika s biopsijom nativnog bubrega.

Hipertenzija N = 125 (%)	Ne	56 (44,8)
	Da, prije biopsije	64 (51,2)
	Da, poslije biopsije	5 (4,0)
Šećerna bolest N = 125 (%)	Ne	119 (95,2)
	Da, prije biopsije	4 (3,2)
	Da, poslije biopsije	2 (1,6)
Plućna bolest N = 125 (%)	Ne	116 (92,8)
	Da, prije biopsije	8 (6,4)
	Da, poslije biopsije	1 (0,8)
Srčana bolest N = 125 (%)	Ne	119 (95,2)
	Da, prije biopsije	3 (2,4)
	Da, poslije biopsije	3 (2,4)
Cerebro-vaskularna bolest N = 125 (%)	Ne	125 (100,0)
	Da, prije biopsije	0 (0,0)
	Da, poslije biopsije	0 (0,0)
Periferna vaskularna bolest N = 122 (%)	Ne	121 (99,2)
	Da, prije biopsije	1 (0,8)
	Da, poslije biopsije	0 (0,0)

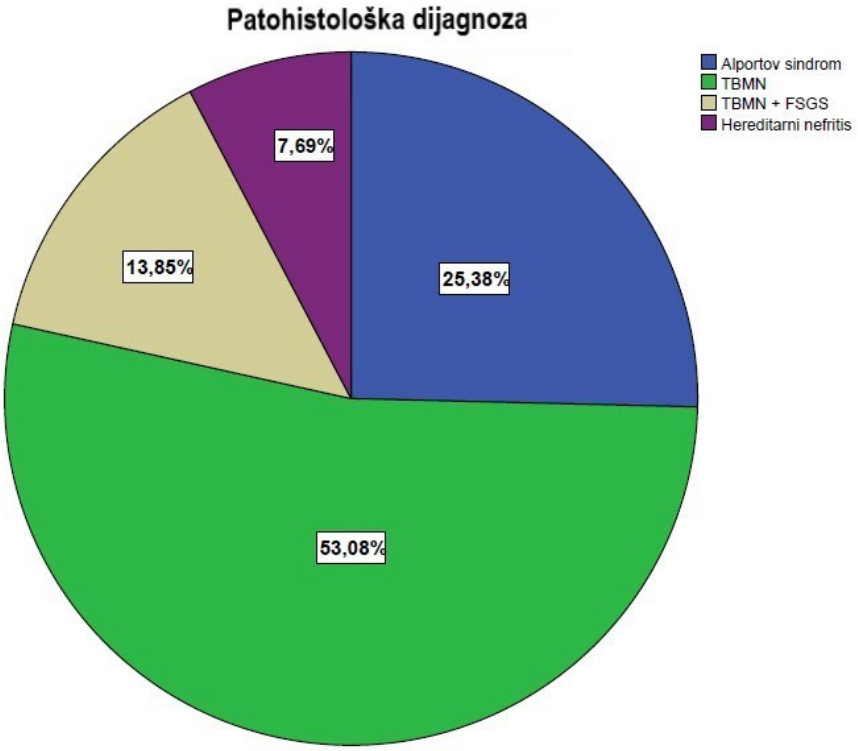
Obzirom da su ispitivani poremećaji nasljedni, prikupljeni su podaci iz obiteljskih anamneza ispitanika (tablica 6).

Tablica 6. Podaci o obiteljskoj anamnezi ispitanika s biopsijom nativnog bubrega.

AS, TBMN ili hereditarni nefritis u obitelji N = 118 (%)	Ne	105 (89,0)
	Da	13 (11,0)
Porijeklo bubrežnog poremećaja N = 118 (%)	Nepoznato	95 (80,5)
	majka	16 (13,6)
	otac	7 (5,9)
Hematurija u obitelji N = 116 (%)	Ne	94 (81,0)
	Da	22 (19,0)

AS – Alportov sindrom; TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana

Od uključenih 130 ispitanika, 33 ispitanika (25,4 %) su imala dijagnozu AS-a, 69 (53,1 %) TBMN-a, 18 (13,9%) TBMN-a udruženog s FSGS-om na svjetlosnoj mikroskopiji i 10 (7,7 %) dijagnozu hereditarnog nefritisa (slika 20).



Slika 20. Raspodjela PHD-a ispitanika s biopsijom nativnog bubrega.

Svjetlosno-mikroskopske karakteristike biopsija nativnih bubrega prikazane su u tablici 7.

Tablica 7. Nalazi svjetlosne mikroskopije biopsija nativnih bubrega.

Broj glomerula N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	18 ± 9
	C (IKR)	18 (11 – 24)
	Najmanja vrijednost	1
	Najveća vrijednost	46
Broj potpuno vezivno promijenjenih glomerula N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	2 ± 3
	C (IKR)	2 (1 – 3)
	Najmanja vrijednost	0
	Najveća vrijednost	21
Broj glomerula sa segmentalnom sklerozom N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	1 ± 2
	C (IKR)	0 (0 – 1)
	Najmanja vrijednost	0
	Najveća vrijednost	9
Udio potpuno vezivno promijenjenih glomerula (%) N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	14 ± 15
	C (IKR)	10 (3 – 19)
	Najmanja vrijednost	0
	Najveća vrijednost	70
Udio glomerula sa segmentalnom sklerozom (%) N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	7 ± 11
	C (IKR)	0 (0 – 11)
	Najmanja vrijednost	0
	Najveća vrijednost	50
Pjenušave stanice u intersticiju N = 130	Ne	119 (91,5 %)
	Da	11 (8,5 %)
IFTA (%) N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	11,16 ± 14,42
	C (IKR)	5 (0 – 10)
	Najmanja vrijednost	0
	Najveća vrijednost	70
IFTA (stupanj) N = 130	< 25 %	110 (84,6 %)
	25 - 50 %	17 (13,1 %)
	> 50 %	3 (2,3 %)
Tubulointersticijska upala N = 130	Ne	103 (79,2 %)
	Da	27 (20,8 %)
Arterioloskleroza N = 130	Nema	68 (52,3 %)
	Nodularna hijalinoza u 1 arterioli	11 (8,5 %)
	Nodularna hijalinoza u više arteriola	38 (29,2 %)
	Hijalinoza u cijelom opsegu arteriola	13 (10,0 %)
Fibrointimalno zadebljanje arterija N = 130	Ne	90 (69,2 %)
	Da	40 (30,8 %)
Suženje lumena arterija N = 130	Nema	90 (69,2 %)
	<= 25 %	20 (15,4 %)
	26 - 50 %	13 (10,0 %)
	> 50 %	7 (5,4 %)

C – medijan; $\bar{x}$ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon; IFTA - intersticijska fibroza i tubularna atrofija

Srednja vrijednost broja glomerula po biopsiji je iznosila 18. Srednja vrijednost udjela potpuno vezivno promijenjenih glomerula iznosila je 14 %, a glomerula sa segmentalnom sklerozom 7 %. Pjenušave stanice u intersticiju su bile prisutne u 11 (8,5 %) ispitanika. Većina ispitanika imala je IFTA-u u manje od 25 % kore. Arterioloskleroza je bila prisutna u 62 ispitanika (47,7 %), a fibrointimalno zadebljanje arterija u 40 (30,8 %) ispitanika. Dominantno se radilo o arteriosklerozi blagog tipa (suženje lumena manje od 25 % u 15,4 % ispitanika).

Karakteristike biopsija nativnih bubrega na EM-u prikazane su u tablici 8.

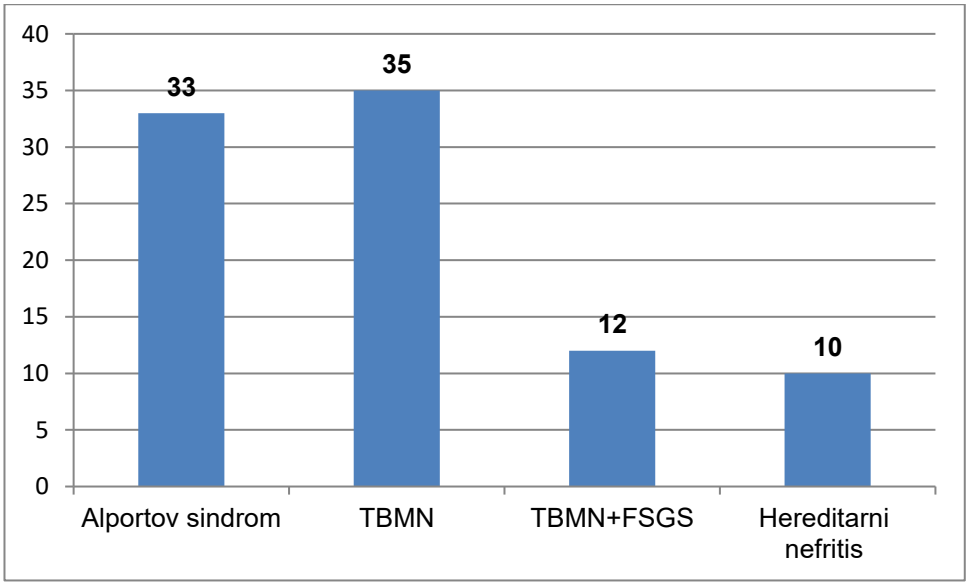
Tablica 8. Elektronsko-mikroskopske karakteristike biopsija nativnih bubrega.

GBM- $\bar{x}$ (nm) N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	234,53 ± 55,44
	C (IKR)	222,00 (204,00 - 259,00)
	Najmanja vrijednost	118,00
	Najveća vrijednost	517,00
GBM - min (nm) N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	134,52 ± 35,69
	C (IKR)	131,00 (114,00 - 155,00)
	Najmanja vrijednost	60,00
	Najveća vrijednost	241,00
GBM - max (nm) N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	398,73 ± 160,08
	C (IKR)	359,00 (304,00 - 409,00)
	Najmanja vrijednost	185,00
	Najveća vrijednost	1171,00
GBM - SD (nm) N = 130	$\bar{x} \pm$ SD	61,78 ± 34,81
	C (IKR)	53,00 (42,00 - 66,00)
	Najmanja vrijednost	27,00
	Najveća vrijednost	262,00
Lameliranje GBM-a N = 129	Ne	85 (65,9 %)
	oskudno, mjestimice	15 (11,6 %)
	Da	29 (22,5 %)
Izmjena tankih i debelih dijelova GBM-a N = 129	Ne	86 (66,7 %)
	Da	43 (33,3 %)

GBM – glomerularna bazalna mebrana; C – medijan; $\bar{x}$ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon; min – minimum; max – maksimum; nm – nanometar

5.2.2 Usporedba kategorija patohistoloških dijagnoza

Na EM snimkama biopsija bubrega 33 ispitanika s postavljenom dijagnozom AS-a, 87 s dijagnozom TBMN-a (sa ili bez FSGS-a) i 10 s dijagnozom hereditarnog nefritisa, prethodno opisanom metodom (str. 23) izvršeno je ponovno mjerenje GBM-a te je određena točna, standardizirana debljina GBM-a za svaku biopsiju. Tako dobivene debljine GBM-a u bolesnika s dijagnozom TBMN-a i TBMN-a s FSGS-om (dijagnoze postavljene tijekom rutinskog dijagnostičkog rada) uspoređene su s urednim vrijednostima debljina GBM-a za naš Odjel dobivenim na početku ovog istraživanja (str. 33). Od 87 ispitanika s rutinski postavljenom dijagnozom TBMN-a (sa ili bez FSGS-a) kriterije za dijagnozu TBMN-a po novo utvrđenom referentnom rasponu za debljinu GBM-a našeg Odjela imalo je 47 ispitanika. Samo ti bolesnici su bili uključeni u daljnju analizu (slika 21).



Slika 21. Broj ispitanika po patohistološkim dijagnozama (PHD) koji su uključeni u daljnju analizu, nakon standardiziranog mjerenja GBM-a i usporedbe s referentnim vrijednostima Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava.

Uspoređeni su klinički podaci između pojedinih skupina ispitanika prema nalazu PHD-a: AS, TBMN, TBMN+FSGS i hereditarni nefritis (tablica 9).

Tablica 9. Usporedba pojedinih kliničkih podataka između skupina obzirom na PHD-e ([1]Fisher egzaktni test, [2]Kruskal-Wallis test, [3]ANOVA test).

		Patohistološka dijagnoza						
		Svi	AS	TBMN	TBMN + FSGS	Hereditarni nefritis	Vrijednost testa	P
Spol (Ž/M) N=90 (%)		58/32 (64,4/35,6)	18/15 (54,5/45,5)	24/11 (68,6/31,4)	7/5 (58,3/41,7)	9/1 (90,0/10,0)	4,672[1]	0,203
Dob kod biopsije (godine)	N	90	33	35	12	10	5,464[2]	0,141
	x̄ ± SD	41±15	37±16	44±14	45±16	43±16		
	C (IKR)	43 (32-52)	41 (29-45)	48 (38-52)	47 (33-60)	50 (32-54)		
Eritrociturija, N=84 (ne/da) (ne/da %)		2/82 (2,4/97,6)	1/30 (3,2/96,8)	0/32 (0/100,0)	0/11 (0/100,0)	1/9 (10,0/90,0)	3,442[1]	0,149
Proteinurija, N=84 (ne/da) (ne/da %)		24/60 (28,6/71,4)	3/28 (9,7/90,3)	18/14 (56,3/43,8)	1/10 (9,1/90,9)	2/8 (20,0/80,0)	**18,734[1]**	**<0,001**
24-satna proteinurija (g/dU)	N	90	33	35	12	10	**23,981[2]**	**<0,001**
	x̄ ± SD	1,85±2,93	2,09±1,97	0,69±1,07	5,49±5,88	0,74±0,62		
	C (IKR)	0,68 (0,14-2,30)	1,50 (0,38-3,30)	0,19 (0,05-0,80)	4,51 (0,88-8,00)	0,55 (0,35-1,41)		
Kreatinin u serumu (μmol/l)	N	90	33	35	12	10	6,348[2]	0,096
	x̄ ± SD	106,4±75,0	113,7±57,2	96,1±90,6	108,3±37,2	115,3±103,3		
	C (IKR)	84,0 (71,5-117,0)	99,5 (74,5-127,0)	82,5 (70,0-87,0)	110,0 (74,5-137,5)	78,0 (71,0-113,0)		
eGFR (ml/min/ 1,73m^2)	N	90	33	35	12	10	1,737[3]	0,166
	x̄ ± SD	78,9±29,7	75,0±34,0	87,4±23,0	68,1±25,0	75,0±37,0		
	C (IKR)	79,5 (63,4-99,5)	73,5 (49,9-92,4)	83,7 (70,0-103,0)	66,3 (43,6-87,6)	74,1 (48,0-107,0)		
Klinički sindrom, N=88 (APH/NS/KNS) (APH/NS/KNS %)		63/13/12 71,6/14,8/ 13,6	18/7/7 56,3/21,9/ 21,9	31/1/2 91,2/2,9/5,9	6/5/1 50,0/41,7/8,3	8/0/2 80,0/0/20,0	**17,647[1]**	**0,003**
Oštećenje sluha (ne/da) N=90, (ne/da %)		75/15 (83,3/16,7)	22/11 (66,7/33,3)	32/3 (91,4/8,6)	12/0 (100,0/0)	9/1 (90,0/10,0)	**9,455[1]**	**0,015**
Oštećenje oka/vida N=90, (ne/da) (ne/da %)		89/1 98,9/1,1	32/1 97,0/3,0	35/0 100,0/0	12/0 100,0/0	10/0 100,0/0	2,686[1]	0,611
Poremećaji iz spektra AS u obitelji (ne/da) N=82, (ne/da %)		71/11 (86,6/13,4)	26/6 (81,3/18,8)	30/0 (100,0/0)	9/1 (90,0/10,0)	6/4 (60,0/40,0)	**11,687[1]**	**0,004**
Nasljeđivanje iz anamneze, N=81 (nepoznato/majka/otac) (nepoznato/majka/otac %)		66/11/5 (80,5/13,4/ 6,1)	23/6/3 (71,9/18,8/ 9,4)	27/2/1 (90,0/6,7/ 3,3)	10/0/0 (100,0/0/0)	6/3/1 (60,0/30,0/ 10,0)	7,774[1]	0,174
Eritrociturija u obitelji N=82, (ne/da) (ne/da %)		62/20 (75,6/24,4)	21/11 (65,6/34,4)	25/5 (83,3/16,7)	9/1 (90,0/10,0)	7/3 (70,0/30,0)	3,772[1]	0,304
KBB u obitelji N=81, (ne/da) (ne/da %)		51/30 (63,0/37,0)	22/10 (68,8/31,3)	18/11 (62,1/37,9)	8/2 (80,0/20,0)	3/7 (30,0/70,0)	5,938[1]	0,105

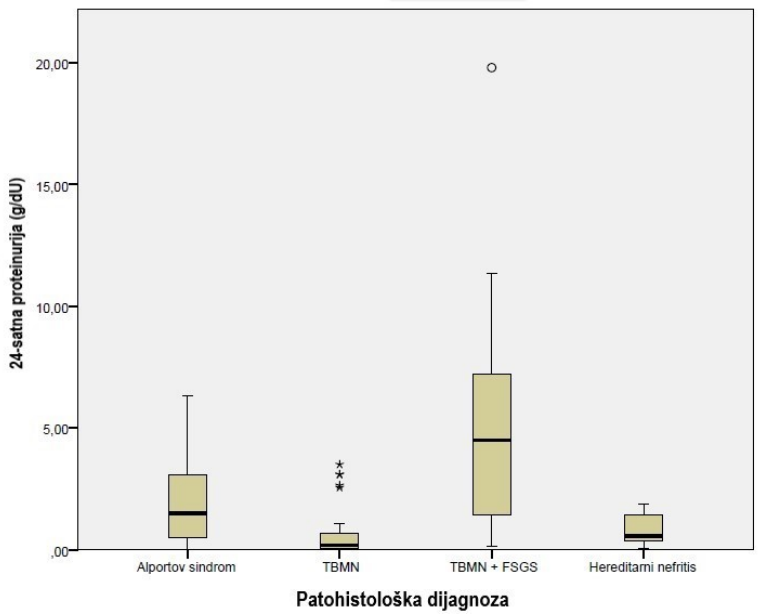
N – broj ispitanika; C – medijan; x̄ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon; APH – asimptomatska proteinurija i/ili eritrociturija, NS – nefrotski sindrom, KNS – kronični nefritički sindrom, KBB – kronična bubrežna bolest; AS – Alportov sindrom; TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza

Nije bilo statistički značajne razlike između pojedinih skupina PHD-a obzirom na spol, dob, prisustvo eritrociturije, razinu serumskog kreatinina, eGFR, poremećaje oka, te podatke o eritrociturij ili kroničnoj bubrežnoj bolesti u obitelji. Postojala je značajna razlika između skupina ispitanika obzirom na prisustvo i razinu proteinurije, kliničku sliku kojom se bubrežna bolest manifestirala, oštećenje sluha i podatke o prisustvu AS-a, TBMN-a i hereditarnog nefritisa u obitelji (tablica 9). Posthoc analiza Mann-Whitney U testom za pojedine kontinuirane varijable značajne u Kruskal-Wallisovom testu iz tablice 9. pokazala je značajnost za 24-satnu proteinuriju između svih skupina bolesnika obzirom na PHD-e, osim između skupina TBMN-a i hereditarnog nefritisa (tablica 10 i slika 22). Najviša razina proteinurije (C 4,51 g/24h) bila je u kategoriji TBMN + FSGS, potom u kategoriji AS-a (C 1,5 g/24h), te hereditarnog nefritisa (C 0,55 g/24h) i TBMN-a (C 0,19 g/24h).

Tablica 10. Razlike u proteinuriji između skupina obzirom na PHD-e. Posthoc analiza Mann-Whitney U testom za kontinuirane varijable iz tablice 9. značajne u Kruskal-Wallisovom testu.

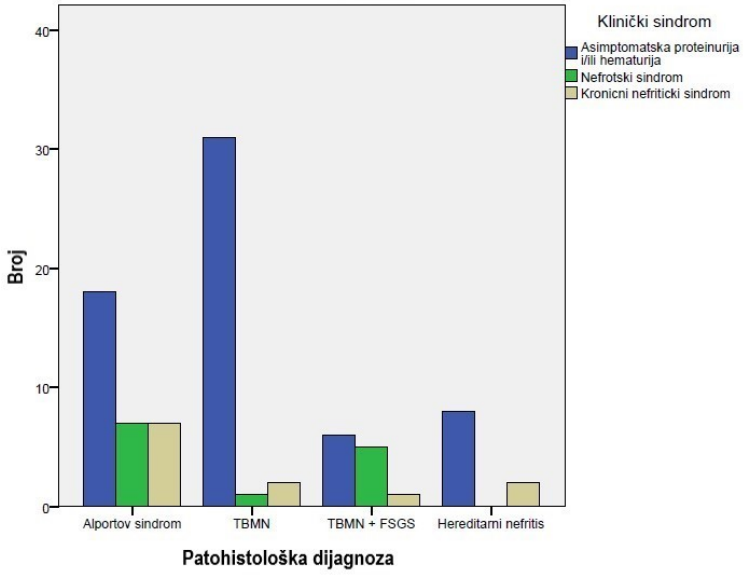
Varijabla	Skupine među kojima je nađena značajna razlika u Mann-Whitney U testu - posthoc	Vrijednost testa	P
24-satna proteinurija (g/dU)	AS vs. TBMN	214,5	**<0,001**
	AS vs. TBMN + FSGS	96,5	**0,033**
	AS vs. Hereditarni nefritis	88,0	**0,042**
	TBMN vs. TBMN + FSGS	44,0	**<0,001**
	TBMN + FSGS vs. Hereditarni nefritis	18,0	**0,008**

AS – Alportov sindrom; TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza



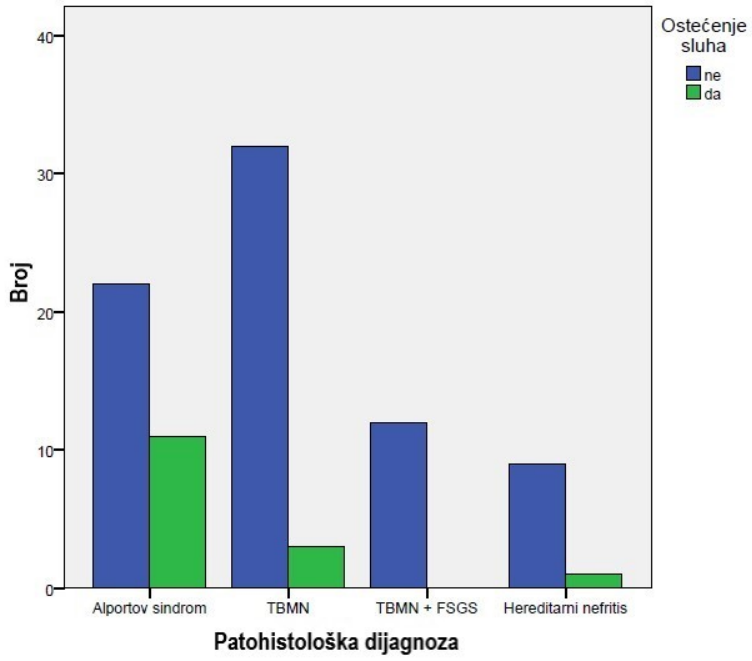
Slika 22. Razine 24-satne proteinurije (g/dU) po skupinama obzirom na PHD-e. Statistička značajnost (p) između pojedinih skupina prikazana je u tablici 10.

Na slici 23. prikazana je učestalost kliničkih sindroma po PHD-ovima. Svi su se poremećaji najčešće prezentirali asimptomatskom hematurijom i/ili proteinurijom.



Slika 23. Klinički sindromi po skupinama obzirom na PHD-e.

Oštećenja sluha su zabilježena kod 11 ispitanika s AS-om, 3 ispitanika s TBMN-om i jednog ispitanika s hereditarnim nefritisom (slika 24).



Slika 24. Oštećenje sluha po skupinama obzirom na PHD-e.

Nisu nađene statistički značajne razlike u komorbiditetima između pojedinih skupina ispitanika obzirom na PHD-e (tablica 11).

Tablica 11. Usporedba podataka o komorbiditetima po skupinama obzirom na PHD-e ([1]Fisherov egzaktni test).

	Svi N (%)	AS N (%)	TBMN N (%)	TBMN+FSGS N (%)	Hereditarni nefritis N (%)	Vrijednost testa[1]	P
Hipertenzija (ne/da, prije biopsije/ da, poslije biopsije)	33/48/5 (38,4/55,8/ 5,8)	11/20/2 (33,3/60,6/ 6,1)	15/15/2 (46,9/46,9/ 6,3)	5/6/0 (45,5/54,5/0)	2/7/1 (20,0/70,0/ 10,0)	3,901	0,677
Šećerna bolest (ne/da, prije biopsije/ da, poslije biopsije)	82/3/1 (95,3/3,5/1,2)	31/2/0 (93,9/6,1/0)	31/1/0 (96,9/3,1/0)	10/0/1 (90,9/0/9,1)	10/0/0 (100,0/0/0)	5,773	0,593
Plućna bolest (ne/da, prije biopsije/ da, poslije biopsije)	80/6/0 (93,0/7,0/0)	31/2/0 (93,9/6,1/0)	30/2/0 (93,8/6,3/0)	10/1/0 (90,9/9,1/0)	9/1/0 (90,0/10,0/0)	1,068	0,937
Srčana bolest (ne/da, prije biopsije/ da, poslije biopsije)	82/2/2 (95,3/2,3/2,3)	32/0/1 (97,0/0/3,0)	30/2/0 (93,8/6,3/0)	10/0/1 (90,9/0/9,1)	10/0/0 (100,0/0/0)	5,785	0,433
Cerebrovaskularna bolest (ne/da, prije biopsije/ da, poslije biopsije)	86/0/0 (100,0/0/0)	33/0/0 (100,0/0/0)	32/0/0 (100,0/0/0)	11/0/0 (100,0/0/0)	10/0/0 (100,0/0/0)	-	-
Periferna vaskularna bolest (ne/da, prije biopsije/ da, poslije biopsije)	82/1/0 (98,8/1,2/0)	33/0/0 (100,0/0/0)	28/1/0 (96,6/3,4/0)	11/0/0 (100,0/0/0)	10/0/0 (100,0/0/0)	2,737	0,602

Između skupina ispitanika po PHD-u nije bilo statistički značajne razlike u broju glomerula, postotku potpuno vezivno promijenjenih glomerula, prisustvu upale u intersticiju, arteriolosklerozi i fibrointimalnom zadebljanju arterija. Pronađene su statistički značajne razlike između skupina ispitanika u apsolutnom broju potpuno vezivno promijenjenih glomerula, apsolutnom broju glomerula sa segmentalnom sklerozom, udjelu glomerula sa segmentalnom sklerozom (%), prisustvu pjenušavih stanica u intersticiju te udjelu (%) i stupnju IFTA-e (tablica 12).

Tablica 12 . Usporedba svjetlosno-mikroskopskih parametara između skupina obzirom na PHD-e ([1]Kruskal-Wallisov test, [2]Fisherov egzaktni test).

		Patohistološka dijagnoza					Vrijednost testa	p
		Svi	AS	TBMN	TBMN + FSGS	Hereditarni nefritis		
Broj glomerula	N	90	33	35	12	10	2,831[1]	0,418
	x̄ ± SD	18±9	17±10	19±8	16±10	22±10		
	C (IKR)	18 (11-22)	18 (11-21)	19 (12-24)	16 (7-23)	18 (14-31)		
Broj PVP glomerula	N	90	33	35	12	10	8,139[1]	0,043
	x̄ ± SD	3±3	3±4	2±1	2±2	4±3		
	C (IKR)	2 (1-4)	3 (1-4)	2 (0-2)	1 (1-3)	4 (1-5)		
Broj glomerula sa SS	N	90	33	35	12	10	44,129[1]	<0,001
	x̄ ± SD	1±2	2±2	0±0	2±2	1±1		
	C (IKR)	0 (0-2)	2 (0-3)	0 (0-0)	2 (1-3)	1 (0-2)		
Udio PVP glomerula (%)	N	90	33	35	12	10	6,933[1]	0,074
	x̄ ± SD	16±17	21±20	9±8	15±16	21±20		
	C (IKR)	11 (5-20)	17 (6-30)	10 (0-14)	11 (6-17)	14 (8-29)		
Udio glomerula sa SS (%)	N	90	33	35	12	10	47,189[1]	<0,001
	x̄ ± SD	8±12	14±14	0±0	20±14	4±5		
	C (IKR)	0 (0-16)	16 (0-21)	0 (0-0)	18 (9-24)	2 (0-8)		
Pjenušave stanice u intersticiju; (ne/da) (%)		80/10 (88,9/11,1)	25/8 (75,8/24,2)	35/0 (100,0/0)	12/0 (100,0/0)	8/2 (80,0/20,0)	12,336[2]	0,002
Udio IFTA-e (%)	N	90	33	35	12	10	11,536[1]	0,009
	x̄ ± SD	13,28±15,92	19,55±20,05	5,57±5,25	13,33±11,15	19,50±20,06		
	C (IKR)	10 (0-20)	15 (0-30)	5 (0-10)	10 (7,5-15)	12,5 (5-30)		
IFTA stupanj (<25 / 25-50 / >50%) (%)		72/15/3 (80,0/16,7/ 3,3)	20/11/2 (60,6/33,3/ 6,1)	35/0/0 (100,0/0/0)	10/2/0 (83,3/16,7/ 0)	7/2/1 (70,0/20,0/ 10,0)	20,310[2]	<0,001
Intersticijska upala (ne/da) (%)		67/23 (74,4/25,6)	22/11 (66,7/33,3)	31/4 (88,6/11,4)	8/4 (66,7/33,3)	6/4 (60,0/40,0)	6,746[2]	0,075
Arterioloskleroza (nema / nodularna hijalinoza u 1 arterioli / nodularna hijalinoza u više arteriola / hijalinoza u cijelom opsegu) (%)		39/8/31/12 (43,3/8,9/ 34,4/13,3)	15/3/9/6 (45,5/9,1/ 27,3/18,2)	17/4/14/0 (48,6/11,4/ 40,0/0)	4/1/4/3 (33,3/8,3/ 33,3/25,0)	3/0/4/3 (30,0/0/40,0 /30,0)	13,273[2]	0,106
Fibrointimalno zadebljanje arterija (ne/da) (%)		60/30 (66,7/33,3)	22/11 (66,7/33,3)	23/12 (65,7/34,3)	9/3 (75,0/25,0)	6/4 (60,0/40,0)	0,664[2]	0,902
Suženje lumena arterija (nema / <=25 / 26-50 / >50%) (%)		60/15/10/5 (66,7/16,7/ 11,1/5,6)	22/7/3/1 (66,7/21,2/ 9,1/3,0)	23/7/5/0 (65,7/20,0/ 14,3/0)	9/0/2/1 (75,0/0/16,7 /8,3)	6/1/0/3 (60,0/10,0/ 0/30,0)	13,344[2]	0,081

PVP – potpuno vezivno promijenjen; SS – segmentalna skleroza; IFTA – intersticijska fibroza i tubularna atrofija; C – medijan; x̄ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon

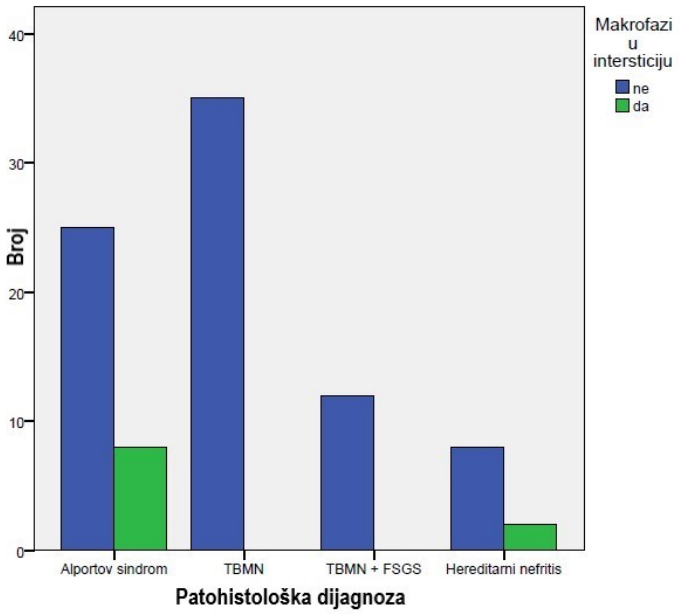
Posthoc analiza Mann-Whitney U testom za pojedine kontinuirane varijable iz tablice 12 značajne u Kruskal-Wallisovom testu pokazala je statističku značajnost između pojedinih skupina PHD-a, što je prikazano u tablici 13. Pronađena je značajna razlika u broju potpuno vezivno promijenjenih glomerula između AS-a i TBMN-a te TBMN-a i hereditarnog nefritisa. Segmentalne skleroze u gromelurima je bilo više u AS-u nego u TBMN-u i više u hereditarnom nefritisu nego u TBMN-u. Međutim, ukoliko je TBMN udružena s FSGS-om tada je segmentalne skleroze bilo više u ovoj skupini nego u hereditarnom nefritisu. Bilo je značajno više IFTA-e u AS-u, hereditarnom nefritisu i TBMN udruženom s FSGS-om nego samo u TBMN-u. Navedene razlike nisu nađene između skupina AS-a i hereditarnog nefritisa.

Tablica 13. Razlike u svjetlosno-mikroskopskim parametrima između pojedinih skupina obzirom na PHD-e. Posthoc analiza Mann-Whitney U test za kontinuirane varijable značajne u Kruskal-Wallisovom testu (prikazano u tablici 12).

Varijabla	Skupine među kojima je nađena značajna razlika u Mann-Whitney U testu - posthoc	Vrijednost testa	P
Broj PVP glomerula	AS vs. TBMN	409,5	0,036
	TBMN vs. Hereditarni nefritis	88,5	0,016
Broj glomerula sa SS	AS vs. TBMN	192,5	<0,001
	TBMN vs. Hereditarni nefritis	87,5	0,015
	TBMN + FSGS vs. Hereditarni nefritis	27,0	0,03
Udio glomerula sa SS (%)	AS vs. TBMN	192,5	<0,001
	TBMN vs. TBMN+FSGS	630,0	<0,001
	TBMN vs. Hereditarni nefritis	87,5	0,015
	TBMN + FSGS vs. Hereditarni nefritis	12,5	0,001
IFTA (%)	AS vs. TBMN	383,0	0,014
	TBMN vs. TBMN+FSGS	101,0	0,006
	TBMN vs. Hereditarni nefritis	81,5	0,009

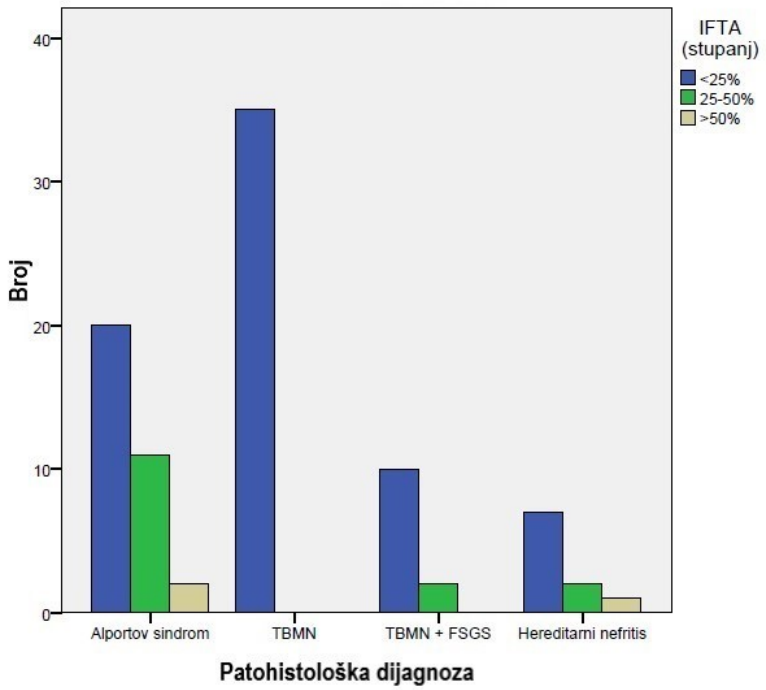
PVP – potpuno vezivno promjenjen; SS – segmentalna skleroza; IFTA – intersticijska fibroza i tubularna atrofija; AS – Alportov sindrom; TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza

Na slici 25. prikazano je prisustvo pjenušavih stanica (makrofaga) po pojedinim patohistološkim skupinama. Pjenušave stanice su nađene u AS-u (8; 24,2 %) i hereditarnom nefritisu (2; 20 %), a nisu nađene u ispitanika s TBMN-om.

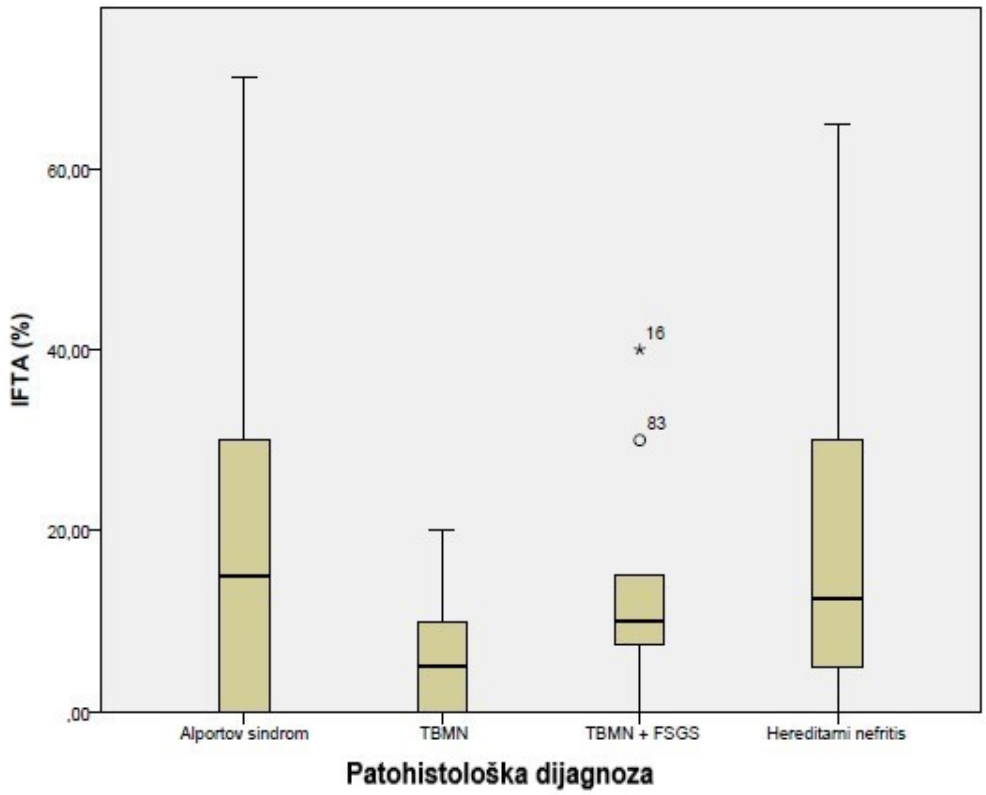


Slika 25. Prisustvo pjenušavih stanica u intersticiju po skupinama obzirom na PHD-e.

Na slici 26. prikazan je raspored stupnjeva IFTA-e prema patohistološkim dijagnozama, dok je prikaz udjela (%) IFTA-e prikazan na slici 27.



Slika 26. Raspored stupnjeva IFTA-e po skupinama obzirom na PHD-e.



Slika 27. Udio IFTA-e po skupinama obzirom na PHD-e. Statistička značajnost (p) između pojedinih skupina prikazana je u tablici 13.

U tablici 14. prikazana je usporedba pojedinih EM parametara između ispitivanih skupina obzirom na PHD-e. Nađene su statistički značajne razlike između pojedinih skupina ispitanika za aritmetičku sredinu debljine GBM-a (GBM-x̄), minimalnu debljinu GBM-a (GBM–min), maksimalnu debljinu GBM-a (GBM–max), standardnu devijaciju debljine GBM-a (GBM–SD) te stupanj lameliranja GBM-a i izmjene tankih i debelih dijelova GBM-a.

Tablica 14. Usporedba EM parametara između skupina ispitanika obzirom na PHD-e ([1]Kruskal-Wallisov test, [2]Fisherov egzaktni test).

		Patohistološka dijagnoza					Vrijednost testa	P
		Svi	AS	TBMN	TBMN + FSGS	Hereditarni nefritis		
GBM-x̄ (nm)	N	90	33	35	12	10	35,795[1]	<0,001
	x̄ ± SD	229,61 ± 61,55	274,23 ± 74,20	194,23 ± 28,20	208,42 ± 23,18	240,60 ± 46,34		
	C (IKR)	211,00 (193,50-254,50)	261,00 (221,00-304,00)	197,00 (182,00-210,00)	210,00 (204,00-213,50)	229,50 (224,00-255,00)		
GBM-min (nm)	N	90	33	35	12	10	11,108[1]	0,011
	x̄ ± SD	129,49 ± 35,23	145,55 ± 40,71	115,57 ± 25,58	125,33 ± 29,19	133,40 ± 35,78		
	C (IKR)	126,00 (108,00-143,00)	135,00 (122,00-177,00)	120,00 (95,00-133,00)	137,00 (109,50-143,00)	122,00 (108,00-155,00)		
GBM-max (nm)	N	90	33	35	12	10	40,855[1]	<0,001
	x̄ ± SD	408,17 ± 180,13	523,10 ± 218,51	310,26 ± 57,15	315,92 ± 38,23	505,30 ± 189,08		
	C (IKR)	352,00 (299,50-446,50)	454,00 (385,00-637,00)	305,00 (288,00-351,00)	310,50 (290,00-334,00)	485,00 (383,00-510,00)		
GBM-SD (nm)	N	90	33	35	12	10	36,752[1]	<0,001
	x̄ ± SD	65,20 ± 39,42	90,61 ± 52,03	45,83 ± 11,78	45,33 ± 9,97	78,10 ± 30,90		
	C (IKR)	54,00 (42,00-74,50)	77,00 (55,00-108,00)	44,00 (37,00-54,00)	44,00 (37,00-49,50)	70,50 (58,00-92,00)		
Lameliranje GBM (ne/oskudno, mjestimice/da) (%)		47/13/29 (52,8/14,6/32,6)	2/3/28 (6,1/9,1/84,8)	32/2/0 (94,1/5,9/0)	10/2/0 (83,3/16,7/0)	3/6/1 (30,0/60,0/10,0)	87,596[2]	<0,001
Izmjena tankih i debelih dijelova GBM (ne/da) (%)		48/42 (53,3/46,7)	1/32 (3,0/97,0)	34/1 (97,1/2,9)	11/1 (91,7/8,3)	2/8 (20,0/80,0)	84,046[2]	<0,001

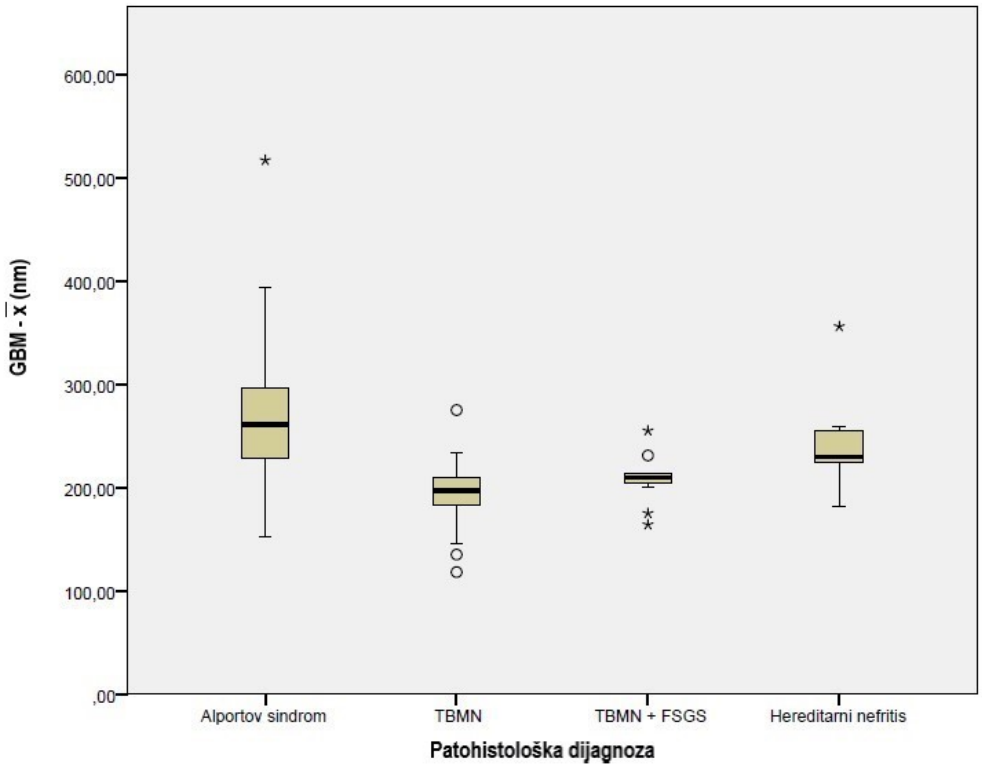
GBM – glomerularna bazalna mebrana; C – medijan; x̄ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon; min – minimum; max – maksimum

Posthoc analiza Mann-Whitney U testom za pojedine kontinuirane varijable iz tablice 14 značajne u Kruskal-Wallisovom testu pokazala je statističku značajnost između pojedinih skupina dijagnoza, što je prikazano u tablici 15. Najveća GBM-x̄ bila je u AS-u i značajno je veća nego u TBMN-u ili TBMN-u udruženom s FSGS-om. Slijedi hereditarni nefritis čija GBM-x̄ je također bila veća od GBM-x̄ u TBMN-u kao i TBMN-u udruženom s FSGS-om (slika 28). Isto je vrijedilo za GBM–SD između ispitivanih skupina (slika 28). Nije nađena značajna razlika obzirom na GBM-x̄ i GBM-SD između AS-a i hereditarnog nefritisa.

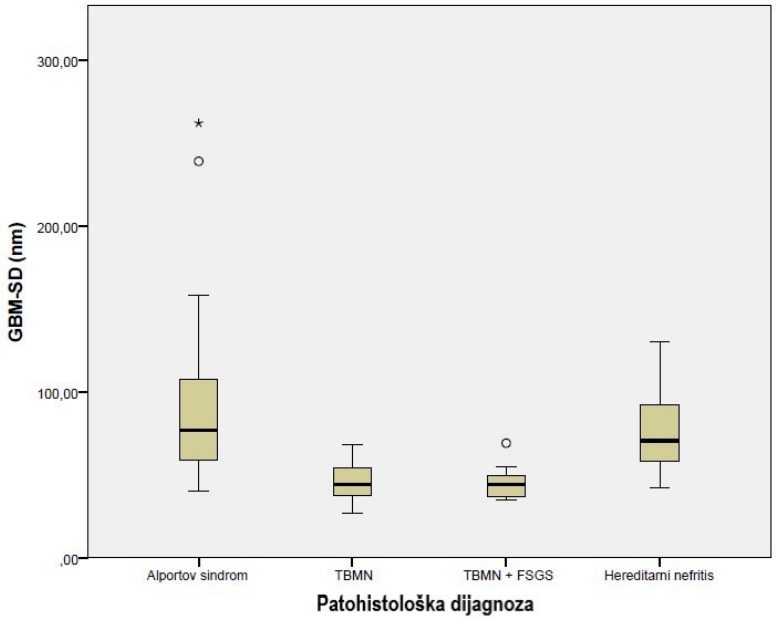
Tablica 15. Posthoc analiza Mann-Whitney U test za EM kontinuirane varijable značajne u Kruskal-Wallisovom testu (prikazano u tablici 14).

Varijabla	Skupine među kojima je nađena značajna razlika u Mann-Whitney U testu - posthoc	Vrijednost testa	P
GBM- $\bar{x}$ (nm)	AS vs. TBMN	131,5	<0,001
	AS vs. TBMN + FSGS	65,5	0,001
	TBMN vs. Hereditarni nefritis	50,0	<0,001
	TBMN + FSGS vs. Hereditarni nefritis	27,5	0,03
GBM-min (nm)	AS vs. TBMN	292,0	0,001
GBM-max (nm)	AS vs. TBMN	113,5	<0,001
	AS vs. TBMN+FSGS	36,0	<0,001
	TBMN vs. Hereditarni nefritis	40,0	<0,001
	TBMN + FSGS vs. Hereditarni nefritis	10,0	<0,001
GBM-SD (nm)	AS vs. TBMN	140,0	<0,001
	AS vs. TBMN+FSGS	39,0	<0,001
	TBMN vs. Hereditarni nefritis	47,0	<0,001
	TBMN + FSGS vs. Hereditarni nefritis	14,5	0,002

GBM – glomerularna bazalna mebrana; $\bar{x}$ - aritmetička sredina; SD - standardna devijacija; AS - Alportov sindrom; TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FSGS – fokalna segmentalna glomeruloskleroza

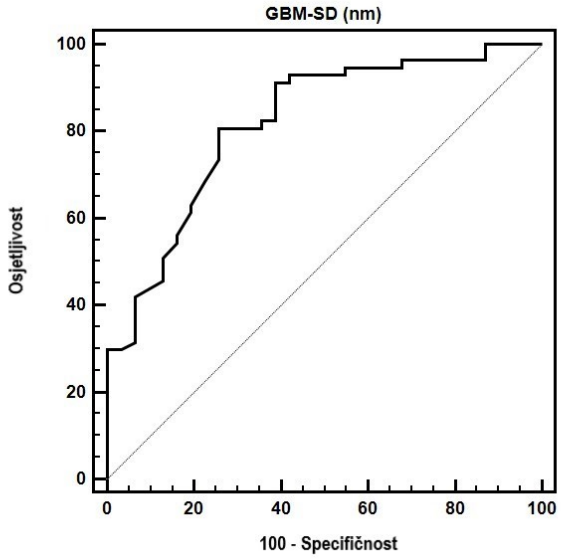


Slika 28. Raspodjela srednje vrijednosti debljina GBM po skupinama obzirom na PHD-e. Statistička značajnost (p) između pojedinih skupina prikazana je u tablici 15.



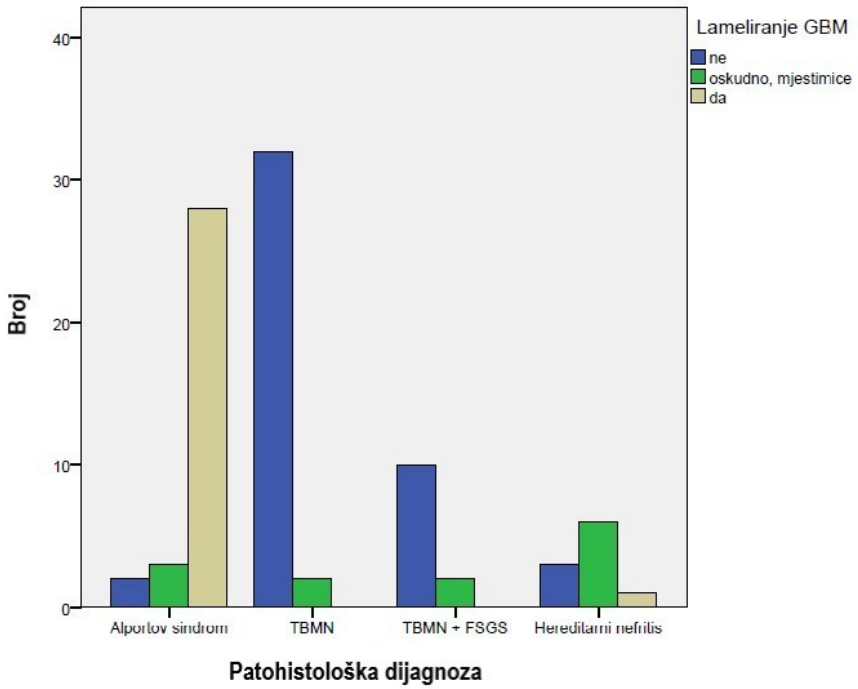
Slika 29. Raspodjela SD debljina GBM-a po skupinama obzirom na PHD-e. Statistička značajnost (p) između pojedinih skupina prikazana je u tablici 15.

S ciljem da utvrdimo može li se visina standardne devijacije GBM-a (GBM-SD) koristiti kao kriterij u postavljanju dijagnoze AS, dodatno je učinjena AUROC analiza (površina ispod krivulje osjetljivosti i specifičnosti) za AS za GBM-SD. AUROC = 0,820, uz standardnu grešku (95 %tni interval pouzdanosti) = 0,0472 (0,724-0,894), p < 0,0001. Određena je najbolja vrijednost razabiranja GBM-SD za AS više od 61 nm s osjetljivošću od 80,7 %, specifičnošću od 74,19 % (slika 30).



Slika 30. AUROC analiza za AS za GBM-SD.

Pored debljine GBM-a, kao kriterij razlikovanja između pojedinih skupina PHD-a pokazalo se značajnim i njeno lameliranje (p = < 0,001; tablica 14). Jasno lameliranje GBM-a je prisutno u većine ispitanika s AS-om. Također je prisutno u većine ispitanika s hereditarnim nefritisom, ali je manje izraženo. Lameliranje GBM-a nije nađeno u ispitanika s TBMN-u niti onih s TBMN-om udruženim s FSGS-om (slika 31).

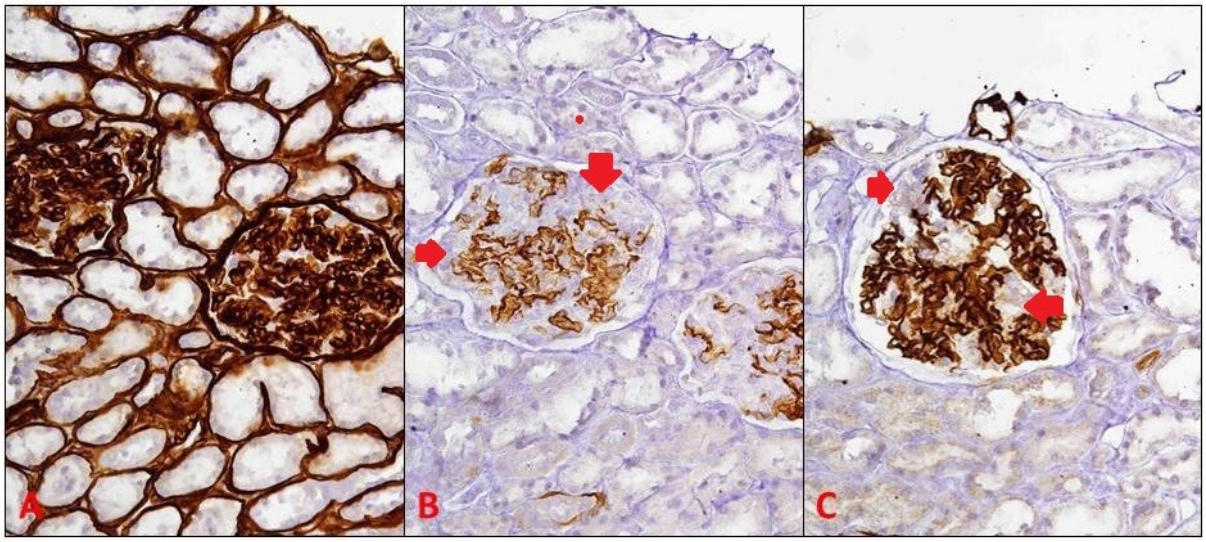


Slika 31. Učestalost lameliranja GBM-a po skupinama obzirom na PHD-e.

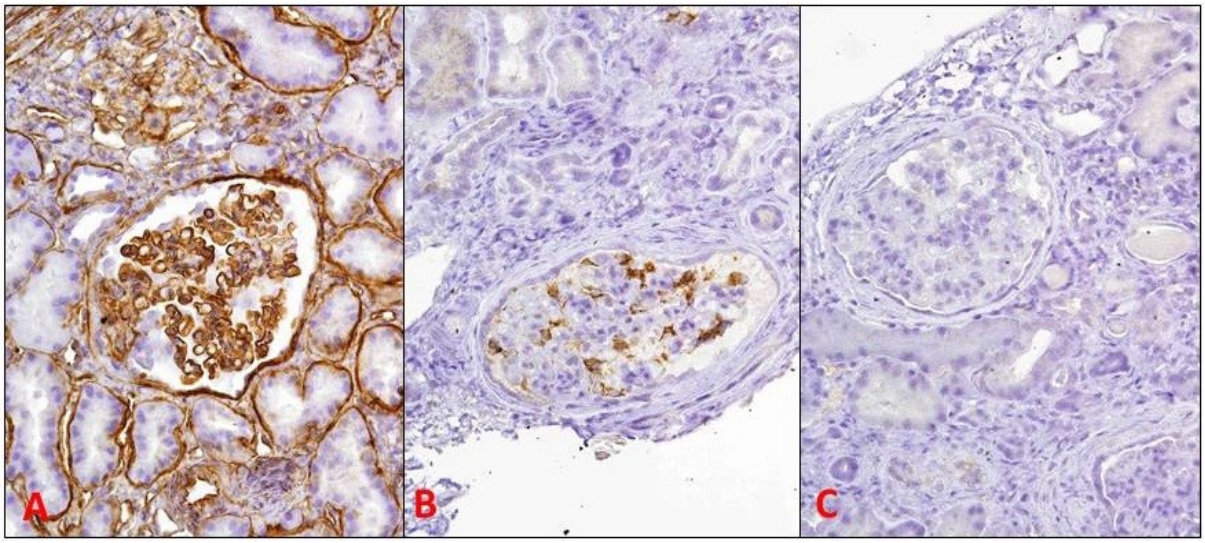
5.2.3 Imunohistokemijsko bojenje na α3, α4 i α5 lance kolagena tipa IV

Za imunohistokemijsku analizu bilo je dostupno tkivo bubrega 90 od ukupno 130 ispitanika. Na temelju imunohistokemijske analize četiri ispitanice su klasificirane u skupinu 1 (nositeljice X-vezanog AS-a, slika 32), dvojica ispitanika su klasificirani kao skupina 2 (muškarci s X-vezanim AS-om, slika 33), 76 ispitanika u skupinu 4 (uredno bojenje – TBMN, slika 34). Kod troje ispitanika nađen je atipičan obrazac imunohistokemijskog bojenja (uredno bojenje za α3 i α4 lance kolagena tipa IV, a negativno bojenje u glomerularnom klupku s pozitivnim bojenjem u Bowmanovoj čahuri za α5 lance kolagena tipa IV, slika 35). Jedan ispitanik s histološkom dijagnozom TBMN-a klasificiran je u skupinu atipičnog imunohistokemijskog bojenja

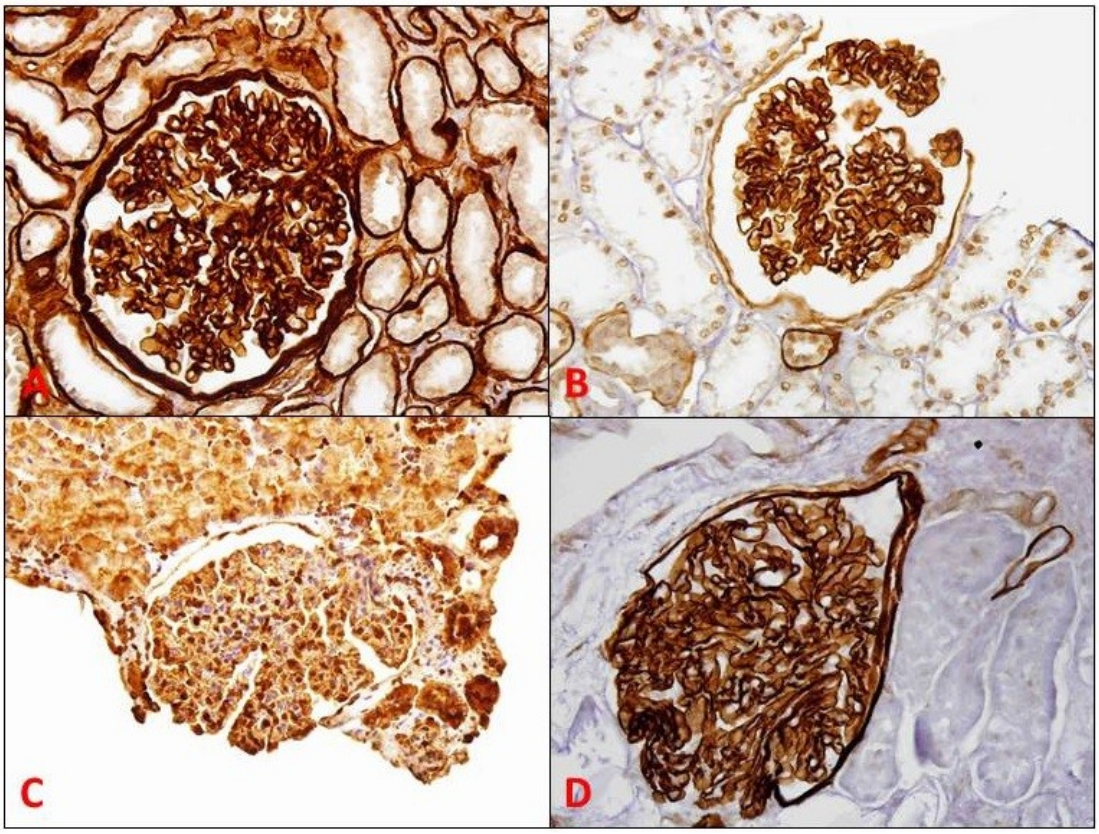
na lance kolagena tipa IV. Imunohistokemijsko bojenje na α4 (slika 34. C) lance davalo je izrazito pozitivno pozadinsko bojenje, te je klasifikacija i subtipizacija učinjena na razini analize α3 i α5 lanaca kolagena tipa IV.



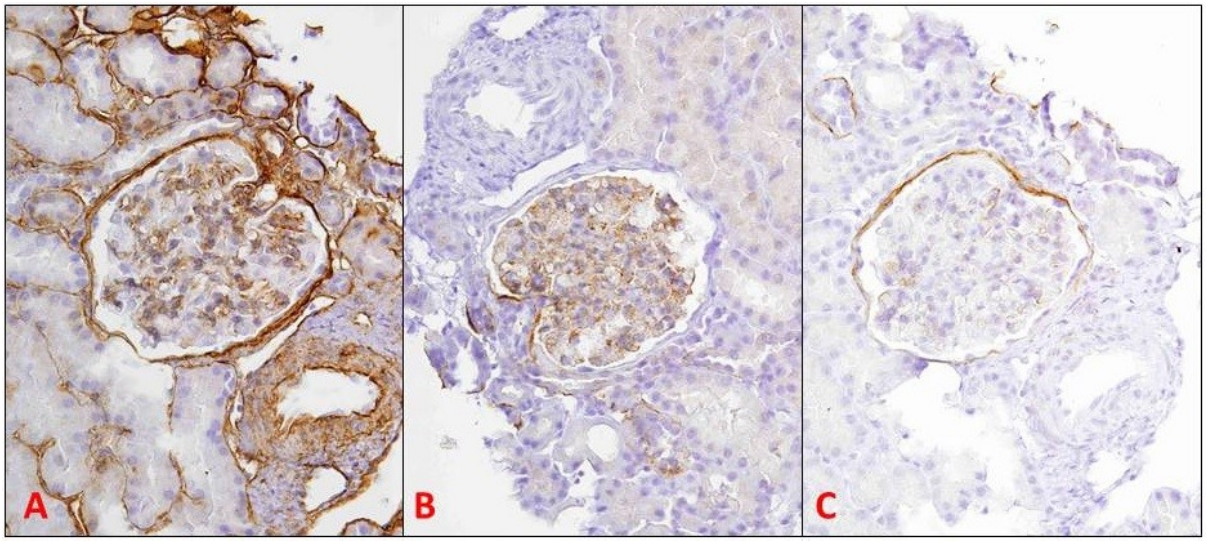
Slika 32. Imunohistokemijsko bojenje na lance kolagena tipa IV u ženske nositeljice X-vezanog AS. A) COL4A1, pozitivna kontrola. Segmentalni gubitak bojenja (strelice) za COL4A3 (B) i COL4A5 (C). Originalno povećanje 400 x.



Slika 33. Imunohistokemijsko bojenje na lance kolagena tipa IV u muškog ispitanika s X-vezanim AS. A) COL4A1, pozitivna kontrola, B) Nespecifično nakupljanje bojenja u podocitima, no negativno bojenje za COL4A3 u GBM-u i tubularnim bazalnim membranama C) Negativno bojenje za COL4A5. Originalno povećanje 400 x.



Slika 34. Imunohistokemijsko bojenje na lance kolagena tipa IV u ispitanika s TBMN-om. Uredni obrasci bojenja. A) COL4A1, B) COL4A3, C) COL4A4, D) COL4A5. Originalno povećanje 400 x.



Slika 35. Atipični obrazac imunohistokemijskog bojenja na lance kolagena tipa IV. A) COL4A1, pozitivna kontrola. B) Uredno bojenje za COL4A3. C) Negativno bojenje u glomerularnom klupku, a pozitivno u Bowmanovoj čahuri za COL4A5. Originalno povećanje 400 x.

Raspodjela pojedinih obrazaca imunohistokemijskog bojenja po PHD-u prikazana je u tablici 16. Vidljivo je da je visoki udio ispitanika kojima je postavljena histološka dijagnoza AS-a imao uredan obrazac bojenja za lance kolagena tipa IV, njih 24 (72,7%) od 33 ispitanika. Kod TBMN-a je dobiven očekivani imunohistokemijski obrazac za kolagene lance tipa IV, njih 91,4 % imalo je uredno bojenje na lance kolagena tipa IV.

Tablica 16. Raspodjela pojedinih obrazaca imunohistokemijskog bojenja po skupinama obzirom na PHD-e (Fisherov egzaktni test).

	Ukupno N (%)	AS N (%)	TBMN N (%)	TBMN+FSGS N (%)	Heritarni nefritis N (%)	Vrijednost testa	P
X vezane ženske nositeljice/ Muški X-vezani AS/ Autosomno recesivni AS/ uredno bojenje-TBMN/ atipično bojenje/ neadekvatno za analizu	4/2/0/76/3/5 (4,4/2,2/0/ 84,4/3,3/5,6)	2/2/0/24/2/3 (6,1/6,1/0/ 72,7/6,1/9,1)	0/0/0/32/1/2 (0/0/0/91,4/ 2,9/5,7)	0/0/0/12/0/0 (0/0/0/100/0/ 0)	2/0/0/8/0/0 (20,0/0/0/80,0/0/ 0)	11,511	0,319

AS – Alportov sindrom; TBMN – nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana

Učinjena je analiza osjetljivosti imunohistokemijske metode u subtipiziranju AS-a u odnosu na EM, čiji su rezultati prikazani u tablici 17.

Tablica 17. Dijagnostička osjetljivost i specifičnost za imunohistokemijsko bojenje na lance kolagena tipa IV.

	Vrijednost	95 % CI
Osjetljivost	20 %	7,71 - 38,57 %
Specifičnost	97,78 %	88,23 - 99,94 %
Pozitivni omjer vjerojatnosti	9,00	1,14 – 71,04
Negativni omjer vjerojatnosti	0,82	0,68 – 0,98

CI – interval pouzdanosti

5.3 Ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama transplantiranih bubrega

U dio istraživanja tkiva bubrega dobivenog biopsijama transplantiranih bubrega uključeno je 90 ispitanika, medijana dobi 49 godina (od 17 do 73 godine), 62 (68,9 %) muška i 28 (31,1 %) ženskih ispitanika.

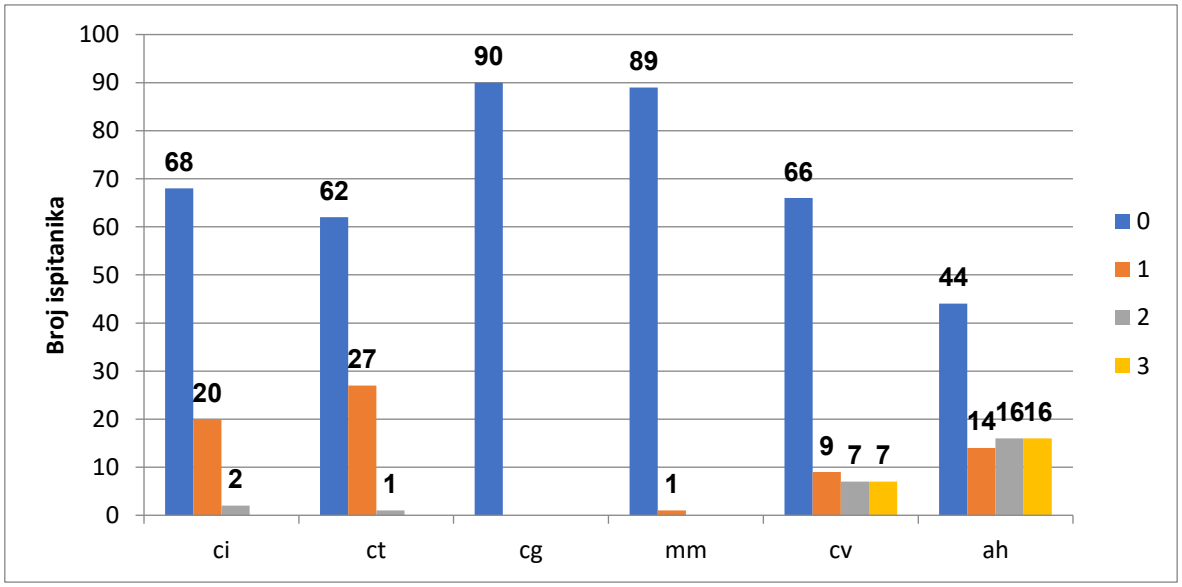
Opće karakteristike uključenih ispitanika s transplantiranim bubregom prikazane su u tablici 18.

Tablica 18. Opće karakteristike uključenih ispitanika s transplantiranim bubregom.

Spol primatelja	Broj bolesnika (%)	90 (100,0)
	Muškarci (%)	62 (68,9)
	Žene (%)	28 (31,1)
Dob primatelja (godine)	Broj bolesnika	90
	$\bar{x}$ ±SD	48±12
	C (IKR)	49 (40-58)
	Najmanja vrijednost	17
	Najveća vrijednost	73
Šećerna bolest u primatelja	Broj bolesnika (%)	90 (100,0)
	Ne (%)	62 (68,9)
	Da (%)	28 (31,1)
Vrsta transplantacije	Broj bolesnika (%)	90 (100,0)
	Bubreg (%)	77 (85,6)
	SPKT (%)	13 (14,4)
Darivatelj	Broj bolesnika (%)	90 (100,0)
	Živi darivatelj (%)	8 (8,9)
	Kadaverični darivatelj (%)	82 (91,1)
Dob darivatelja (godine)	Broj bolesnika	90
	$\bar{x}$ ±SD	46±16
	C (IKR)	50 (35-57)
	Najmanja vrijednost	8
	Najveća vrijednost	75
Spol darivatelja	Broj bolesnika (%)	90 (100,0)
	Muškarci (%)	46 (51,1)
	Žene (%)	44 (48,9)
Odgođena funkcija presatka	Broj bolesnika (%)	90 (100,0)
	Ne (%)	52 (57,8)
	Da (%)	38 (42,2)

C – medijan; $\bar{x}$ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon; SPKT – simultana transplantacija bubrega i gušterače

Na slici 36 prikazan je pregled stupnja kroničnih promjena prema Banff klasifikaciji[121] na nultim biopsijama bubrežnih presadaka. Većina ispitanika u svim kategorijama nije imala promjena, odnosno imali su uredan nalaz. Najviše ispitanika (68; 75,6 %) nije imalo intersticijsku fibrozu (ci0), a samo 2 (2,2 %) je imalo tešku intersticijsku fibrozu (ci3). Slično je bilo i s tubularnom atrofijom koja nije nađena (ct0) u 62 (68,9 %) ispitanika. Ostali su uglavnom imali umjerenu (ct2), a samo 1 (1,1 %) ispitanik je imao tešku tubularnu atrofiju (ct3). Glomeruli su bili uredni u najvećem dijelu ispitanika, a samo 1 je imao blago proširenje mezangija (mm1). Najviše ispitanika, 66 (74,1 %), je imalo uredne arterije (cv0), dok ih je po 7 (7,9 %) imalo umjereno (cv2) i znatno (cv3) fibrointimalno zadebljanje arterija. U jednom uzorku (1,1 %) nije bilo arterija dostupnih za analizu. Najviše ispitanika (46; 51,1 %) imalo je kronične promjene na arteriolama (hijalinozu), pri čemu je umjerena (ah2) ili teška hijalinoza arteriola nađena u 32 ispitanika (35,6 %).



Slika 36. Kronične promjene prema Banff klasifikaciji[121] na nultim biopsijama bubrežnih presadaka (vidjeti tablicu 1. na strani 31).

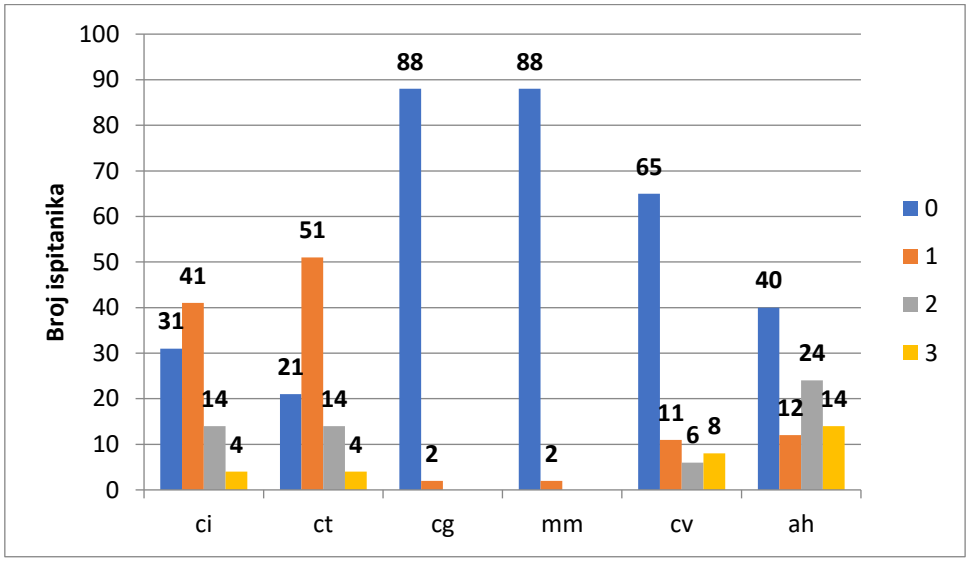
Na EM fotografijama nultih biopsija, koje su bile dostupne za 84 ispitanika (u ostalih 6 nije bilo glomerula za EM analizu), izmjerene su debljine GBM prema prethodno opisanoj standardiziranoj metodi (str. 23). Vrijednosti su prikazane u tablici 19. Ukoliko se izmjerene debljine GBM-a usporede s određenim referentnim rasponom za naš Odjel, tanke GBM bile su prisutne u 26 (31 %) nultih biopsija. Ukoliko se primjeni kriterij SZO-e (GBM tanja od 250 nm bez obzira na spol), tada su tanke GBM-e bile prisutne u 35 (41,7 %) nultih biopsija (tablica 19).

Tablica 19. EM karakteristike GBM-a na nultim biopsijama bubrežnog presatka.

GBM-0- $\bar{x}$ (nm)	Broj bolesnika	84
	$\bar{x}$ ±SD	268±57
	C (IKR)	266 (221-306)
	Najmanja vrijednost	139
	Najveća vrijednost	471
GBM-0-min (nm)	Broj bolesnika	84
	$\bar{x}$ ±SD	152±37
	C (IKR)	145 (126-170)
	Najmanja vrijednost	69
	Najveća vrijednost	255
GBM-0-max (nm)	Broj bolesnika	84
	$\bar{x}$ ±SD	470±140
	C (IKR)	472 (369-540)
	Najmanja vrijednost	205
	Najveća vrijednost	1022
GBM-0-SD (nm)	Broj bolesnika	84
	$\bar{x}$ ±SD	74±25
	C (IKR)	71 (54-89)
	Najmanja vrijednost	32
	Najveća vrijednost	163
TBMN prema kriterijima našeg Odjela (%)	Broj bolesnika (%)	84 (100,0)
	Ne (%)	58 (69,0)
	Da (%)	26 (31,0)
TBMN prema kriterijima SZO (%)	Broj bolesnika (%)	84 (100,0)
	Ne (%)	49 (58,3)
	Da (%)	35 (41,7)

0 – nulta biopsija, GBM – glomerularna bazalna membrana, $\bar{x}$ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon, min – minimum, max – maksimum, nm – nanometar, SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

Kod ispitanika koji su imali nulte biopsije učinjene su biopsije praćenja nakon 12 mjeseci. Na slici 37. prikazan je pregled kroničnih promjena prema Banff klasifikaciji[121] u tim biopsijama. Za razliku od nultih biopsija gdje najčešće nisu bile prisutne značajne kronične promjene tubulointersticija (ci0, ct0), u biopsijama paraćenja nakon 12 mjeseci najčešće su bile blage (ci1, ct1) kronične promjene tubulointersticija u 41 (45,6%) i 51 (56,7%) biopsija. U po dvije biopsije (2,2%) bile su prisutne kronične promjene na glomerulima (cg1 i mm1). Kao i u nultim biopsijama u biopsijama praćenja nakon godinu dana u najviše biopsija 65 (72,2%) i 40 (44,4%) bile su prisutne uredne arterije i arteriole (cv0 i ah0).



Slika 37. Kronične promjene prema Banff klasifikaciji[121] na biopsijama bubrežnog presatka 12 mjeseci nakon transplantacije (vidjeti tablicu 1. na strani 31).

Za 80 ispitanika s biopsijama 12 mjeseci nakon transplantacije bile su dostupne EM fotografije na kojima je izmjerena debljina GBM-a prema prethodno opisanoj standardiziranoj metodi (str. 23). Za 10 ispitanika nije bilo moguće izmjeriti debljinu GBM-a jer u uzorku za EM-u nije bilo glomerula. Ukoliko se izmjerene debljine usporede s urednim vrijednostima za naš Odjel, tanke GBM bile su prisutne u 25 (31,3 %) ispitanika. Ukoliko se primjeni kriterij od SZO-a (GBM tanja od 250 nm bez obzira na spol), tada su tanke GBM bile prisutne u 34 (43 %) ispitanika (tablica 20).

Tablica 20. EM karakteristike GBM-a na biopsijama bubrežnog presatka 12 mjeseci nakon transplantacije.

GBM-12- x̄ (nm)	Broj bolesnika	80
	x̄ ±SD	256,5±44,8
	C (IKR)	258,0 (229,0-286,0)
	Najmanja vrijednost	135,0
	Najveća vrijednost	390,0
GBM-12-min (nm)	Broj bolesnika	80
	x̄ ±SD	149,1±31,4
	C (IKR)	143,0 (124,0-171,0)
	Najmanja vrijednost	86,0
	Najveća vrijednost	248,0
GBM-12-max (nm)	Broj bolesnika	80
	x̄ ±SD	431,4±112,9
	C (IKR)	411,0 (354,0-507,0)
	Najmanja vrijednost	170,0
	Najveća vrijednost	763,0
GBM-12-SD (nm)	Broj bolesnika	80
	x̄ ±SD	65,7±20,3
	C (IKR)	63,0 (51,0-77,0)
	Najmanja vrijednost	22,0
	Najveća vrijednost	124,0
TBMN prema kriterijima našeg Odjela (%)	Broj bolesnika (%)	80 (100,0)
	Ne (%)	55 (68,8)
	Da (%)	25 (31,3)
TBMN prema SZO (%)	Broj bolesnika (%)	80 (100,0)
	Ne (%)	45 (57,0)
	Da (%)	34 (43,0)

12 – biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije, GBM – glomerularna bazalna membrana, x̄ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon, min – minimum, max – maksimum, nm – nanometar, SZO – Svjetska zdravstvena organizacija

Učinjena je usporedba debljine GBM-a na nultim i biopsijama bubrega 12 mjeseci nakon transplantacije kod istih ispitanika i nije nađena statistički značajna razlika u debljini GBM-a. (tablica 21).

Tablica 21. Usporedba debljine GBM-a nultih i biopsija 12 mjeseci nakon transplantacije (t test uzoraka).

T test uzoraka				
		t	df	p
Par 1	GBM-0- x̄ (nm) - GBM-12- x̄ (nm)	0,934	72	0,354
Par 2	GBM-0-min (nm) - GBM-12-min (nm)	0,081	72	0,936
Par 3	GBM-0-max (nm) - GBM-12-max (nm)	1,560	72	0,123
Par 4	GBM-0-SD (nm) - GBM-12-SD (nm)	1,860	72	0,067

GBM – glomerularna bazalna membtrana, x̄ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija, min – minimum, max – maksimum, nm – nanometar

Tablica 22. prikazuje kliničke parametre ispitanika u vrijeme biopsije, 12 mjeseci nakon transplantacije. Proteinurija je bila prisutna u 10 (12,8 %) ispitanika, a eritrociturija u 7 (9,1 %).

Tablica 22. Klinički parametri ispitanika u vrijeme biopsije 12 mjeseci nakon transplantacije.

Proteinurija	Broj bolesnika (%)	78 (100,0)
	Ne (%)	68 (87,2)
	Da (%)	10 (12,8)
PCR (g/mmol)	Broj bolesnika	90
	$\bar{x}$ ±SD	0,44±1,18
	C (IKR)	0,20 (0,09-0,38)
	Najmanja vrijednost	0,04
	Najveća vrijednost	8,58
Hematurija	Broj bolesnika (%)	77 (100,0)
	Ne (%)	70 (90,9)
	Da (%)	7 (9,1)
Kreatinin u serumu (µmol/l)	Broj bolesnika	90
	$\bar{x}$ ±SD	129,2±45,3
	C (IKR)	119,0 (102,0-142,0)
	Najmanja vrijednost	54,0
	Najveća vrijednost	352,0
eGFR (ml/min/1,73m2)	Broj bolesnika	90
	$\bar{x}$ ±SD	55,76±17,09
	C (IKR)	56,01 (44,90-65,85)
	Najmanja vrijednost	18,24
	Najveća vrijednost	117,09

PCR - proteini-kreatinin omjer; $\bar{x}$ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon, eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije

Učinjena je usporedba općih, kliničkih (tablica 23) te patohistoloških obilježja (tablica 24) između skupina ispitanika s i bez tankih GBM-a na nultim biopsijama bubrega. Nije nađena statistički značajna razlika između navedenih skupina niti za jednu od analiziranih varijabli.

Tablica 23. Opće i kliničke karakteristike ispitanika prema postojanju TBMN-a na nultoj biopsiji ([1]Mann-Whitney U test, [2]χ^2 test).

		TBMN prema kriterijima našeg Odjela			Vrijednost testa	P
		Svi	Ne	Da		
Dob primatelja (godine)	Broj ispitanika	84	58	26	753,0[1]	0,992
	$\bar{x}$ ±SD	48±12	49±12	48±13		
	C (IKR)	49 (40-58)	48 (43-58)	51 (37-59)		
Spol primatelja	Ž/M (%)	26/58 (31,0/69,0)	19/39 (32,8/67,2)	7/19 (26,9/73,1)	0,286[2]	0,593
Šećerna bolest u primatelja	Ne/Da (%)	58/26 (69,0/31,0)	40/18 (69,0/31,0)	18/8 (69,2/30,8)	0,001[2]	0,981
Vrsta transplantacije	Bubreg/SPKT (%)	71/13 (84,5/15,5)	49/9 (84,5/15,5)	22/4 (84,6/15,4)	0,000[2]	1,000
Vrsta darivatelja	Živi / Kadaverični (%)	8/76 (9,5/90,5)	5/53 (8,6/91,4)	3/23 (11,5/88,5)	0,177[2]	0,698
Spol darivatelja	Ž/M (%)	43/41 (51,2/48,8)	33/25 (56,9/43,1)	10/16 (38,5/61,5)	2,442[2]	0,118
Dob darivatelja (godine)	$\bar{x}$ ±SD	46±16	46±15	48±18	679,0[1]	0,468
	C (IKR)	50 (35-58)	50 (32-57)	52 (40-63)		
Odgođena funkcija grafta	Ne/Da (%)	50/34 (59,5/40,5)	36/22 (62,1/37,9)	14/12 (53,8/46,2)	0,504[2]	0,478

Ž – ženski spol; M – muški spol; $\bar{x}$ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon; eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije; SPKT – istovremena transplantacija bubrega i gušterače

Tablica 24. Patohistološka obilježja (kronične promjene prema Banff klasifikaciji[121], vidjeti tablicu 1 na strani 31.) ispitanika prema postojanju TBMN na nultoj biopsiji ([1]χ^2 test, [2]Fisherov egzaktni test).

		TBMN prema kriterijima našeg Odjela			Vrijednost testa	P
		Svi	Ne	Da		
ci 0	0/1 (%)	65/19 (77,4/22,6)	44/14 (75,9/24,1)	21/5 (80,8/19,2)	0,247[1]	0,619
ct 0	0/1 (%)	59/25 (70,2/29,8)	41/17 (70,7/29,3)	18/8 (69,2/30,8)	0,018[1]	0,892
cg 0	0 (%)	84 (100,0)	58 (100,0)	26 (100,0)	-	-
mm 0	0 (%)	84 (100,0)	58 (100,0)	26 (100,0)	-	-
cv 0	0/1/2/3 (%)	63/7/7/6 (75,9/8,4/8,4/7,2)	40/7/4/6 (70,2/12,3/7,0/10,5)	23/0/3/0 (88,5/0/11,5/0)	6,885[2]	0,062
ah 0	0/1/2/3 (%)	42/12/16/14 (50,0/14,3/19,0/16,7)	28/5/13/12 (48,3/8,6/22,4/20,7)	14/7/3/2 (53,8/26,9/11,5/7,7)	6,716[2]	0,077

0 – u nultoj biopsiji; ci – stupanj intersticijske fibroze; ct – stupanj tubularne atrofije; cg – stupanj dupliranja GBM; mm – stupanj proširenja mezangijskog matriksa; ah – stupanj hijalinoze arteriola; cv – stupanj zadebljanja arterija.

Također je učinjena usporedba kliničkih (tablica 25) i patohistoloških obilježja (tablica 26) između skupine ispitanika s i bez tankih GBM-a kod ispitanika s biopsijama bubrega 12 mjeseci nakon transplantacije. Nije nađena statistički značajna razlika između navedenih skupina niti za jedno od analiziranih kliničkih i patohistoloških obilježja.

Tablica 25. Usporedba kliničkih obilježja bolesnika 12 mjeseci nakon transplantacije prema postojanju TBMN-a ([1]χ^2 test, [2]Mann-Whitney test, [3]Studentov t test).

		TBMN prema kriterijima našeg Odjela			Vrijednost testa	P
		Svi	Ne	Da		
Proteinurija	Ne/Da (%)	59/9 (86,8/13,2)	40/6 (87,0/13,0)	19/3 (86,4/13,6)	0,005[1]	0,946
PCR (g/mmol)	Broj bolesnika	80	55	25	237,5[2]	0,954
	$\bar{x}$ ±SD	0,45±1,26	0,26±0,23	0,81±2,11		
	C (IKR)	0,18 (0,09-0,35)	0,18 (0,09-0,35)	0,18 (0,09-0,38)		
Eritrociturija	Ne/Da (%)	61/7 89,7/10,3 %	43/3 93,5/6,5 %	18/4 81,8/18,2 %	2,191[1]	0,139
Serumski kreatinin (umol/l)	Broj bolesnika	80	55	25	191,0[2]	0,258
	$\bar{x}$ ±SD	131,7±47,2	135,8±49,0	122,7±42,5		
	C (IKR)	120,0 (103,0-145,0)	125,0 (103,0-144,0)	115,0 (96,0-148,0)		
eGFR (ml/min/1,73m2)	Broj bolesnika	80	55	25	1,402[3]	0,075
	$\bar{x}$ ±SD	55,26±17,89	52,59±15,96	61,14±20,68		
	C (IKR)	53,44 (42,81-66,17)	52,53 (40,66-64,63)	60,37 (46,62-70,27)		
	$\bar{x}$ ±SD	0,8830±1,3567	0,8509±1,3098	0,9535±1,4803		
	C (IKR)	0,9372 (0,0697-1,7263)	0,8553 (0,1290-1,7374)	1,1152 (-0,0918-1,7257)		

PCR - proteini-kreatinin omjer; $\bar{x}$ – aritmetička sredina; SD – standardna devijacija; IKR – interkvartilni raspon, eGFR – procijenjena brzina glomerularne filtracije

Tablica 26. Usporedba patohistoloških obilježja (kronične promjene prema Banff klasifikaciji[121], vidjeti tablicu 1 na strani 31.) ispitanika 12 mjeseci nakon transplantacije prema postojanju TBMN-a ([1]Fisherov egzaktni test, [2]χ^2 test)

		TBMN prema kriterijima našeg Odjela			Vrijednost testa	P
		Svi	Ne	Da		
ci 12	0/1/2/3 (%)	28/35/13/4 (35,0/43,8/16,3/5,0)	19/23/9/4 (34,5/41,8/16,4/7,3)	9/12/4/0 (36,0/48,0/16,0/0)	1,602[1]	0,695
ct 12	0/1/2/3 (%)	18/45/13/4 (22,5/56,3/16,3/5,0)	9/33/9/4 (16,4/60,0/16,4/7,3)	9/12/4/0 (36,0/48,0/16,0/0)	4,625[1]	0,188
cg 12	0/1 (%)	78/2 (97,5/2,5)	54/1 (98,2/1,8)	24/1 (96,0/4,0)	0,336[2]	0,562
mm 12	0/1 (%)	78/2 (97,5/2,5)	54/1 (98,2/1,8)	24/1 (96,0/4,0)	0,336[2]	0,562
cv 12	0/1/2/3 (%)	57/11/5/7 (71,3/13,8/6,3/8,8)	38/7/4/6 (69,1/12,7/7,3/10,9)	19/4/1/1 (76,0/16,0/4,0/4,0)	1,285[1]	0,815
ah 12	0/1/2/3 (%)	35/12/20/13 (43,8/15,0/25,0/16,3)	23/9/12/11 (41,8/16,4/21,8/20,0)	12/3/8/2 (48,0/12,0/32,0/8,0)	2,492[1]	0,469

12 – 12 mjeseci nakon transplantacije, ci – stupanj intersticijske fibroze; ct – stupanj tubularne atrofije; cg – stupanj dupliranja GBM-a; mm – stupanj proširenja mezangijskog matriksa; ah – stupanj hijalinoze arteriola; cv – stupanj zadebljanja arterija.

Od 84 ispitanika s izmjerenom debljinom GBM-a na nultim biopsijama, 26 je imalo tanku GBM prema standardnim kriterijima našeg Odjela (tablica 19). Za imunohistokemijsku analizu na lance kolagena tipa IV bilo je dostupno tkivo bubrega njih 14 i svi su pokazivali uredne obrasce imunohistokemijskog bojenja na lance kolagena tipa IV.

6 RASPRAVA

6.1 Određivanje referentnog raspona uredne debljine GBM

SZO preporuča graničnu vrijednost debljine GBM-a za TBMN, neovisno o spolu, od 250 nm za odrasle i 180 nm za djecu do 11. godine života, uz napomenu da metodologija određivanja debljine GBM-a nije definirana.[95]

Referentni raspon debljine uredne GBM-a varira u centrima izvrsnosti i literaturnim navodima te ovisi o metodologiji mjerenja i načinu pripreme uzoraka za EM analizu. S obzirom na varijabilnost debljina GBM-a među laboratorijima, više autora govori o nužnosti definiranja vlastitog raspona uredne debljine GBM-a.[45,97] Stoga smo, kao prvi korak u ovom istraživanju, na našem Odjelu za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju definirali vlastiti raspon uredne debljine GBM-a.

Iako provedena na manjem uzorku (23 muška i 22 ženska ispitanika), srednja vrijednost i raspon uredne debljine GBM-a koje smo dobili usporedivi su s rezultatima Hass-a i suradnika (50 muških i 50 ženskih ispitanika) kao što je prikazano u tablici 27.[45,72,125]

Tablica 27. Srednja vrijednost i rasponi uredne debljine GBM-a

	x̄ ±SD debljine GBM		Vrijednosti uredne debljine GBM (x̄ ±2SD)	
	Naše istraživanje	Haas[45,72]	Naše istraživanje	Haas[45,72]
Muškarci	340±36 nm	330±50 nm	268-412 nm	230-430 nm
Žene	301±44 nm	305±45 nm	213-389 nm	215-395 nm

6.2 Ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama nativnih bubrega

Kolagen tipa IV je ubikvitarni protein u bazalnim membranama i čini glavnu kolagenu komponentu GBM-a.

AS je genski heterogen, strukturni poremećaj GBM-a čiju gensku pozadinu čini mutacija gena koji kodiraju izoforme kolagena tipa IV. Klinički se prezentira kao progresivna nasljedna nefropatija uz ultrastrukturne promjene GBM-a (nepravilna stanjenja, zadebljanja i cjepkanja), gubitak sluha za tonove visokih frekvencija i

oftalmološke probleme (prednji lentikonus, makularne pjege, kornealne endotelne vezikule, rekurentne kornealne erozije i katarakte).[3,11-14] U 85 % slučajeva genska osnova AS-a je mutacija X vezanog gena *COL4A5* smještenog na Xq22 regiji, koji kodira α5 lance kolagena tipa IV.[21] Samo 15 % svih AS-a su posljedica autosomne mutacije gena koji kodiraju α3 i/ili α4 lance kolagena tipa IV (*COL4A3* i/ili *COL4A4*), koji se najčešće nasljeđuju recesivno.[11,20,27] U literaturi su opisani i daleko rjeđi slučajevi autosomno dominantnog nasljeđivanja, iako je taj termin još uvijek predmet prijepora.[28-32] EM karakteristika X-vezanog AS-a je izmjena stanjenih i zadebljanih područja GBM-a, njena fragmentacija i lameliranje, pojava sitnih granula unutar GBM-a te nepravilne vanjske konture GBM-a.[3,40-44]

TBMN je najčešći uzrok perzistentne hematurije u djece i odraslih, a zajedno s AS-om i IgA nefropatijom čini većinu svih uzroka perzistentne hematurije.[84-86] Iako se TBMN doima kao jednostavan entitet, u literaturi postoje nedosljednosti glede imenovanja poremećaja, opisivanih kliničkih karakteristika, etiologije i ishoda. Obično TBMN predstavlja nositelje za autosomno recesivni AS. Glavna klinička karakteristika TBMN-a je perzistentna mikrohematurija[68,84,87-89] s povremeno pridruženom proteinurijom.[86,90-93] Najčešći nalaz na svjetlosnoj mikroskopiji je normalna glomerularna histologija, a na EM vidljivo je difuzno stanjena GBM.[94]

Jedan od ciljeva našeg istraživanja bio je istražiti i opisati patohistološke karakteristike ispitanika s AS-om i TBMN-om. Ispitanici su na temelju PHD-a podijeljeni na AS, TBMN, TBMN udruženu s FSGS-om i hereditarni nefritis. Termin hereditarni nefritis se u literaturi najčešće koristi kao sinonim za AS. Na našem Odjelu taj termin je korišten u rutinskoj dijagnostici kada se na temelju morfologije nije moglo jasno razlučiti radi li se o AS-u ili TBMN-u. Takvi bolesnici su obično imali, u najvećem dijelu analiziranog glomerula, tanku GBM uz samo mjestimična (do 10 % GBM-a) zadebljanja s diskretnim lameliranjima. Miner[96] je 2014. godine u časopisu Kidney International, osvrnuvši se na poremećaje uzrokovane mutacijama kolagena tipa IV, napisao da su COL4A3, COL4A4 i COL4A5 mutacije, klinički različite, a ultrastrukturno slične manifestacije bolesti koje je najbolje shvatiti kao spektar AS-a. Taj pojam bi obuhvatio sve poremećaje koji se na jednom kraju spektra očituju kao benigna obiteljska hematurija (bez posljedičnog učinka na funkciju bubrega), a na drugom kraju, kao klasični AS s nedetektabilnim kolagenom tipa IV u GBM-u, konačnom

progresijom u ESKD, te slušnim i vidnim smetnjama. Između te dvije krajnosti nalaze se svi ostali poremećaji koji imaju najrazličitije kliničke i histološke slike. Stoga bi možda ispravnije bilo, umjesto termina hereditarni nefritis kao nesigurne dijagnoze, za ovakve slučajeve koristiti termin „poremećaj iz spektra AS-a“. Tim prije što je ovo istraživanje pokazalo da su ispitanici s PHD-om „hereditarnog nefritisa“ po kliničkim i histološkim obilježjima sličniji skupini ispitanika s AS-om nego onima s TBMN-om.

Dijagnoza TBMN-a, prije svega, zahtijeva dokaz prisustva difuzno tankih GBM-a na EM. Debljina GBM-a varira obzirom na spol i dob. Također, veliki utjecaj na debljinu GBM-a ima metodologija pripremanja uzoraka za EM analizu. Referentni raspon debljine uredne GBM varira u centrima izvrsnosti i literaturnim navodima. S obzirom na varijabilnost debljina GBM-a među laboratorijima, više autora naglašava nužnost definiranja vlastitog raspona uredne debljine GBM-a.[45,97] Naše istraživanje potvrđuje ovu tezu. Interesantno je da je u ovom istraživanju, nakon što smo proveli standardizirano mjerenje, od 87 ispitanika s rutinski postavljenom dijagnozom TBMN-a (s ili bez FSGS-a) kriterije za dijagnozu TBMN-a po novoutvrđenom referentnom rasponu našeg Odjela imalo samo 47 ispitanika.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da nisu svi heterozigotni nosioci *COL4A3* ili *COL4A4* mutacija imali benigni tijek bolesti, već su pojedinci imali progresivni tijek s hematurijom, hipertenzijom i ESKD-om.[34,68-75] Kod određenog broja bolesnika se razvila proteinurija i FSGS s progresijom u ESKD.[76-81] Paassen i suradnici su u istraživanju na 92 ispitanika s TBMN-om našli 11 odraslih ispitanika (12 %) koji su imali FSGS te su razvili hipertenziju ili bubrežnu insuficijenciju. Deltas i suradnici su pokazali na uzorku od 155 ispitanika s TBMN-om (posljedica mutacije COL4A3-G1334E) da je 44 % ispitanika u dobi od 51. do 70. godine života imalo progresiju bolesti s različitim stupnjevima zatajenja bubrežne funkcije, uključujući ESKD-e. U našem istraživanju FSGS je bila prisutna u 12 od 47 ispitanika (26 %) s TBMN-om. Opisana skupina ispitanika imala je statistički značajno višu razinu proteinurije od grupa ispitanika s AS-om, TBMN-om i hereditarnim nefritisom. Srednja vrijednost eGFR za navedenu skupinu bila je 66,3 ml/min/1,73m^2 (blaže smanjena eGFR).

U našem istraživanju, pjenušave stanice (makrofazi) u intersticiju bubrega su zabilježene kod ispitanika s dijagnozama AS-a (8; 24,2 %) i hereditarnog nefritisa (2;

20 %). U ispitanika s TBMN-om nisu zabilježeni pjenušavi makrofazi u intersticiju. Haas je u svojem preglednom radu o AS-u[45] napomenuo da su pjenušavi makrofazi u intersticiju bubrega jedno od karakterističnijih svjetlosno-mikroskopskih obilježja AS-a. Ipak, takve stanice nedostaju u znatnom dijelu biopsija s AS-om, pogotovo kada se radi o biopsijama učinjenim u ranijem tijeku bolesti. Od ukupno 97 bubrežnih uzoraka (84 biopsije, 13 obdukcija ili nefrektomija) ispitanika s AS-om u dobi od 2. do 41. godine života, iz tri različita istraživanja, pjenušavi makrofazi u intersticiju pronađeni su u 39 (40 %) ispitanika.[38-40] Pjenušavi makrofazi su se nalazili u uzorcima biopsija starije djece i odraslih koji su također imali kronične promjene, kao što su glomeruloskleroza i viši stupanj IFTA-e.[38-40] U našem istraživanju pjenušavi makrofazi su pronađeni u nešto manjem broju ispitanika, 8 od 33 ispitanika s AS-om (24,2 %). Interesantno je da su pjenušavi makrofazi bili prisutni i u 2 od 10 ispitanika (20 %) s dijagnozom hereditarnog nefritisa (termina korištenog kod ispitanika kod kojih se na temelju patohistološkog nalaza nije moglo reći radi li se o AS-u ili TBMN-u).

Glavna EM karakteristika X-vezanog AS-a je izmjena stanjenih i zadebljanih područja GBM-a, njena fragmentacija i lameliranje, pojava sitnih granula unutar GBM-a te nepravilne vanjske konture GBM-a.[3,40-44] Navedene promjene nađene su u praktično svim našim ispitanicima s AS-om. Međutim, oskudno lameliranje bilo je zabilježeno i u dva ispitanika (5,9 %) s dijagnozom TBMN-a i dva ispitanika (16,7 %) s dijagnozom TBMN-a i FSGS-a. Ovakav nalaz je u skladu s literaturom, gdje su opisna lokalizirana cjepkanja i lameliranja GBM-a ispitanika s TBMN-om.[126]

Statistička analiza je pokazala da postoje značajne razlike u SD-u debljine GBM-a između skupina ispitanika: AS-a i TBMN-a, AS-a i TBMN-a udruženog s FSGS-om, TBMN-a i hereditarnog nefritisa te TBMN-a udružene s FSGS-om i hereditarnog nefritisa. Dodatno je učinjena AUROC analiza (površina ispod krivulje osjetljivosti i specifičnosti) za standardnu devijaciju debljine GBM-a (GBM-SD) u AS-u. Tom analizom je utvrđeno da ukoliko je GBM-SD viša od 61 nm se radi o AS-u, a ne TBMN-u s osjetljivošću od 80,7 % i specifičnošću od 74,19 %. Navedeni podatak može pridonijeti u procesu morfološkog razlikovanja AS-a od TBMN-a.

Naše istraživanje počivalo je na hipotezi da imunohistokemijska analiza α3, α4 i α5 lanaca kolagena tipa IV znatno pridonosi razlikovanju TBMN-a od AS-a i

subtipiziranju AS-a, kako u analizi nativnih tako i biopsija transplantiranih bubrega. Analizirali smo tkivo nativnih bubrega 90 ispitanika. Iznenađujuća je bila činjenica da su na temelju imunohistokemijske analize, iz skupine ispitanika s PHD-om AS-a (njih 30), subklasificirane samo dvije ispitanice kao nositeljice X-vezanog AS-a i dva ispitanika kao muškarci s X-vezanim AS-om. Dva ispitanika s patohistološkom dijagnozom AS-a pokazivala su atipičan obrazac imunohistokemijskog bojenja s urednim bojenjem za α3 i α4 lance kolagena tipa IV u glomerulima, dok su α5 lanci u glomerulima bili negativni, ali su bili pozitivni u Bowmanovoj čahuri. Negativno bojenje za α5 lance kolagena tipa IV u glomerularnom klupku karakteristično je za autosomno recesivni AS. Međutim, ono je tada kombinirano s negativnim bojenjem za α3 i α4 lance u glomerulima, što u našem istraživanju nije bio slučaj.[42] Niti jedan naš ispitanik nije pokazivao imunohistokemijski obrazac bojenja karakterističan za autosomno recesivni AS. Osjetljivost imunohistokemijske metode za subtipiziranje PHD-a AS-a (svjetlosna mikroskopija, IF i EM) u našem istraživanju je bila 20 %. Od 33 ispitanika s PHD-om TBMN-a, jedan je imao atipičan obrazac bojenja za lance kolagena tipa IV, a svi ostali su, očekivano, imali uredne obrasce bojenja za sva tri lanca. Interesantno je da su među ispitanicima s nejasnim PHD-om hereditarnog nefritisa dvije ispitanice subklasificirane kao nositeljice X-vezanog AS-a.

Potrebno je napomenuti da su i u literaturi opisana nerijetka odstupanja od opisanih klasičnih obrazaca bojenja za lance kolagena tipa IV u AS-u.[42] Heidet i suradnici su istaknuli izrazitu varijabilnost u imunohistokemijskom bojenju kod bolesnika s autosomno recesivnim AS-om uzrokovanim mutacijama *COL4A3*.[27] Imunohistokemijski profil je u navedenom istraživanju varirao od potpunog gubitka ekspresije do potpuno urednih obrazaca imunohistokemijskog bojenja.[27] Gubler i suradnici su također opisali uredne obrasce bojenja kod bolesnika s autosomno recesivnim AS-om uzrokovanim mutacijama *COL4A4*.[110] Rezultati njihovog istraživanja su pokazali da normalan rezultat imunohistokemijskog bojenja na lance kolagena tipa IV ne isključuje dijagnozu AS-a, čak niti X-vezanog tipa. Opisani su slučajevi muških bolesnika s X-vezanim AS-om i urednim obrascima imunohistokemijskog bojenja za lance kolagena tipa IV.[108,109]

Nositeljice X-vezanog AS-a često karakterizira mozaička ekspresija za α5 lance kolagena tipa IV u glomerulima.[105,106,108,109] Kashatan i Michael[3] su u preglednom radu

o AS-u zaključili da, iako je mozaička ekspresija α5 lanaca kolagena tipa IV patognomonična za nositeljice X-vezanog AS-a, uredni obrasci bojenja ne isključuju žene s X-vezanim AS-om.

Relativno niska osjetljivost imunohistokemijske analize u našem istraživanju djelomice se može objasniti opisanim činjenicama iz prethodnih istraživanja. Dodatno, u našem su istraživanju ispitanici bili klasificirani u skupinu AS-a na temelju patohistološkog nalaza, prvenstveno EM-a (karakteristično ultrastruktura GBM-a) koje se očekuje ne samo kod muških ispitanika s X vezanim AS-om nego i kod žena s X-vezanim AS-om te kod autosomno recesivnog AS-a.[42]

6.3 Ispitivanje tkiva bubrega dobivenog biopsijama transplantiranih bubrega

U rutinskom kliničkom radu našeg Odjela primijetili smo pojavnost tankih GBM-a u EM nalazima nultih biopsija transplantiranih bubrega.[127] Stoga je cilj dijela istraživanja s ispitivanjem tkiva bubrega dobivenog nultim biopsijama bio odrediti učestalost tankih GBM-a, te ispitati patohistološke, imunohistokemijske i kliničke karakteristike takvih ispitanika.

U ovaj dio istraživanja bilo je uključeno 90 ispitanika, medijana dobi 49 godina (od 17 do 73 godine) od čega su 62 (68,9 %) bili muški i 28 (31,1 %) ženski ispitanici. Na EM snimkama glomerula izmjerene su debljine GBM-a prethodno opisanom standardiziranom metodom (str. 23). Ukoliko se izmjerene debljine GBM-a usporede s urednim vrijednostima za naš Odjel, tanke GBM bile su prisutne u 26 (31 %) ispitanika. Ukoliko se primjeni kriterij SZO-a (GBM tanja od 250 nm bez obzira na spol), tada su tanke GBM bile prisutne u 35 (41,7 %) nultih biopsija.

Literaturni podaci o bolesnicima s TBMN-om kao darivateljima bubrega su dosta oskudni. Opisani su slučajevi transplantacije bubrega gdje su darivatelji bili oboljeli od TBMN-a.[117] Hassan i suradnici[128] su opisali TBMN u 13 od 45 (38 %) ispitanika. Važno je napomenuti da se u njihovom istraživanju radilo o biopsijama bubrega potencijalnih živih darivatelja koji su imali izoliranu mikroskopsku hematuriju. U istraživanju Choi i suradnika[119] TBMN je bila prisutna u 7 od 15 bolesnika podvrgnutih biopsiji bubrega

radi analize podobnosti bubrega za darivanje. I u ovom istraživanju se radilo o darivateljima s asimptomatskim abnormalnostima urina. U našem istraživanju udio tankih GBM-a je bio niži (ako se debljina GBM-a usporedi s referentnim rasponom GBM-a za naš Odjel). Unatoč tome, udio tankih GBM-a u nultim biopsijama bubrega u našem uzorku je iznenađujuće visok (31 %). Pogotovo ako se uzme u obzir da se u literaturi često citira podatak o prevalenciji TBMN-a u općoj populaciji od 1 %, te da se u našem istraživanju radilo o nultim biopsijama bubrežnih presadaka koji su uglavnom dobiveni od kadaveričnih darivatelja, a ne od odabrane kohorte živih darivatelja s asimptomatskim poremećajima urina.[41,72]

Zanimljivo je istraživanje Choi i suradnika iz 2018.[120] godine koje je pokazalo da se od 11 analiziranih bubrega prije transplantacije, kojima je postavljena dijagnoza TBMN-a, samo u 2 presatka TBMN je nađena u protokolarnoj biopsiji 10 dana nakon transplantacije. Kod 2 primatelja koji su imali TBMN na protokolarnoj biopsiji 10 dana nakon transplantacije, 1 je imao normalnu debljinu GBM-a na protokol biopsiji godinu dana nakon transplantacije. Drugi primatelj je imao akutno stanično odbacivanje tipa IIA s nepravilnim zadebljanjem GBM-a 6 godina nakon transplantacije. Ostalih 9 primatelja je imalo normalnu debljinu GBM-a u protokolarnim ili indikacijskim biopsijama u prosjeku 11,0 ± 11,4 mjeseci nakon transplantacije. U našem istraživanju nije nađena statistički značajna razlika u debljini GBM-a između nultih biopsija i biopsija bubrega 12 mjeseci nakon transplantacije kod istih ispitanika.

Dische i suradnici su u novo transplantiranim presatcima bubrega pronašli tanke GBM u 5 od 76 ispitanika. U dva dodatna ispitanika debljine GBM-a su bile granične, između normalnih vrijednosti i tankih GBM-a.[88] U istom radu, autori su naglasili da postoje čimbenici koji bi mogli utjecati na rezultate mjerenja GBM-a kao što su cerebrovaskularne bolesti, za koje se može sumnjati da imaju patogenetsku povezanost s tankim GBM-om, tehnički čimbenici poput vremena trajanja tople i hladne ishemije presatka te fiksacija tkiva.[88] Uzimajući u obzir da su referentne vrijednosti uredne debljine GBM-a našeg Odjela usporedive i slične vrijednostima koje je dobio Haas, smatramo da je naša morfometrijska metoda zadovoljavajuća i ne bi trebala biti uzrok ovako iznenađujuće visokog udjela tankih GBM-a u našem uzorku nultih biopsija.[45,72]

Kada se analiziraju kronične patohistološke promjene bubrega na nultim biopsijama bubrežnih presadaka koristeći Banff klasifikaciju, većina ispitanika nije imala promjena u većini analiziranih kategorija (ci, ct, cg, mm, cv).[121] U našem istraživanju radilo se dominantno o preimplantacijskim biopsijama. Međutim, radi se o nultim biopsijama koje imaju svrhu određivanja stanja bubrega darivatelja te se na temelju njih nije donosila odluka o transplantaciji bubrega. Uzorci ovih biopsija primljeni su u formalinu, nakon čega su izrađeni histološki preparati iz tkiva uklopljenog u parafinske blokove. Iz navedenih razloga, kronične promjene su klasificirane po Banff klasifikaciji, a ne prema klasifikaciji koju je opisao Remuzzi[129]. Naime, klasifikacijski sustav koji je opisao Remuzzi služi za procjenu kvalitete bubrega na smrznutim rezovima kod preimplatacijske odluke o prihvaćanju bubrega davatelja.[121,129]

U 20 (22,2 %) nultih biopsija bila je prisutna intersticijska fibroza blagog stupnja, a u 27 (30 %) tubularna atrofija blagog stupnja. Ukupno 14 (15,8 %) nultih biopsija je imalo umjereno ili znatno fibrointimalno zadebljanje arterija. Umjerena ili znatna hijalinoza arteriola je bila prisutna u 32 (35,6 %) uzorka. Ukupno 23 od 89 (25,8 %) ispitanika je imalo neki stupanj fibrointimalnog zadebljanja arterija, a 46 od 90 (51%) hijalinozu arteriola. Učestalost fibrointimalnog zadebljanja arterija u našem istraživanju je manja od one u radu Nickleita i suradnika[111] koji su pronašli znakove nefroangioskleroze u 68 % bubrega darivatelja, od čega je 19 % bilo umjerenog ili teškog stupnja.

Nismo našli statistički značajnu razliku između grupa ispitanika sa i bez tankih GBM-a na nultim biopsijama i biopsijama 12 mjeseci nakon transplantacije. U ispitanika s nultim biopsijama razlika između navedenih skupina nije nađena niti u općim i kliničkim parametrima (dob i spol primatelja, vrsta transplantacije, dob i spol darivatelja, odgođena funkcija presatka), niti u stupnju kroničnih promjena prema Banff klasifikaciji. Razlika u stupnju kroničnih promjena prema Banff klasifikaciji nije nađena niti između ispitanika s i bez tankih GBM-a u biopsijama 12 mjeseci nakon transplantacije. Također nije nađena razlika između navedenih skupina za parametre bubrežne funkcije 12 mjeseci nakon transplantacije (proteinurija, omjer proteina i kreatinina, eritrociturija, razina serumskog kreatinina i eGFR).

Eritrociturija je bila prisutna u 9,1 % ispitanika s transplantiranim bubregom 12 mjeseci nakon transplantacije. Nije bilo statistički značajne razlike između ispitanika s eritrociturijom koji imaju ili nemaju tanke GBM na nultoj biopsiji. Treba uzeti u obzir da je hematurija kod ispitanika sa tranplantiranim bubregom najčešće uzrokovana urinarnom infekcijom. Nakon toga po učestalosti slijede neoplazme bubrega, odbacivanje presatka, povrat osnovne bolesti i urolitijaza.[130]

Kako prisutnost tankih GBM-a na EM-u, osim u TBMN-a (heterozigoti za mutacije *COL4A3* i *COL4A4*), može biti patološka promjena prisutna i kod nekih bolesnika s X-vezanim AS-om te autosomno recesivnim AS-om, učinili smo imunohistokemijsko bojenje na lance kolagena tipa IV kod ispitanika koji su na nultim biopsijama bubrežnog presatka imali tanke GBM.[32] Za imunohistokemijsku analizu lanaca kolagena tipa IV bilo je dostupno tkivo bubrega od 14 takvih ispitanika i svi su pokazivali uredne obrasce imunohistokemijskog bojenja za sva tri lanca kolagena tipa IV.

7 ZAKLJUČCI

1. Referentni raspon uredne debljine GBM-a Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju Kliničke bolnice Dubrava za muškarce iznosi 268 – 412 nm, a za žene 213 – 389 nm.
2. Postoji značajna razlika u kliničkim parametrima (proteinurija, klinička prezentacija, oštećenje sluha, podatak o poremećajima iz spektra AS-a u obitelji) između ispitanika s AS-om, TBMN-om, TBMN-om udruženim s FSGS-om i hereditarnim nefritisom (pojam korišten za ispitanike koji su imali morfološke značajke između AS-a i TBMN-a).
3. Ne postoje statistički značajne razlike u komorbiditetima (hipertenzija, šećerna bolest, plućna bolest, srčana bolest, cerebrovaskularna bolest, periferna vaskularna bolest) između ispitanika s AS-om, TBMN-om, TBMN-om udruženim s FSGS-om i hereditarnim nefritisom.
4. Postoje određene značajne razlike u svjetlosno-mikroskopskim (broj potpuno vezivno promijenjenih glomerula, broj glomerula sa segmentalnom sklerozom, udio glomerula sa segmentalnom sklerozom, prisustvo pjenušavih makrofaga u intersticiju, udio i razred IFTA-e) i ultrastrukturnim (srednja vrijednost, mininimum, maksimum i standardna devijacija debljine GBM-a, lameliranje i izmjena tankih i debelih dijelova GBM-a) karakteristikama između pojedinih ispitivanih skupina.
5. Određena je vrijednost razabiranja standardne devijacije mjerenja debljine GBM-a između AS-a i TBMN-a od 61 nm s osjetljivošću od 80,7 % i specifičnošću 74,2 %.
6. Imunohistokemijska analiza lanaca kolagena tipa IV pridonosi subtipiziranju AS-a u 20 % ispitanika.
7. Za potpunu obradu ispitanika iz Alportovog spektra potrebna je uz patohistološku i kliničku također i genetička obrada.
8. Udio tankih GBM u nultim biopsijama bubrežnih presadaka, prema referentnom rasponu Odjela za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju, Kliničke bolnice Dubrava, iznosi 31 % analiziranih uzoraka.

9. Nema statistički značajne razlike u debljini GBM-a na nultim biopsijama i biopsijama bubrega 12 mjeseci nakon transplantacije.
10. Nema statistički značajne razlike između ispitanika s tankim GBM-om i bez tankih GBM-a u nultim biopsijama niti u općim i kliničkim parametrima (dob i spol primatelja, vrsta transplantacije, dob i spol darivatelja, odgođena funkcija presatka), niti u stupnjevima kroničnih promjena prema Banff klasifikaciji (ci, ct, cg, mm, cv, ah) kao niti u kliničkim parametrima 12 mjeseci nakon transplantacije (proteinurija, omjer proteinurije i kreatinina, hematurija, razina serumskog kreatinina, eGFR).

8 SAŽETAK

Obilježja glomerularne bazalne membrane u Alportovom sindromu i nefropatiji tankih bazalnih membrana

Ciljevi istraživanja: Rasvijetliti kompleksni pojam "tankih GBM-a" i utvrditi ulogu imunohistokemijske analize na lance α3, α4 i α5 kolagena tipa IV pri razlikovanju nefropatije tankih glomerularnih bazalnih membrana (TBMN) od Alportovog sindroma (AS) i subtipiziranju AS-a.

Ispitanici i metode: Provedeno je retrospektivno istraživanje na tkivu biopsija nativnih bubrega (130 ispitanika) i bubrežnih presadaka (90 ispitanika) uz provođenje standardiziranog mjerenja GBM-a i imunohistokemijske analize na lance kolagena tipa IV.

Rezultati: Određen je referentni raspon uredne debljine GBM-a (muškarci 268 – 412 nm, žene 213 – 389 nm) te patohistološke i kliničke karakteristike ispitanika s AS-om, TBMN-om, TBMN-om udruženim s FSGS-om i hereditarnim nefritisom (pojam korišten za ispitanike koji su imali morfološke značajke između AS-a i TBMN-a). Postoji značajna razlika u kliničkim parametrima, svjetlosno-mikroskopskim i ultrastrukturnim značajkama između opisanih skupina. Udio tankih GBM-a u nultim biopsijama bubrežnih presadaka iznosi 31 % analiziranih uzoraka. Nema statistički značajne razlike između ispitanika s tankim GBM-a i bez tankih GBM-a u nultim biopsijama obzirom na kliničke varijable, stupanj kroničnih promjena prema Banff klasifikaciji i kliničkim pokazateljima 12 mjeseci nakon transplantacije.

Zaključak: Imunohistokemijsko bojenje u 20 % ispitanika pridonosi subtipiziranju AS-a, a standardna devijacija mjerenja debljine GBM-a od 61 nm može pridonijeti razlikovanju AS-a i TBMN-a sa osjetljivošću od 80,7 % i specifičnošću 74,2 %. Za potpuno subtipiziranje bolesnika iz Alportovog spektra potrebna je uz patohistološku i kliničku također i genska analiza.

9 SUMMARY

Characteristics of the glomerular basement membrane in Alport's syndrome and thin basement membrane nephropathy

Petar Šenjug

PhD Thesis 2021.

Aim: To elucidate concept of “thin GBM“ and evaluate immunohistochemical staining for α3, α4 and α5 chains of collagen type IV in differentiation of thin glomerular basement membrane nephropathy (TBMN) from Alport syndrome (AS) and subclassification of AS.

Patients and methods: A retrospective research of native (130 subjects) and transplanted kidney biopsy tissue (90 subjects) was performed with standardized GBM measurements and immunohistochemical analysis of the type IV collagen chains.

Results: The reference span of normal GBM thicknesses (men 268 - 412 nm, women 213 - 389 nm) and the histopathological and clinical characteristics of patients with AS, TBMN, TBMN associated with FSGS and hereditary nephritis (a term used for patients who had morphological features between AS and TBMN) were determined. There is a difference in clinical parameters, light-microscopy and ultrastructural features among the groups. The prevalence of thin GBM in zero time kidney transplant biopsies is 31%. There are no differences between patients with or without thin GBM in clinical variables, Banff chronic changes scores and clinical parameters 12 months after transplantation.

Conclusion: Immunohistochemical staining in 20% of patients contributed to AS subtyping. Standard deviation of average GBM thicknesses of 61 nm can contribute to differentiation of AS and TBMN with sensitivity of 80.7% and specificity of 74.2%. Pathohistological, clinical and also genetic processing is required to completely subtype Alport spectrum patients.

10 LITERATURA

1. Vandenberg P, Kern A, Ries A, Luckenbill-Edds L, Mann K, Kuhn K. Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins. J Cell Biol 1991;113(6):1475-83.
2. Krishnamurti U, Chen Y, Michael A i sur. Integrin-mediated interactions between primary/T-sv40 immortalized human glomerular epithelial cells and type IV collagen. Lab Invest 1996;74(3):650-7.
3. Kashtan CE, Michael AF. Alport syndrome. Kidney Int 1996;50(5):1445-63.
4. Leinonen A, Mariyama M, Mochizuki T, Tryggvason K, Reeders ST. Complete primary structure of the human type IV collagen alpha 4(IV) chain. Comparison with structure and expression of the other alpha (IV) chains. J Biol Chem 1994;269(42):26172-7.
5. Hudson BG. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. J Am Soc Nephrol 2004;15(10):2514-27.
6. Timpl R, Wiedemann H, van Delden V, Furthmayr H, Kuhn K. A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. Eur J Biochem 1981;120(2):203-11.
7. Tsilibary EC, Charonis AS. The role of the main noncollagenous domain (NC1) in type IV collagen self-assembly. J Cell Biol 1986;103(6 Pt 1):2467-73.
8. Aumailley M, Timpl R. Attachment of cells to basement membrane collagen type IV. J Cell Biol 1986;103(4):1569-75.
9. Charonis AS, Tsilibary EC, Yurchenco PD, Furthmayr H. Binding of laminin to type IV collagen: a morphological study. J Cell Biol 1985;100(6):1848-53.
10. Yurchenco PD, Tsilibary EC, Charonis AS, Furthmayr H. Models for the self-assembly of basement membrane. J Histochem Cytochem 1986;34(1):93-102.
11. 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.
12. Lemmink HH, Nillesen WN, Mochizuki T i sur. Benign familial hematuria due to mutation of the type IV collagen alpha4 gene. J Clin Invest 1996;98(5):1114-8.
13. Alport AC. Hereditary Familial Congenital Haemorrhagic Nephritis. Br Med J 1927;1(3454):504-6.

14. Flinter F. Alport's syndrome. J Med Genet 1997;34(4):326-30.
15. Wing AJ, Brunner FP. Twenty-three years of dialysis and transplantation in Europe: experiences of the EDTA Registry. Am J Kidney Dis 1989;14(5):341-6.
16. Pajari H, Kaariainen H, Muhonen T, Koskimies O. Alport's syndrome in 78 patients: epidemiological and clinical study. Acta Paediatr 1996;85(11):1300-6.
17. Persson U, Hertz JM, Wieslander J, Segelmark M. Alport syndrome in southern Sweden. Clin Nephrol 2005;64(2):85-90.
18. Hasstedt SJ, Atkin CL. X-linked inheritance of Alport syndrome: family P revisited. Am J Hum Genet 1983;35(6):1241-51.
19. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J i sur. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. Science 1990;248(4960):1224-7.
20. Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M i sur. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. Nat Genet 1994;8(1):77-81.
21. Pirson Y. Making the diagnosis of Alport's syndrome. Kidney Int 1999;56(2):760-75.
22. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I 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.
23. 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.
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 Pero 2013;24(3):364-75.
25. Jais JP, Knebelmann B, Giatras I 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.
26. Dagher H, Buzza M, Colville D 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.

27. Heidet L, Arrondel C, Forestier L i sur. Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. J Am Soc Nephrol 2001;12(1):97-106.
28. Jefferson JA, Lemmink HH, Hughes AE i sur. Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collage alpha 3 and alpha 4 genes (COL4A3 and COL4A4). Nephrol Dial Transplant 1997;12(8):1595-9.
29. Ciccarese M, Casu D, Ki Wong F i sur. Identification of a new mutation in the alpha4(IV) collagen gene in a family with autosomal dominant Alport syndrome and hypercholesterolaemia. Nephrol Dial Transplant 2001;16(10):2008-12.
30. van der Loop FT, Heidet L, Timmer ED i sur. Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation. Kidney Int 2000;58(5):1870-5.
31. Savige J. Should We Diagnose Autosomal Dominant Alport Syndrome When There Is a Pathogenic Heterozygous COL4A3 or COL4A4 Variant? Kidney Int Rep 2018;6(3):1239-41.
32. Kashtan CE, Ding J, Garosi G 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.
33. Artuso R, Fallerini C, Dosa L i sur. Advances in Alport syndrome diagnosis using next-generation sequencing. Eur J Hum Genet 2012;20(1):50-7.
34. Longo I, Porcedda P, Mari F i sur. COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. Kidney Int 2002;61(6):1947-56.
35. Pescucci C, Mari F, Longo I i sur. Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to COL4A3 or COL4A4 gene. Kidney Int 2004;65(5):1598-603.
36. Thony HC, Luethy CM, Zimmermann A, Laux-End R, Oetliker OH, Bianchetti MG. Histological features of glomerular immaturity in infants and small children with normal or altered tubular function. Eur J Pediatr 1995;154(9 Suppl 4):S65-8.
37. Rumpelt HJ, Steinke A, Thoenes W. Alport-type glomerulopathy: evidence for diminished capillary loop size. Clin Nephrol 1992;37(2):57-64.
38. Gubler M, Levy M, Broyer M i sur. Alport's syndrome. A report of 58 cases and a review of the literature. Am J Med 1981;70(3):493-505.

39. Krickstein HI, Gloor FJ, Balogh K, Jr. Renal pathology in hereditary nephritis with nerve deafness. Arch Pathol 1966;82(6):506-17.
40. Yoshikawa N, White RH, Cameron AH. Familial hematuria; clinico-pathological correlations. Clin Nephrol 1982;17(4):172-82.
41. Gubler M, Heidet L, Antignac C. Alport's syndrome, thin basement membrane nephropathy, nail-patella syndrome, and type III collagen glomerulopathy. U: Jennette JC, Heptinstall RH, ur. *Heptinstall's pathology of the kidney*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007, str. 487-517.
42. Kashtan CE. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane disease. J Am Soc Nephrol 1998;9(9):1736-50.
43. 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.
44. Rumpelt HJ. Hereditary nephropathy (Alport syndrome): correlation of clinical data with glomerular basement membrane alterations. Clin Nephrol 1980;13(5):203-7.
45. Haas M. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis. Arch Pathol Lab Med 2009;133(2):224-32.
46. 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.
47. Slajpah M, Gorinsek B, Berginc G 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.
48. Bekheirnia MR, Reed B, Gregory MC i sur. Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome. J Am Soc Nephrol 2010;21(5):876-83.
49. Martin P, Heiskari N, Zhou J i sur. High mutation detection rate in the COL4A5 collagen gene in suspected Alport syndrome using PCR and direct DNA sequencing. J Am Soc Nephrol 1998;9(12):2291-301.
50. Demosthenous P, Voskarides K, Stylianou K i sur. X-linked Alport syndrome in Hellenic families: phenotypic heterogeneity and mutations near interruptions of the collagen domain in COL4A5. Clin Genet 2012;81(3):240-8.

51. Kaneko K, Tanaka S, Hasui M i sur. A family with X-linked benign familial hematuria. Pediatr Nephrol 2010;25(3):545-8.
52. Deltas C, Pierides A, Voskarides K. The role of molecular genetics in diagnosing familial hematuria(s). Pediatr Nephrol 2012;27(8):1221-31.
53. Becknell B, Zender GA, Houston R i sur. Novel X-linked glomerulopathy is associated with a COL4A5 missense mutation in a non-collagenous interruption. Kidney Int 2011;79(1):120-7.
54. Miner JH, Baigent C, Flinter F i sur. The 2014 International Workshop on Alport Syndrome. Kidney Int 2014;86(4):679-84.
55. Zhang Y, Wang F, Ding J i sur. Genotype-phenotype correlations in 17 Chinese patients with autosomal recessive Alport syndrome. Am J Med Genet A 2012;158A(9):2188-93.
56. Fallerini C, Dosa L, Tita R i sur. Unbiased next generation sequencing analysis confirms the existence of autosomal dominant Alport syndrome in a relevant fraction of cases. Clin Genet 2013;86(3):252-7.
57. Moriniere V, Dahan K, Hilbert P i sur. Improving Mutation Screening in Familial Hematuric Nephropathies through Next Generation Sequencing. J Am Soc Nephrol 2014;25(12):2740-51.
58. Buzza M, Wang YY, Dagher H i sur. COL4A4 mutation in thin basement membrane disease previously described in Alport syndrome. Kidney Int 2001;60(2):480-3.
59. Ozen S, Ertoy D, Heidet L i sur. Benign familial hematuria associated with a novel COL4A4 mutation. Pediatr Nephrol 2001;16(11):874-7.
60. Badenas C, Praga M, Tazon B i sur. Mutations in theCOL4A4 and COL4A3 genes cause familial benign hematuria. J Am Soc Nephrol 2002;13(5):1248-54.
61. Buzza M, Dagher H, Wang YY i sur. Mutations in the COL4A4 gene in thin basement membrane disease. Kidney Int 2003;63(2):447-53.
62. 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.

63. Tazon Vega B, Badenas C, Ars E i sur. Autosomal recessive Alport's syndrome and benign familial hematuria are collagen type IV diseases. Am J Kidney Dis 2003;42(5):952-9.
64. 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.
65. Rana K, Tonna S, Wang YY i sur. Nine novel COL4A3 and COL4A4 mutations and polymorphisms identified in inherited membrane diseases. Pediatr Nephrol 2007;22(5):652-7.
66. Baek JI, Choi SJ, Park SH i sur. Identification of novel variants in the COL4A4 gene in Korean patients with thin basement membrane nephropathy. Indian J Med Res 2009;129(5):525-33.
67. Endreffy E, Ondrik Z, Ivanyi B i sur. Collagen type IV nephropathy: genetic heterogeneity examinations in affected Hungarian families. Mol Cell Probes 2011;25(1):28-34.
68. Nieuwhof CM, de Heer F, de Leeuw P, van Breda Vriesman PJ. Thin GBM nephropathy: premature glomerular obsolescence is associated with hypertension and late onset renal failure. Kidney Int 1997;51(5):1596-601.
69. Nogueira M, Cartwright J, Jr., Horn K i sur. Thin basement membrane disease with heavy proteinuria or nephrotic syndrome at presentation. Am J Kidney Dis 2000;35(4):E15.
70. van Paassen P, van Breda Vriesman PJ, van Rie H, Tervaert JW. Signs and symptoms of thin basement membrane nephropathy: a prospective regional study on primary glomerular disease-The Limburg Renal Registry. Kidney Int 2004;66(3):909-13.
71. Norby SM, Cosio FG. Thin basement membrane nephropathy associated with other glomerular diseases. Semin Nephrol 2005;25(3):176-9.
72. 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.
73. Pierides A, Voskarides K, Athanasiou Y 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.

74. Voskarides K, Damianou L, Neocleous 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.

75. Papazachariou L, Demosthenous P, Pieri M 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.

76. 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.

77. Gast C, Pengelly RJ, Lyon M i sur. Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. Nephrol Dial Transplant 2016;31(6):961-70.

78. Xie J, Wu X, Ren H i sur. COL4A3 mutations cause focal segmental glomerulosclerosis. J Mol Cell Biol 2015;7(2):184.

79. Malone AF, Phelan PJ, Hall G i sur. Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis. Kidney Int 2014;86(6):1253-9.

80. Temme J, Peters F, Lange K i sur. Incidence of renal failure and nephroprotection by RAAS inhibition in heterozygous carriers of X-chromosomal and autosomal recessive Alport mutations. Kidney Int 2012;81(8):779-83.

81. Hoefele J, Lange-Sperandio B, Ruessmann D i sur. Novel heterozygous COL4A3 mutation in a family with late-onset ESRD. Pediatr Nephrol 2010;25(8):1539-42.

82. Savige J, Ariani F, Mari F i sur. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. Pediatr Nephrol 2019;34(7):1175-89.

83. Deltas C, Pierides A, Voskarides K. Molecular genetics of familial hematuric diseases. Nephrol Dial Transplant 2013;28(12):2946-60.

84. Savige J, Rana K, Tonna S, Buzza M, Dagher H, Wang YY. Thin basement membrane nephropathy. Kidney Int 2003;64(4):1169-78.
85. Kashtan CE. Familial hematuria due to type IV collagen mutations: Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. Curr Opin Pediatr 2004;16(2):177-81.
86. Gregory MC. The clinical features of thin basement membrane nephropathy. Semin Nephrol 2005;25(3):140-5.
87. McConville JM, McAdams AJ. Familial and nonfamilal benign hematuria. J Pediatr 1966;69(2):207-14.
88. 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.
89. Abe S, Amagasaki Y, Iyori S i sur. Thin basement membrane syndrome in adults. J Clin Pathol 1987;40(3):318-22.
90. Rogers PW, Kurtzman NA, Bunn SM, Jr., White MG. Familial benign essential hematuria. Arch Intern Med 1973;131(2):257-62.
91. Perry GJ, George CR, Field MJ i sur. Thin-membrane nephropathy--a common cause of glomerular haematuria. Med J Aust 1989;151(11-12):638-42.
92. Aarons I, Smith PS, Davies RA, Woodroffe AJ, Clarkson AR. Thin membrane nephropathy: a clinico-pathological study. Clin Nephrol 1989;32(4):151-8.
93. Dische FE, Weston MJ, Parsons V. Abnormally thin glomerular basement membranes associated with hematuria, proteinuria or renal failure in adults. Am J Nephrol 1985;5(2):103-9.
94. Foster K, Markowitz GS, D'Agati VD. Pathology of thin basement membrane nephropathy. Semin Nephrol 2005;25(3):149-58.
95. Churg J. Renal disease : classification and atlas of glomerular diseases. Tokyo: Igaku-Shoin, 1982.
96. Miner JH. Pathology vs. molecular genetics: (re)defining the spectrum of Alport syndrome. Kidney Int 2014;86(6):1081-3.
97. Tryggvason K, Patrakka J. Thin basement membrane nephropathy. J Am Soc Nephrol 2006;17(3):813-22.

98. Dische FE. Measurement of glomerular basement membrane thickness and its application to the diagnosis of thin-membrane nephropathy. Arch Pathol Lab Med 1992;116(1):43-9.
99. Hirose K, Osterby R, Nozawa M, Gundersen HJ. Development of glomerular lesions in experimental long-term diabetes in the rat. Kidney Int 1982;21(5):689-95.
100. Tiebosch AT, Frederik PM, van Breda Vriesman PJ i sur. Thin-basement-membrane nephropathy in adults with persistent hematuria. N Engl J Med 1989;320(1):14-8.
101. McLay AL, Jackson R, Meyboom F, Jones JM. Glomerular basement membrane thinning in adults: clinicopathological correlations of a new diagnostic approach. Nephrol Dial Transplant 1992;7(3):191-9.
102. Das AK, Pickett TM, Tungekar MF. Glomerular basement membrane thickness - a comparison of two methods of measurement in patients with unexplained haematuria. Nephrol Dial Transplant 1996;11(7):1256-60.
103. Spear GS. Editorial: Alport's syndrome: a consideration of pathogenesis. Clin Nephrol 1973;1(6):336-7.
104. Kashtan C, Fish AJ, Kleppel M, Yoshioka K, Michael AF. Nephritogenic antigen determinants in epidermal and renal basement membranes of kindreds with Alport-type familial nephritis. J Clin Invest 1986;78(4):1035-44.
105. Kleppel MM, Kashtan C, Santi PA, Wieslander J, Michael AF. Distribution of familial nephritis antigen in normal tissue and renal basement membranes of patients with homozygous and heterozygous Alport familial nephritis. Relationship of familial nephritis and Goodpasture antigens to novel collagen chains and type IV collagen. Lab Invest 1989;61(3):278-89.
106. Yoshioka K, Hino S, Takemura T i sur. Type IV collagen alpha 5 chain. Normal distribution and abnormalities in X-linked Alport syndrome revealed by monoclonal antibody. Am J Pathol 1994;144(5):986-96.
107. Kashtan CE, Kim Y. Distribution of the alpha 1 and alpha 2 chains of collagen IV and of collagens V and VI in Alport syndrome. Kidney Int 1992;42(1):115-26.
108. Nakanishi K, Yoshikawa N, Iijima K i sur. Immunohistochemical study of alpha 1-5 chains of type IV collagen in hereditary nephritis. Kidney Int 1994;46(5):1413-21.

109. Kashtan CE, Atkin CL, Gregory MC, Michael AF. Identification of variant Alport phenotypes using an Alport-specific antibody probe. Kidney Int 1989;36(4):669-74.
110. Gubler MC, Knebelmann B, Beziau A i sur. Autosomal recessive Alport syndrome: immunohistochemical study of type IV collagen chain distribution. Kidney Int 1995;47(4):1142-7.
111. Nickeleit V, Mengel M, Colvin RB. Renal Transplant Pathology. U: Jennette JC, Olson JL, Silva FG, D'Agati VD, ur. *Heptinstall's pathology of the kidney*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2015, str. 1321-459.
112. De Vusser K, Lerut E, Kuypers D i sur. The predictive value of kidney allograft baseline biopsies for long-term graft survival. J Am Soc Nephrol 2013;24(11):1913-23.
113. Nickeleit V. Pathology: donor biopsy evaluation at time of renal grafting. Nat Rev Nephrol 2009;5(5):249-51.
114. Fromer DL, Birkhoff JD, Hardy MA, Benvenisty AI, Bennett B, Benson MC. Bilateral intrarenal adrenal glands in cadaveric donor kidneys resembling renal cell carcinoma on intraoperative frozen section. J Urol 2001;166(5):1820-1.
115. Rosenberg HG, Martinez PS, Vaccarezza AS, Martinez LV. Morphological findings in 70 kidneys of living donors for renal transplant. Pathol Res Pract 1990;186(5):619-24.
116. Cosyns JP, Malaise J, Hanique G i sur. Lesions in donor kidneys: nature, incidence, and influence on graft function. Transpl Int 1998;11(1):22-7.
117. Sakai K, Muramatsu M, Ogiwara H i sur. Living related kidney transplantation in a patient with autosomal-recessive Alport syndrome. Clin Transplant 2003;17 Suppl 10:4-8.
118. Ierino FL, Kanellis J. Thin basement membrane nephropathy and renal transplantation. Semin Nephrol 2005;25(3):184-7.
119. Choi SR, Sun IO, Hong YA i sur. The role of kidney biopsy to determine donation from prospective kidney donors with asymptomatic urinary abnormalities. Transplant Proc 2012;44(1):11-3.
120. Choi C, Ahn S, Min SK i sur. Midterm Outcome of Kidney Transplantation From Donors With Thin Basement Membrane Nephropathy. Transplantation 2018;102(4):e180-e84.

121. Loupy A, Haas M, Solez K i sur. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. Am J Transplant 2017;17(1):28-41.
122. 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.
123. Pettersson E, Tornroth T, Wieslander J. Abnormally thin glomerular basement membrane and the Goodpasture epitope. Clin Nephrol 1990;33(3):105-9.
124. Lajoie G. Approach to the diagnosis of thin basement membrane nephropathy in females with the use of antibodies to type IV collagen. Arch Pathol Lab Med 2001;125(5):631-6.
125. 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 (Supplement 1):33-34.
126. Liapis H, Gokden N, Hmiel P, Miner JH. Histopathology, ultrastructure, and clinical phenotypes in thin glomerular basement membrane disease variants. Hum Pathol 2002;33(8):836-45.
127. Horaček M, Šenjug P, Knotek M, D GL. Clinical significance of zero-time renal transplant biopsies. Virchows Archiv 2019; 473 (Suppl 1):S129-30.
128. Hassan EA, Ali TZ, Abdulbaki A, Ibrahim IA, Almanae HM, Aleid HA. Histopathologic Findings of Potential Kidney Donors With Asymptomatic Microscopic Hematuria: Impact on Donation. Transplant Proc 2017;49(8):1729-32.
129. Remuzzi G, Grinyo J, Ruggenenti P i sur. Early experience with dual kidney transplantation in adults using expanded donor criteria. Double Kidney Transplant Group (DKG). Journal of the American Society of Nephrology : JASN 1999;10(12):2591-8.
130. Wang Z, Vathsala A, Tiong HY. Haematuria in postrenal transplant patients. Biomed Res Int 2015;2015:292034.

11 ŽIVOTOPIS

Petar Šenjug, dr. med., specijalist patolog, je rođen 7. 8. 1985. g. u Zaboku, gdje je 2004. g. završio opću gimnaziju. Diplomirao je 2010. godine na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu s prosjekom ocjena 4,9. Za vrijeme studija primio je dvije dekanove nagrade. Prvu dekanovu nagradu primio je 2006. godine kao najuspješniji student u akademskoj godini 2005./2006. Drugu dekanovu nagradu primio je 2008. godine za najbolji studentski znanstveni rad. Od 2011. godine zaposlen je u Kliničkoj bolnici Dubrava u Zagrebu, prvo kao stažist, a od 2012. g kao specijalizant patologije na Kliničkom zavodu za patologiju i citologiju. Specijalist patologije postao je 2018. godine. Autor je ili koautor 4 znanstvena rada citirana u CC-u i više od 20 kongresnih priopćenja na domaćim i međunarodnim skupovima. Kao sudionik i izlagač sudjelovao je na više domaćih i međunarodnih kongresa, a kao pozvani predavač je održao predavanja na 5. transplantacijskoj školi (Lopud, rujan 2018. g.) te na tečaju prve kategorije “Primarne i sekundarne bolesti glomerula“ (Zagreb, svibanj 2018. g.). Područje njegovog stručnog i znanstvenog interesa je nefropatologija s posebnim interesom za nasljedne bolesti bubrega.