

UNIVERZITET U BEOGRADU

MEDICINSKI FAKULTET

Marina M. Perić

ISPITIVANJE GENETIČKE PREDISPOZICIJE ZA
NASTANAK HRONIČNIH, IMUNSKI
POSREDOVANIH BOLESTI GLOMERULA U
DEČJOJ POPULACIJI

doktorska disertacija

Beograd, 2026.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF MEDICINE

Marina M. Perić

ANALYSIS OF GENETIC PREDISPOSITION FOR
THE OCCURRENCE OF CHRONIC, IMMUNE-
MEDIATED GLOMERULAR DISEASES IN
CHILDREN

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2026

Mentor disertacije:

Prof. dr Vladislav Vukomanović, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet, Katedra za pedijatriju

Komentor disertacije:

Prof. dr Ivana Novaković, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet, Katedra za humanu genetiku

Članovi komisije za odbranu doktorske disertacije:

Prof. dr Dušan Paripović, Univerzitet u Beogradu - Medicinski fakultet, Katedra za pedijatriju

Prof. dr Vesna Stojanović, Univerzitet u Novom Sadu - Medicinski fakultet, Katedra za pedijatriju

Dr sc. Ana Marjanović, naučni saradnik, Klinika za neurologiju, Univerzitetski klinički centar Srbije

Datum odbrane: _____

Zahvaljujem se:

Mentorima, prof. dr Vladislavu Vukomanoviću i prof. dr Ivani Novaković, na pomoći, podršci i razumevanju tokom izrade disertacije;

Članovima komisije, prof. dr Dušanu Paripoviću, prof. dr Vesni Stojanović i dr sc. Ani Marjanović, na pomoći u realizaciji disertacije;

Koleginicama sa Odeljenja za ispitivanje i lečenje bolesti bubrega i mokraćnih kanala Pedijatrijske klinike Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije “Dr Vukan Čupić”, dr Nataši Stajić, dr Jovani Putnik i dr Aleksandri Paripović, na nesebičnoj pomoći i podršci prilikom izrade disertacije, kao i tokom dugogodišnjeg zajedničkog rada;

Porodici, na ljubavi, strpljenju, podršci i motivaciji.

Zahvaljujem se:

Svim koautorima radova, koji su proizašli kao rezultat istraživanja u okviru ove doktorske teze, jer su učestvovali u:

Kreiranju koncepta teze: prof. dr Vladislav Vukomanović, prof. dr Ivana Novaković, prof. dr Emina Milošević;

Prikupljanju podataka: dr Nataša Stajić, dr Jovana Putnik, dr Aleksandra Paripović;

Formalnoj analizi: prof. dr Emina Milošević, prof. dr Vladimir Perović, dr Aleksandra Aničin;

Istraživanju: dr Nataša Stajić, dr Jovana Putnik, dr Aleksandra Paripović;

Metodologiji: prof. dr Ivana Novaković, prof. dr Emina Milošević, prof. dr Vladimir Perović, dr sc. Marija Branković, dr sc. Milena Janković, dr Aleksandra Aničin;

Superviziji: prof. dr Vladislav Vukomanović, prof. dr Ivana Novaković, prof. dr Emina Milošević;

Pisanju - originalni nacrt: dr sc. Marija Branković, dr Aleksandra Aničin, prof. dr Vladimir Perović;

Pisanju - recenzija i uređivanje: prof. dr Vladislav Vukomanović, prof. dr Ivana Novaković, prof. dr Emina Milošević, prof. dr Vladimir Perović, dr Nataša Stajić, dr Jovana Putnik, dr Aleksandra Paripović, dr sc. Milena Janković, doc. dr Dejan Nikolić, dr Filip Milanović, dr Ivo Božović.

ISPITIVANJE GENETIČKE PREDISPOZICIJE ZA NASTANAK HRONIČNIH, IMUNSKI POSREDOVANIH BOLESTI GLOMERULA U DEČJOJ POPULACIJI

Uvod: Glomerulonefritisi (GN) su heterogena grupa inflamatornih bolesti glomerula bubrega. Primarni GN su bolesti koje zahvataju samo bubrežne glomerule, dok se sekundarni GN javljaju u sklopu drugih, sistemskih bolesti vezivnog tkiva. Savremene genetičke metode otkrile su gene koji uzrokuju bolesti glomerula ili predstavljaju faktore rizika za nastanak primarnih i sekundarnih GN. Pored toga, ove metode omogućavaju da se dijagnostikuju genetički poremećaji koji liče na GN što omogućava bolje lečenje obolelih.

Cilj: Ispitivanje prisustva polimorfizama jednog nukleotida - single nucleotide polymorphism (SNP) u genima koji kodiraju strukturne proteine bubrega (gen *UMOD* i gen *SHROOM3*), kao i različitih polimorfizama u genima imunskog sistema kod dece sa GN.

Metod: Studija je obuhvatila 71 dete sa GN (40 sa primarnim i 31 sa sekundarnim GN) i 119 zdrave dece. Genotipizirani su SNP u genima *UMOD* (lokus rs12917707), *SHROOM3* (lokus rs17319721), *IL10* (lokusi rs1800871 i rs3024505), *IL6* (lokus rs1800795), *IL12B* (lokus rs3212227), *IL23R* (lokusi rs11209026 i rs1800896) i *TNF* (lokusi rs361525 i rs1800629). Pored toga, analiza sekvenciranja celog egzoma - whole exome sequencing (WES) sprovedena je kod trideset jednog pacijenta sa GN i 50 nefrološki i imunološki zdravih pedijatrijskih pacijenata. Nađene frekvencije alela su upoređene sa bazom podataka GnomAD.

Rezultati: Medijana uzrasta pacijenata bila je 8 godina na početku GN i 14 godina prilikom uzorkovanja krvi za genetičku analizu. Alel A za rs1800629 u genu *TNF* bio je češći kod pacijenata sa GN u poređenju sa zdravom decom ($p=0,009$), uz razliku u distribuciji genotipova ($p=0,021$), gde su genotipovi AA i GA bili češći kod pacijenata. Utvrdili smo statistički značajnu razliku u distribuciji haplotipova između pacijenata i zdravih osoba za gen *TNF*, pri čemu su deca sa GN češće imala haplotip GG/AG, dok su zdrava deca imala češće genotip GG/GG ($p < 0,05$). Nije primećena korelacija između ispitivanih polimorfizama i kliničkih karakteristika pacijenata (početak bolesti, primarni ili sekundarni GN, težina bolesti, pojava remisije i prisustvo hipertenzije). WES analiza je sprovedena kod 10 pacijenata sa primarnim GN, a kod dva (20%) pacijenta je nađena varijanta koja se može povezati sa bolešću. Jedan je imao verovatno patogenu heterozigotnu varijantu u genu *COL4A3* povezanu sa Alportovim sindromom, dok je drugi imao heterozigotnu varijantu neodređenog značaja u genu *CD46* povezanu sa atipičnim hemolitičko-uremijskim sindromom (aHUS). Kod dva od 14 pacijenata sa sistemskim eritematoznim lupusom i GN, otkrivena je heterozigotna patogena varijanta (c.841_849 + 19del) u genu *C2*. Nismo pronašli značajne varijante metodom WES kod sedam pacijenata sa Henoh-Šenlajnovom purpurom i GN.

Zaključak: Kod dece sa GN primećena je asocijacija između gena *TNF* i različitih tipova GN. Ovo saznanje omogućava bolje razumevanje patogeneze GN i potencijalni razvoj novih modaliteta lečenja. Pronalaženje drugih gena podložnosti za nastanak GN omogućava bolje razumevanje patofiziologije bolesti. WES je u ispitivanoj kohorti omogućio da otkrijemo nasledne bolesti, koje imaju kliničku sliku poput GN, uključujući Alportov sindrom i mogući aHUS.

Ključne reči: glomerulonefritis; polimorfizmi jednog nukleotida; sekvenciranje celog egzoma; citokini; faktor tumorske nekroze; Alportov sindrom; atipični hemolitičko-uremijski sindrom; sistemski eritematozni lupus; Henoh-Šenlajnova purpura

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: molekularna medicina

UDK broj: _____

ANALYSIS OF GENETIC PREDISPOSITION FOR THE OCCURRENCE OF CHRONIC, IMMUNE-MEDIATED GLOMERULAR DISEASES IN CHILDREN

Introduction: Glomerulonephritis (GN) is a heterogeneous group of inflammatory diseases of the kidney glomeruli. Primary GN are diseases that affect only the renal glomeruli, while secondary GN occur as part of systemic connective tissue diseases. Next generation genetic methods revealed genes that cause glomerular diseases or that are risk factors for the development of primary and secondary GN. In addition, new methods may diagnose genetic disorders that resemble GN, which allows better treatment in children with GN.

Aim: Investigation of the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding structural proteins of the kidney (the *UMOD* gene and the *SHROOM3* gene), as well as different polymorphisms in the genes of the immune system in children with GN.

Method: The study included 71 children with GN (40 with primary and 31 with secondary GN) and 119 healthy children. SNPs in the genes *UMOD* (locus rs12917707), *SHROOM3* (locus rs17319721), *IL10* (loci rs1800871 and rs3024505), *IL6* (locus rs1800795), *IL12B* (locus rs3212227), *IL23R* (loci rs11209026 and rs1800896) and *TNF* (loci rs361525 and rs1800629) were genotyped. In addition, whole exome sequencing (WES) analysis was performed in thirty-one patients with GN and 50 nephrologically and immunologically healthy pediatric patients. Allele frequencies were compared with the GnomAD database.

Results: The median age of the patients was 8 years at onset of GN and 14 years at the time of blood sampling. The A allele for rs1800629 in the *TNF* gene was more frequent in GN patients compared to healthy children ($p=0.009$), with a difference in genotype distribution ($p=0.021$) where AA and GA genotypes were more frequent in patients. We also found a statistically significant difference in the distribution of haplotypes between patients and healthy individuals for the *TNF* gene, whereby children with GN more often had the GG/AG haplotype, while healthy children had the GG/GG genotype more commonly ($p<0.05$). No correlation was observed between the tested polymorphisms and the clinical characteristics of the patients (onset of the disease, primary or secondary GN, severity of the disease, onset of remission and presence of hypertension). WES analysis was performed in 10 patients with primary GN, and in two (20%) patients we identified possible disease-causing variants. One had a likely pathogenic heterozygous variant in the *COL4A3* gene associated with Alport syndrome, while the other had a heterozygous novel variant of uncertain significance in the *CD46* gene associated with atypical hemolytic uremic syndrome (aHUS). In two of 14 patients with systemic lupus erythematosus and GN, a heterozygous pathogenic variant (c.841_849 + 19del) in the *C2* gene was detected. We did not find significant variants by WES in seven patients with Henoch-Schönlein purpura and GN.

Conclusion: In children with GN, a link between the *TNF* gene and different types of GN was observed. This knowledge allows for a better understanding of GN pathogenesis and the potential development of new treatment modalities. Finding other susceptibility genes for GN allows a better understanding of the pathophysiology of the disease. WES in the studied cohort allowed us to detect hereditary diseases, which have a clinical picture like GN, including Alport syndrome and possible aHUS.

Key words: glomerulonephritis; single nucleotide polymorphisms; whole exome sequencing; cytokines; tumor necrosis factor; Alport syndrome; atypical hemolytic uremic syndrome; systemic lupus erythematosus; Henoch-Schönlein purpura

Scientific field: medicine

Scientific subfield: molecular medicine

UDC number: _____

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Definicija bolesti glomerula	1
1.2. Epidemiologija bolesti glomerula	1
1.3. Klinička slika bolesti glomerula	1
1.4. Biopsija bubrega	2
1.5. Podtipovi glomerulonefritisa i njihova genetička osnova	3
1.5.1. IgA nefropatija	3
1.5.1.1. Geni povezani sa IgA nefropatijom	4
1.5.2. Membranozni glomerulonefritis	5
1.5.2.1. Geni povezani sa membranoznim glomerulonefritisom	6
1.5.3. Bolest sa minimalnim promenama i fokalna segmentna glomeruloskleroza	7
1.5.3.1. Geni povezani sa podložnošću za razvoj bolesti sa minimalnim promenama i FSGS	8
1.5.4. Membranoproliferativni glomerulonefritis	10
1.5.5. Retke forme primarnog glomerulonefritisa	10
1.5.6. Lupus nefritis	11
1.5.6.1. Geni povezani sa lupus nefritisom	11
1.5.7. Glomerulonefritis u sklopu Henoch-Schonlein-ove purpure	11
1.5.7.1. Geni povezani sa glomerulonefritisom u sklopu HSP	12
1.6. Geni povezani sa hroničnom bubrežnom bolešću	12
1.7. Prednosti i nedostaci dosadašnjih studija genetičke asocijacije kod glomerulonefritisa i hronične bubrežne bolesti	14
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	16
3. PACIJENTI I METODE	17
3.1. Pacijenti	17
3.2. Molekularno-genetičke analize	17
3.2.1. Izolacija genomske dezoksiribonukleinske kiseline	17
3.2.2. Analiza genskih polimorfizama metodom polimerazne lančane reakcije u realnom vremenu	18
3.2.3. Sekvenciranje nove generacije	19
3.3. Statističke analize	21
4. REZULTATI	23
4.1. Sociodemografske i kliničke karakteristike ispitanika	23
4.2. Poređenje pacijenata sa primarnim i sekundarnim bolestima glomerula	25
4.3. Uticaj sociodemografskih, kliničkih i laboratorijskih parametara na ishod glomerulonefritisa	26
4.4. Analiza polimorfizama u strukturnim genima bubrega kod pacijenata sa bolestima glomerula u poređenju sa zdravim kontrolama	27
4.5. Analiza polimorfizama u genima imunskog sistema kod pacijenata sa bolestima glomerula u poređenju sa zdravim kontrolama	28
4.6. Povezanost polimorfizama u strukturnim genima bubrega i genima imunskog sistema sa sociodemografskim i kliničkim karakteristikama pacijenata sa bolestima glomerula	31
4.7. Sekvenciranje celog egzoma kod pacijenata sa bolestima glomerula	31
5. DISKUSIJA	36
6. ZAKLJUČCI	43
7. LITERATURA	44

1. UVOD

1.1. DEFINICIJA BOLESTI GLOMERULA

Bolesti glomerula (BG) ili glomerulopatije su heterogena grupa oboljenja, koja primarno zahvataju bubrežne glomerule (1). BG ne moraju nužno imati inflamatornu patogenezu (1). Prema toku, BG se dele na akutne i hronične. Hronične BG mogu da budu primarne i sekundarne.

Primarne glomerulopatije zahvataju samo bubrežne glomerule, dok se sekundarne glomerulopatije javljaju u sklopu drugih bolesti, a najčešće u sklopu sistemskih bolesti vezivnog tkiva i vaskulitisa. Utvrđivanje da li je BG primarna ili sekundarna je od ključne važnosti u lečenju, jer sekundarni glomerulonefritis uglavnom zahteva lečenje osnovne bolesti koja je, između ostalog, dovela i do glomerulopatije (2).

1.2. EPIDEMIOLOGIJA BOLESTI GLOMERULA

Sve pojedinačne forme BG spadaju u retke bolesti. Godišnja incidencija najčešće BG, IgA nefropatije, procenjena je na 2,5 obolelih na 100 000 odraslih stanovnika. Sledeći po učestalosti je membranozni glomerulonefritis sa 1,2 obolelih na 100 000, potom glomerulonefritis sa minimalnim promenama i fokalna segmentna skleroza sa 0,6–0,8 bolesnika na 100 000 stanovnika i, konačno, membranoproliferativni glomerulonefritis sa 0,2 obolelih na 100 000 (3). Stope incidencije za sve forme GN su niže kod dece – oko 1 oboleli na milion stanovnika godišnje, sa izuzetkom bolesti sa minimalnim promenama gde je prijavljena incidencija oko 2 na 100 000 stanovnika godišnje kod belaca i čak više u arapskoj i azijskoj populaciji (3). Međutim, incidencija je potcenjena i kod odraslih i kod dece, jer epidemiološke studije ne uključuju osobe sa asimptomatskim varijantama BG, one čiji glomerulonefritis spontano izlečen i one kod kojih je BG dijagnostikovana u uznapredovaloј fazi kada više nije opravdana biopsija bubrega i kada se više ne zna šta je dovelo do bubrežne insuficijencije.

Hroničnu bolest bubrega ima otprilike svaki deseti čovek u opštoј populaciji (4). Učestalost hronične bubrežne bolesti kod dece je značajno ređa - prevalencija je između 56 i 75 slučajeva na milion dece (5). Glomerulonefritisi su uzrok oko 20% hroničnih bolesti bubrega u većini zemalja. Za razliku od najčešćih uzroka hronične bolesti bubrega kod odraslih (dijabetes melitus i arterijska hipertenzija), BG obično pogađaju mlade ljude. Kod mladih odraslih, glomerulonefritisi su najčešći uzrok završnog stadijuma bubrežne bolesti.

Postoje velike geografske razlike u epidemiologiji glomerulonefritisa. IgA nefropatija je procentualno zastupljenija u azijskim kohortama bolesnika, dok je u kohortama iz SAD i Kanade, najčešća fokalna segmentna glomeruloskleroza. Pored toga, bogatije zemlje imaju veću učestalost IgA nefropatije, dok siromašnije zemlje imaju više slučajeva membranoproliferativnog glomerulonefritisa (6).

1.3. KLINIČKA SLIKA BOLESTI GLOMERULA

Klasični znaci akutnog glomerulonefritisa, kao što su oligurija, edem, hematurija, glavobolja i bol u krstima, postali su veoma retki u većini razvijenih zemalja. Oni su se često javljali oko 2 nedelje nakon streptokoknog faringitisa u sklopu postinfektivnog glomerulonefritisa (2).

Kod većine obolelih u današnje vreme ne postoje specifični klinički znaci glomerulonefritisa (2). Ova činjenica značajno otežava postavljanje dijagnoze. Kod nekih pacijenata se do dijagnoze dolazi zbog prisustva hipertenzije, proteinurije ili hematurije koje se detektuju u rutinskom pregledu urina ili zbog prisustva povišenih vrednosti kreatinina u serumu u rutinskoј laboratoriji. Ređi su slučajevi kod kojih se

javlja naglo povećanje telesne težine i edemi usled nefrotskog sindroma. Još ređe može doći do pojave brzo progresivnog glomerulonefritisa sa značajnom uremijom.

Neke kliničke prezentacije mogu upućivati na određenu dijagnozu (2). Mladi odrasli pacijenti koji su oligosimptomatski (imaju samo hipertenziju i/ili blagi edem) najčešće imaju IgA nefropatiju. Dodatni podatak o makrohematuriji u roku od jednog do dva dana nakon infekcije respiratornog trakta najčešće upućuje na IgA nefropatiju. Kod dece i mladih odraslih prisustvo nefrotskog sindroma sugerise dijagnozu BG sa minimalnim promenama ili dijagnozu fokalne segmentne glomeruloskleroze. Kod odraslih osoba, nefrotski sindrom upućuje na membranozni glomerulonefritis (7).

Dodatni simptomi i znaci se javljaju ako dođe do hronične bolesti bubrega. U tom slučaju se javlja anemija, zamor, mučnina i povraćanje izazvani uremijom, gastroenteritis i drugo.

Dok su klinički znaci BG retko prisutni i nespecifični kada su prisutni, laboratorijske analize su od ključne važnosti za postavljanje dijagnoze, ali su nedovoljne da se odredi podtip BG (2). Glomerulonefritise karakterise različit stepen proteinurije i/ili hematurije. Za procenu ukupne proteinurije kod pacijenata sa BG, potrebno je uzeti 24-časovni urin (8). Kod dece je, sa druge strane, prikladnija analiza odnosa protein-kreatinin u prvom jutarnjem urinu zbog komplikovanog uzorkovanja 24h urina. Rutinska evaluacija sedimenta urina na prisustvo crvenih krvnih zrnaca i/ili akantocita, kao i analiza morfologije eritrocita, preporučuje se kod svih oblika glomerulonefritisa (8).

Preporučuje se da se brzina glomerularne filtracije (eGFR) kod odraslih meri pomoću formule CKD-EPI (engl. *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*), dok se kod dece koristi modifikovana Švarcova jednačina (8). FAS (engl. *Full Age Spectrum*) jednačina može se koristiti i za odrasle i za decu.

Dopunske analize mogu ukazati na podtip BG. Izlučivanje velike količine albumina, bez prisustva proteina visoke molekularne težine u urinu, kod dece ukazuje na prisustvo BG sa minimalnim promenama. Povećano izlučivanje proteina niske molekularne težine kao što je alfa-1-mikroglobulin u urinu sugerise da se BG proširila i na tubularni sistem, oštećujući reapsorpciju takvih proteina u tubule. Ovo predstavlja nepovoljan prognostički znak (9). Oligosimptomatski glomerulonefritis, poput IgA nefropatije, često daje određeni stepen bubrežne insuficijencije već na početku bolesti.

1.4. BIOPSIJA BUBREGA

Definitivna dijagnoza BG i podtipa bolesti postavlja se na osnovu biopsije bubrega, koju treba da opiše nefropatolog (2). Iz tog razloga, biopsija ostaje zlatni standard u dijagnostici BG (8). Biopsija je važna i zbog toga što daje informaciju o postojanju akutne inflamacije u odnosu na hronične ožiljne promene što može usmeriti terapiju. Najčešće je dovoljna svetlosna mikroskopija i imunohistohemija, ali neretko je potrebna i elektronska mikroskopija.

Biopsija bubrega se smatra bezbednom procedurom ukoliko su uslovi za njeno izvođenje optimizovani što podrazumeva nekoliko stvari (2; 10). Neophodno je da biopsiju uzme iskusan lekar. Prethodno je kod pacijenta potrebno proveriti koagulacioni status. Pacijent treba da bude bez antiagregacionih lekova tokom 7 dana. Važno je da ima normalan krvni pritisak i da nema infekciju urinarnog trakta. Biopsija bubrega vođena ultrazvukom je efikasnija i bezbednija (10). U mnogim centrima zahteva se da pacijent posle biopsije bubrega prenoći u bolnici bar jednu noć kako bi se ispratile potencijalne komplikacije (11).

Najčešće komplikacije biopsije bubrega su perirenalni hematomi koji se nalaze u 50-80% bolesnika i prisustvo arteriovenskih fistula koje se sreću kod do 15% pacijenata (11; 12). Ove komplikacije su obično asimptomatske i ne zahtevaju nikakvu intervenciju. Makroskopska hematurija se

javlja kod do 8% slučajeva, ali retko rezultira urinarnom opstrukcijom (11; 12). Ozbiljnije krvarenje koje zahteva transfuziju, hiruršku intervenciju ili nefrektomiju se javlja u manje od 0,5% pacijenata.

Ponovljena biopsija bubrega se sprovodi u retkim situacijama (8). Ona je opravdana ako bi dodatne informacije potencijalno promenile dijagnozu, terapijski plan, ili doprinele proceni prognoze bolesti.

1.5. PODTIPOVI GLOMERULONEFRITISA I NJIHOVA GENETIČKA OSNOVA

Dok klinička slika ima samo mali doprinos u dijagnostici, tačan podtip glomerulonefritisa određuje se na osnovu biopsije bubrega (7). Primarne hronične BG mogu se podeliti na: 1. neproliferativne, kod kojih je broj ćelija glomerula neizmenjen i ispoljavaju se klinički najčešće kao nefrotski sindrom i 2. proliferativne, kod kojih postoji povećanje broja ćelija glomerula, a klinički se najčešće ispoljavaju kao nefritički sindrom i često vode u terminalnu bolest bubrega (1). Najčešće primarne neproliferativne BG su bolest minimalnih promena na glomerulima, fokalna segmentna glomeruloskleroza i membranozni glomerulonefritis, dok su od primarnih proliferativnih bolesti glomerula najčešće IgA nefropatija, membranoproliferativni i postinfektivni glomerulonefritis (2; 13). Sekundarne BG se javljaju u sklopu vaskulitisa (poput *Henoch-Schonlein*-ove purpure) i u sklopu sistemskih bolesti vezivnog tkiva (poput sistemskog eritemskog lupusa) (1).

Određivanje tačnog podtipa BG je od suštinske važnosti u razumevanju patogeneze bolesti i u primeni adekvatne terapije (7). Primena hronične kortikosteroidne i imunosupresivne terapije može biti neefikasna i potencijalno štetna za pacijente sa određenim tipovima glomerulonefritisa. Nekadašnja opisna klasifikacija glomerulonefritisa, zasnovana uglavnom na histološkim obrascima, sve više se menja na osnovu poznavanja novih patogenetskih mehanizama povezanih sa određenim BG (2). Ova promena u klasifikaciji je dovela do razvoja specifičnije terapije BG.

1.5.1. IgA NEFROPATIJA

IgA nefropatija (IgAN) je najčešća forma glomerulonefritisa u razvijenim zemljama (2). Postoji izražena genetička predispozicija za nastanak IgAN u jugoistočnoj Aziji (40-50% svih glomerulonefritisa), srednja prevalencija se viđa u SAD i Evropi (20-30%), a niska rasprostranjenost u Africi (<5%) (14; 15).

IgAN je imunski posredovana bolest deponovanja nedovoljno galaktozilanog, dimernog ili polimernog IgA u glomerularni mezangijum što vodi ka mezangioproliferativnom glomerulonefritisu (16). Takođe, antitela klase IgG ili IgA na nedovoljno galaktozilirani IgA mogu takođe doprineti razvoju IgA nefropatije (17; 18). Naknadna aktivacija sistema komplementa se smatra ključnim faktorom koji doprinosi IgAN (7).

Obično se radi o oligosimptomatskom glomerulonefritisu koji se otkriva slučajno. Mnogi pacijenti imaju benigni tok bolesti (13). U nekim slučajevima može čak doći do spontane remisije bolesti (19).

Lošija prognoza IgAN na duže staze se uglavnom povezuje sa većim stepenom proteinurije, većim stepenom oštećenja bubrežne funkcije i lošijom kontrolom krvnog pritiska u akutnoj fazi (7). Povišen nivo aberantno galaktoziranog IgA1 koreliše sa progresivnijim kliničkim fenotipom i lošijom prognozom IgAN (7).

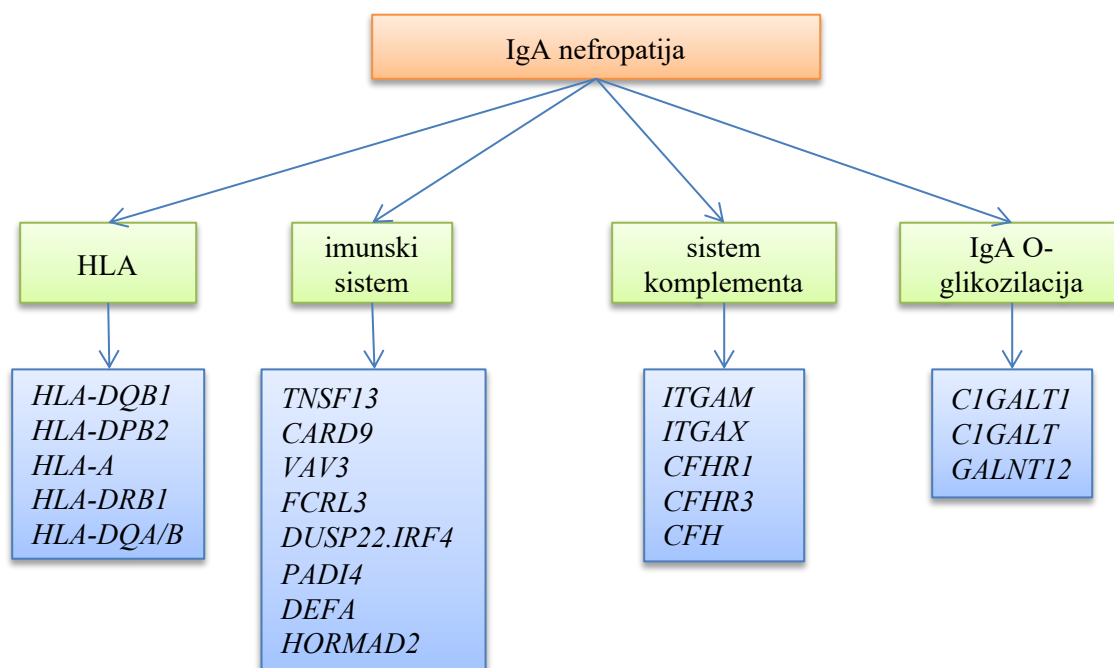
Histopatološki nalaz može biti prediktor ishoda bolesti. U skladu sa tim, Oksford-MEST klasifikacija IgA nefropatije definiše četiri histološka parametra povezana sa progresivnim tokom bolesti: glomerularnu mezangijalnu hipercelularnost (M), endokapilarnu hipercelularnost (E), glomerularnu skleroza ili resaste atezije (S) i tubularnu atrofiju i intersticijalnu bubrežnu fibrozu koja zahvata više od

25% preseka (T) (20; 21). Prisustvo glomerulalnih polumeseca u više od 50% glomerula predstavlja još jedan prediktor lošeg ishoda sa razvojem brzo progresivnog glomerulonefritisa (22). Nažalost, ni jedan od opisanih prediktora nije dovoljno dobar u proceni progresije bolesti (8).

Sve veći broj radova sugerise da imunosupresija nije posebno efikasna kod IgAN. Zato je neophodno bolje poznavanje patogeneze ove bolesti (23). Pojedini autori smatraju da IgA nefropatija pokazuje veću sličnost sa alergijom nego sa autoimunom bolešću, ali su neophodna dopunska ispitivanja da se ova teorija potvrdi. Odsustvo odgovarajućih animalnih modela onemogućava testiranje alergijske teorije (24). U prilog ove teorije ide i činjenica da su epitelna barijera creva i imunski odgovor sluzokoža kritični koraci u patogenezi IgAN (7).

1.5.1.1. GENI POVEZANI SA IgA NEFROPATIJOM

U skladu sa navedenom patogenezi IgAN, geni koji se povezuju sa pojavom podložnosti za nastanak ove bolesti su geni glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (eng. *main histocompatibility complex*, MHC), geni imunskog sistema, geni uključeni u glikozilaciju IgA antitela, geni koji učestvuju u sistemu komplementa, kao i geni kontrolori urođenog imuniteta sluzokože (7; 13; 25; 26). Najznačajniji do sada poznati geni povezani sa IgA nefropatijom su prikazani na Slici 1.1. Karakterističan geografski obrazac incidencije IgAN može biti posledica zaštitne adaptacije na parazitarne crevne infekcije u Aziji što je kao sekundarni problem dovelo do podložnosti razvoju IgAN (7).



Slika 1.1. Geni kandidati povezani sa IgA nefropatijom

Zelene kućice: funkcija proteina. Plave kućice: geni povezani sa određenom kategorijom proteina.

Nekoliko studija asocijacije na nivou čitavog genoma (engl. *genome wide association study*, GWAS) je dokumentovalo značajnu asocijaciju IgAN sa MHC ukazujući na jasnu imunski posredovanu

osnovu IgAN. Meta analiza GWAS podataka u kineskoj i evropskoj populaciji je identifikovala tri nova lokusa podložnosti za IgAN: *FCRL3*, *DUSP22*, *IRF4* i *PADI4* (7). *FCRL3* je gen koji reguliše aktivnost B-limfocita. *DUSP22* kodira enzim koji smanjuje aktivnost MAPK signalnog puta i time kontroliše prekomernu aktivaciju T-limfocita, dok je *IRF4* je transkripcioni faktor ključan za razvoj i funkciju T i B limfocita. Gen *PADI4* kodira enzim koji vrši citrulinaciju proteina i menja njihovu strukturu i imunogenost. Ovi nalazi dodatno potkrepljuju značaj imunskog odgovora u patogenezi IgAN.

Sinteza IgA je olakšana prisustvom faktora aktivacije B-ćelija (B cell activating factor, BAFF) i liganda koji indukuje proliferaciju (a proliferation-inducing ligand, APRIL) (7). Lokus TNFSF13 koji kodira APRIL bio je kod Han Kineza povezan sa razvojem IgAN (7). Terapije koje ciljaju ovaj put u IgAN izgledaju obećavajuće, i primena nekoliko njih je u toku (7). Meta analiza 45 studija u periodu od 2000. do 2021. sa 28.994 zdravih ljudi naspram 20.600 pacijenata sa IgA nefropatijom pokazuje povezanost IgAN sa polimorfizmima u genima *TGFB1*, *IL-1B*, *IL-18* i *TLR1* (27). Ovo istraživanje je potvrdilo da su genetičke varijante povezane sa imunološkim i inflamatornim odgovorom u osnovi IgAN.

Delecija gena *CFHR1* i *CFHR3* gena (*CFHR3-1D*) predstavlja protektivni faktor za razvoj IgAN, posebno u evropskoj populaciji (28). Geni *CFHR1* i *CFHR3* sintetišu proteine slične faktoru H sistema komplementa. Alel *CFH* rs6677604 [A] je bio u neravnoteži vezanosti sa *CFHR3-1D*. Pacijenti sa alelom rs6677604 [A] imaju više nivoe regulatornog proteina komplementa CFH i niži nivo C3a komponente komplementa (7). Dakle, opisani polimorfizam smanjuje aktivnost alternativnog puta sistema komplementa te protektivno deluje na razvoj glomerularne inflamacije sprečavajući mezangijalno taloženje imunskih kompleksa.

Dve GWAS studije su lokalizovale polimorfizme u genima *C1GALT1* i *C1GALT1C1* kao faktore podložnosti za nastanak IgA nefropatije (7). Gen *C1GALT1* kodira jezgro 1 beta1,3-galaktoziltransferaze, ključnog enzima odgovornog za dodavanje galaktoze teškom lancu IgA1. *C1GALT1C1* kodira transmembranski protein koji je sličan produktu koji kodira C1GALT1 (29). Poznato je da su IgA1 aberantno glikozilirani kod pacijenata sa IgAN, pošto na IgA1 O-vezanom glikanu nedostaje deo galaktoze. Studije su pokazale da C1GALT1 i C1GALT1C1 lokusi mogu da objasne oko 7% varijabilnosti u cirkulaciji Gd-IgA1 u evropskim populacijama.

GWAS studija sprovedena na ispitanicima pretežno evropskog porekla ukazala je na signal povezanosti IgAN sa tri nova lokusa *VAV3*, *CARD9* i *ITGAM-ITGAKS* (30). Svi ovi geni su neophodni za održavanje epitelne barijere creva i regulaciju imunskog odgovora sluzokože, što ukazuje na kritične korake u patogenezi IgAN. Klaster *DEFA* gena kodira a-defenzine koji su antimikrobni peptidi uključeni u odbranu površine sluzokože i održavanje crevne homeostaze.

1.5.2. MEMBRANOZNI GLOMERULONEFRITIS

Membranozni glomerulonefritis ili membranozna nefropatija (MN) je prvenstveno bolest sredovečnih i starijih odraslih osoba. Približno 75% slučajeva MN kod odraslih čini primarna MN (7), ali može se javiti sekundarno u sklopu infekcije (npr. hepatitisa B i C), tumora, sistemskih bolesti vezivnog tkiva ili kod upotrebe nekih lekova (npr. zlata i penicilamina, ali i nesteroidnih antiinflamatornih lekova) (2; 31).

Bolest se javlja širom sveta i među različitim rasama (32). Incidencija MN je 1,2 na 100 000 stanovnika u odrasloj populaciji (3). Muškarci su u dvostruko većem riziku da dobiju bolest.

Spekuliše se da povećanje učestalosti MN može biti povezano sa zagađenjem životne sredine (33). Bubrezi su naročito podložni oštećenju usled toksina, jer se u ovom organu oni akumuliraju pri filtraciji. Velika kohortna studija koja je uključila dva miliona američkih veterana pokazala je da je dugoročno izloženost PM_{2,5}, PM₁₀, azot-dioksidu i ugljen-monoksidu faktor rizika za MN.

Oko 70-80% pacijenata bele rase sa primarnom MN ima autoantitela klase IgG4 a ređe IgG3 na receptor fosfolipaze-A2 (PLA_{2R}) (34; 35). Ova antitela se mogu detektovati u vidu imunskih kompleksa

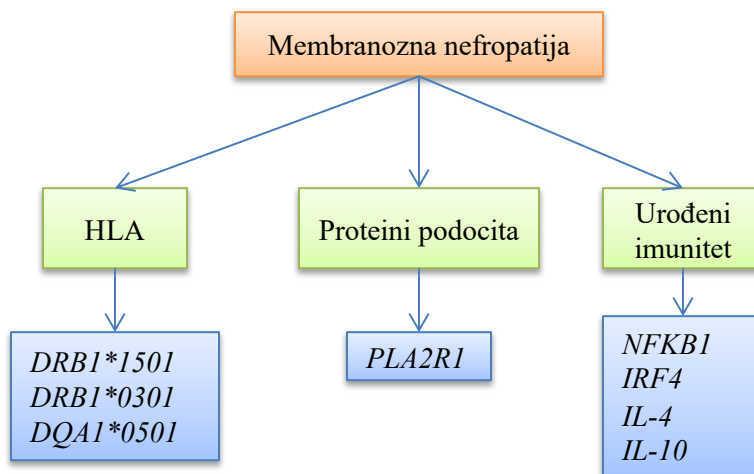
na glomerularnim podocitima i u vidu subepitelnih imunskih depozita i mogu dovesti do aktivacije sistema komplementa (34; 36; 37). Titar ovih antitela je povezan sa aktivnošću bolesti i prediktor je prognoze i odgovora na terapiju (38; 39; 40; 41; 42). Smanjenje titra antitela tokom lečenja često prethodi redukciji proteinurije (43) što predstavlja dobar rani biomarker odgovara na terapiju. Sve ovo svrstava MN u jasno definisanu grupu autoimunih bolesti. Međutim, antitela na PLA2R se nekada mogu javiti i kod sekundarnih MN. Ređe (2-3%) se kod pacijenata sa MN nalaze antitela na trombospondin tip-1 domen koji sadrži 7A (THSD7A) (44; 32). Druga antitela potencijalno važna za nastanak MN se stalno prijavljuju, ali je nepoznat njihov patogenetski značaj. Pojedine studije pokazuju da MN kod dece povezan sa Sema3B antitelima (45).

Bolest se često manifestuje kao nefrotski sindrom sa ili bez smanjenja brzine glomerularne filtracije. MN je važan uzrok nefrotskog sindroma, ali redak uzrok hronične bubrežne insuficijencije (7). Spontana remisija se javlja kod do trećine pacijenata sa MN posle prosečno 14 meseci, čak i ako je početna prezentacija u vidu masivne proteinurije (46). Ovaj podatak opravdava stav nekih nefrologa koji čekaju šest meseci pre nego što se odluče za imunosupresivnu terapiju. Naravno, ako je smanjenje glomerularne filtracije brzo ili je život pacijenta ugrožen zbog komplikacija nefrotskog sindroma, terapija se uvodi ranije (47). Pacijenti koji su negativni na PLA2R ili THSD7A autoantitela pokazuju veliku verovatnoću spontane remisije, ali treba da se isprate u pogledu maligniteta kao i svi drugi pacijenti sa MN (48). Najčešće se sreće karcinom pluća i kolona (31). Rizik od tromboembolije kod pacijenata sa nefrotskim sindromom je visok (2).

Biopsija bubrega više nije potrebna da se potvrdi dijagnoza MN kod pacijenata sa nefrotskim sindromom i pozitivnim PLA2R antitelima (8; 49). Ipak, biopsija bubrega daje važne dodatne informacije čak i u ovom slučaju. Kod dece se obično ne radi biopsija bubrega u slučaju pojave nefrotskog sindroma, jer se pretpostavlja da imaju bolest sa minimalnim promenama koja će dobro reagovati na kortikosteroide (tzv. nefrotski sindrom osetljiv na steroide) (8). Pacijenti koji su rezistentni na ovu terapiju, trebalo bi da se podvrgnu opsežnijoj dijagnostici, uključujući biopsiju bubrega i genetičko testiranje. Nalaz PLA2R antitela na podocitima na patohistološkom nalazu bubrega može pomoći u postavljanju dijagnoze membranoznog glomerulonefritisa.

1.5.2.1. GENI POVEZANI SA MEMBRANOZNIM GLOMERULONEFRITISOM

Rezultati tri velike studije asocijacije u celom genomu (GWAS) kod evropskih pacijenata sa patohistološki dokazanom MN objavljeni su 2011. godine (7; 50; 51). Ova istraživanja konzistentno pokazuju da su polimorfizmi u genu koji kodira podocitni antigen PLA2R1 i u genu *HLA-DQA1* udruženi sa pojavom MN (Slika 1.2).



Slika 1.2. Geni kandidati povezani sa membranoznim glomerulonefritisom

Zelene kućice: funkcija proteina. Plave kućice: geni povezani sa određenom kategorijom proteina.

Rezultati su uspešno replicirani u studiji iz 2017, a pokazano je da je *HLA-DQA1* varijanta bila u značajnoj vezi i sa lupus nefritisom, hroničnom bolešću bubrega kod dijabetes melitusa tipa 1 i kod fokalne segmentne glomeruloskleroze (52). Prisustvo kombinovanih alela rizika u genu *HLA-DQA1* i *PLA2R* povećava rizik od primarne MN do 80 puta kod belaca i do 30 puta kod Han Kineza (50; 53). *HLA* kodira proteinske receptore koji olakšavaju interakciju tokom procesa prezentacije antigena, što doprinosi da T-ćelije podstaknu proizvodnju anti-*PLA2R* antitela koja su povezana sa MN (53). Kod bele populacije je i prisustvo varijanti u genima *HLA-DRB3* i *DRB1* bilo povezano sa MN (32; 54; 33).

Najveća multinacionalna GWAS za primarni MN uključila je 12 820 pojedinaca (3782 obolelih i 9038 zdravih kontrola) azijskog i evropskog porekla. Studija je pokazala dva nova lokusa povezana sa MN, koji kodiraju proteine značajne za urođeni imunitet - *NFKB1* i *IRF4* (54). Gen *NFKB1* kodira aktivnu podjedinicu NF- κ B koja se vezuje za regulator transkripcije koji se aktivira citokinima, stimulišući zapaljenski odgovor. Uočena varijanta rs9405192 se nalazi uzvodno od gena *IRF4*, koji kodira transkripcioni faktor koji reguliše interferonom stimulisanu gene. Ove varijante uz varijante u *HLA* lokusima čine skoro jednu trećinu rizika od MN ukazujući na jaku genetičku osnovu bolesti (54). Ovo otkriće takođe sugerise da su NF- κ B i interferonski putevi moguće mete za razvoj lekova za MN.

Polimorfne varijante u genima *IL-4* i *IL-10* su takođe povezane sa patogenezoj MN (55). *IL-4* je citokin koji proizvode aktivirane T ćelije i mastociti. *IL-10* prvenstveno proizvode Th2 ćelije koje imaju imunoregulatornu ulogu tako što inhibišu makrofage (56).

1.5.3. BOLEST SA MINIMALNIM PROMENAMA I FOKALNA SEGMENTNA GLOMERULOSKLEROZA

Najverovatnije je da su bolest sa minimalnim promenama (BMP) i fokalna segmentna glomeruloskleroza (FSGS) deo spektra jedne iste bolesti te da BMP predstavlja najblažu, a FSGS najtežu prezentaciju oboljenja (2). BMP je najčešći uzrok nefrotskog sindroma u detinjstvu (sa 10-50 obolelih na 100 000 stanovnika), ali se može javiti i kod odraslih (2; 32). U dečjoj populaciji bolest češće pogađa dečake nego devojčice (2:1), a ovaj odnos nestaje kod odraslih i približava se odnosu 1:1 (57). Afroamerikanci pokazuju povećan rizik od razvoja FSGS u poređenju sa drugim populacijama (58).

FSGS može biti primarna, sekundarna i genetički uslovljena. Predložena nova klasifikacija FSGS (8) eliminiše raniji termin idiopatska FSGS i koristi termin primarna FSGS ako je bolest verovatno uzrokovana još neidentifikovanim toksičnim faktorom. Novi sistem dodaje kategoriju FSGS neutvrđenog uzroka. Ovi pacijenti imaju FSGS leziju na biopsiji bubrega, ali nemaju prepoznat uzrok FSGS ili nemaju kliničke karakteristike primarnog FSGS. Sam termin FSGS patolozi često koriste da bi označili postojanje ožiljka na glomerulu, koji se može javiti nakon bilo koje bolesti bubrega (2). Sekundarni oblici se javljaju u sklopu atopije ili maligniteta, posebno limfoma. Pojedini oblici FSGF povezani su sa glomerularnom hiperfiltracijom i hipertrofijom, recimo kod gojaznosti ili kod smanjene mase nefrona (usled urođenog ili jatrogenog nedostatka značajne bubrežne mase) (2). Konačno, FSGS može biti posledica toksičnih efekata lekova (npr. anaboličkih steroida) ili virusne infekcije (poput HIV) (2; 59).

Razmatran je i mogući genetički uzrok bolesti zbog agregacije u pojedinim porodicama (60). Četiri gena (*NHSP1*, *NHSP2*, *VT1* i *LAMB2*) objašnjavaju 75% BMP kod dece. Svi ovi geni su uključeni u funkcionisanje podocita. Sva deca koja imaju nefrotski sindrom u prvoj godini života imaju uzročne varijante u ovim genima (61). Ove forme FSGS se nasleđuju autozomno recesivno (62; 63; 64). Genetički uzroci autozomno dominantnih formi FSGS su uzročne varijante u genima *ACTN4*, *INF2*, *TRPC6* i genima za kolagen 4 (*COL4A3–5*). Ovi geni su glavni uzrok FSGS u populaciji odraslih neafroamerikanaca (7; 65; 66). Pojedini autori predlažu genetičku analizu kod odraslih pacijenata sa FSGS, ne samo kod dece, naročito ako postoji rezistencija na steroide (67; 68). U jednom istraživanju u porodicama sa nefrotskim sindromom rezistentnim na steroide koji počinje pre 25. godine, monogenska bolest je otkrivena kod 526 (30%) od 1783 pacijenata (69). Prisustvo uzročnih varijanti u svim gore navedenim genima utiče na disorganizaciju podocita sa oštećenjem glomerularne membrane.

U osnovi patogeneze ove bolesti je oštećenje i posledični gubitak podocita. Drugi centralni događaj je aktivacija parijetalnih epitelnih ćelija Boumanove kapsule, koje migriraju na glomerularni čuperak gde zamenjuju ili izmeštaju podocite (70). Parijetalne ćelije, za razliku od podocita, nisu u stanju da proizvedu dovoljnu količinu vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) što izaziva endotelne probleme, sa oštećenjem kapilara i nastankom ožiljka (71). Nefrin, ključni protein koji je neophodan za održavanje glomerularne membrane je najznačajniji kandidat za patologiju BMP. Pregled biopsija bubrega je pokazao gubitak nefrina u 34% uzoraka, što je povezano sa manjom verovatnoćom remisije (72). Imune ćelije igraju ulogu u patologiji BMP, pri čemu su T ćelije, B ćelije i disfunkcionalne T regulatorne ćelije identifikovane u humanom i animalnom modelu bolesti (73).

Bolest se obično prezentuje kao nefrotski sindrom, najčešće iznenadnog početka. Pacijenti imaju značajnu proteinuriju (32).

Biopsija bubrega nije neophodna kod dece, ali je neophodna kod odraslih sa BMP (8). Na histološkom nalazu nema znakova oštećenja glomerula i nema imunskih depozita (32). Na elektronskoj mikroskopiji uočava se oštećenje prstastih produžetaka podocita (32).

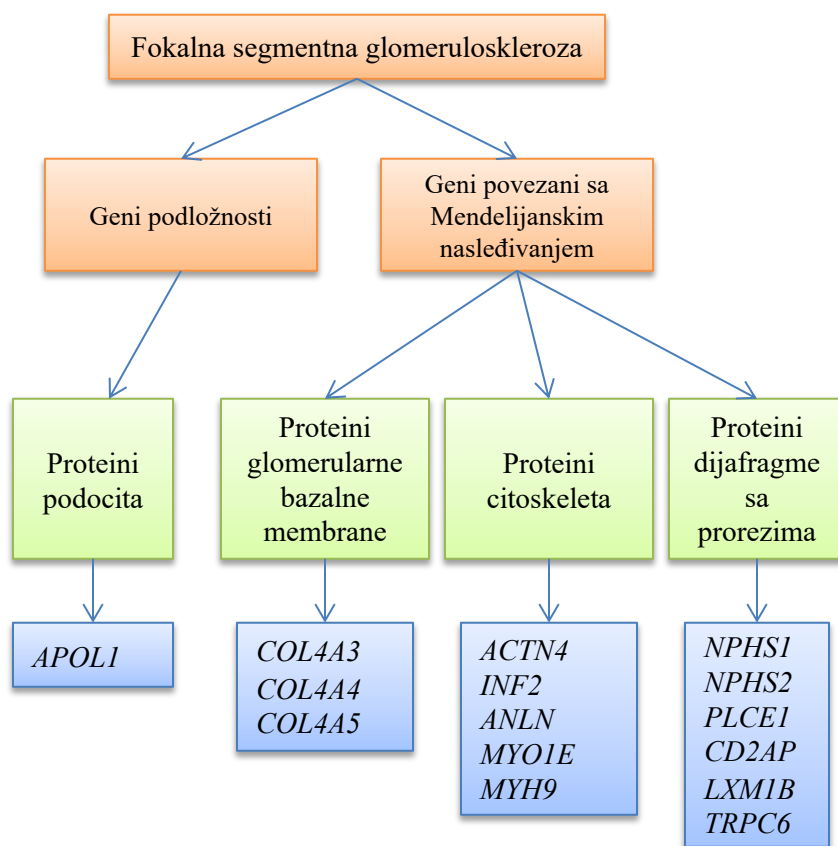
Lečenje BMP i FSGS obično podrazumeva primenu kortikosteroida. Produženi tretman visokim dozama leka potreban je kod FSGS (47). Pojedini pacijenti su rezistentni na kortikosteroide ili imaju česte relapse bolesti. Osobe sa rezistentnom formom bolesti progrediraju ka hroničnoj bubrežnoj insuficijenciji (7). Pacijenti sa genetičkom formom bolesti ne odgovaraju na kortikoterapiju i kod njih se rekurentno bolest ne javlja nakon transplantacije (7). Zato je važno na vreme utvrditi uzrok FSGS.

1.5.3.1. GENI POVEZANI SA PODLOŽNOŠĆU ZA RAZVOJ BOLESTI SA MINIMALNIM BUBREŽNIM PROMENAMA I FOKALNE SEGMENTNE GLOMERULOSKLEROZE

Pored gore navedenog autozomno recesivnog i autozomno dominantnog mehanizma nasleđivanja, kod pojedinih pacijenata sa primarnom FSGS identifikovani su geni podložnosti za razvoj bolesti (Slika 1.3). Najbolje proučeni gen je *APOL1*, koji kodira apolipoprotein L1 (7). Povezanost

varijanti u ovom genu značajno povećava rizik od FSGS kod Afroamerikanaca. (74; 75; 76; 77; 78), uključujući G1 i G2 varijantu. Ove varijante su nastale kao protektivni mehanizam za zaštitu od afričke tripanozomijaze (79). Izmenjeni APOL1 protein utiče na mitohondrijalnu funkciju, aktivaciju inflamazoma i izmenjen endolizozomski trafficking što uzrokuje citotoksičnost i posledično funkcionalno i strukturno oštećenje podocita (79). Visokorizični APOL1 genotip ne samo da je povezan sa razvojem FSGS već i sa nastankom hipertenzivne nefropatije, nefropatije povezane sa HIV i sa lupus nefritisom, kao i sa razvojem bubrežne insuficijencije (7; 80; 81; 82; 83). Zato se u poslednje vreme govori o APOL1 spektru bolesti (84).

U populaciji dece afroameričkog porekla sa FSGS, pored gena *APOL1*, uočena je povezanost bolesti sa genima koji su već opisivani kod odraslih sa bolestima bubrega, poput *ALMS1* i *FGFR4* (58). Pored toga, opisani su i novi funkcionalno relevantni geni, uključujući *GRB2* (koji kodira protein koji promovira strukturu podocita kroz polimerizaciju aktina) i *ITGB1* (koji je povezan sa reparacijom bubrega). Rezultati ukazuju i na veliku ulogu gena imunskog sistema poput HLA-DRB1 alela i gena *PTPRJ*, koji igra ulogu u signalizaciji receptora T-ćelija (58).



Slika 1.3. Geni povezani sa fokalnom segmentnom glomerulosklerozom

Zelene kućice: funkcija proteina. Plave kućice: geni povezani sa određenom kategorijom proteina.

1.5.4. MEMBRANOPROLIFERATIVNI GLOMERULONEFRITIS

Membranoproliferativni glomerulonefritis (MPGN) je morfološki obrazac bubrežnog oštećenja u kontekstu aktivacije komplementa i taloženja imunskih kompleksa i strogo govoreći nije posebna bolest (2; 13). Termin će se verovatno potpuno ukinuti tokom vremena zbog razvoja nomenklature, koja je više određena uzrocima.

Prema etiologiji MPGN može biti primarni i sekundarni. Oko četvrtine pacijenata sa ovom bolešću u osnovi ima hepatitis B ili C, a druga četvrtina monoklonsku gamopatiju ili limfom (85). Odrasli sa MPGN najčešće imaju sekundarnu formu bolesti (13). Klasična histopatološka klasifikacija bolesti deli na tri tipa. MPGN tipa 1 se karakteriše slabim taloženjem C3 ili nepravilnim obrascem taloženja Ig (32). Postao je retka bolest u većini razvijenih zemalja (2). Pomenuta klasifikacija uključivala je i MPGN tipa 2 (bolest gustih depozita na elektronskoj mikroskopiji, pretežno ili uglavnom deponovanje C3) i MPGN tipa 3 (sa malo depozita).

Nova terminologija predlaže razlikovanje dva tipa MPGN – jednog posredovanog imunoglobulinima i drugog posredovanog komplementom (2; 86). MPGN posredovan komplementom naziva se i C3 glomerulopatija, jer se karakteriše povećanom aktivnošću alternativnog puta komplementa. C3 glomerulopatija uključuje bolest gustih depozita i C3 glomerulonefritis kod kog postoje depoziti ali su normalne gustine (87; 88; 89; 90). U poređenju sa pacijentima sa C3 glomerulonefritsom, oboleli sa bolešću gustih depozita su obično mlađi, imaju niže koncentracije C3 u serumu, opsežnije oštećenja bubrežne funkcije i veći rizik od smanjenja brzine glomerularne filtracije (91). U jednom istraživanju genetička analiza omogućila je identifikaciju uzročnih mutacija koje leže u osnovi C3 glomerulonefritisa u 13 (43%) od 30 slučajeva (92). Kod pacijenata se najčešće nalaze mutacija faktora H komplementa (CFH), ali i faktora B, I i FH (93; 94). Sporadična forma MPGN povezana je sa HLA lokusom, uključujući haplotipove DQA1*05:01, DQB1*02:01 i DRB1*03:01 (95).

C3 glomerulopatija se javlja sa incidencijom od 1-3 pacijenta na milion stanovnika. Iako je prisutna u starijoj populaciji, češće se nalazi u detinjstvu i adolescenciji (96).

Smernice preporučuju kombinovani tretman C3 glomerulopatije kortikosteroidima i mikofenolat mofetilom ili ciklofosfamid kod pacijenata sa nefrotskim sindromom sa progresivnim smanjenjem brzine glomerularne filtracije (2). Prognoza C3 glomerulopatije je loša i bolest se vraća i posle transplantacije bubrega kod oko 60-70% pacijenata sa C3 glomerulonefritsom i više od 90% kod onih sa bolešću gustih depozita (97).

1.5.5. RETKE FORME PRIMARNOG GLOMERULONEFRITISA

Pedijatrijski nefrotski sindrom osetljiv na steroide (pSSNS) ima incidenciju 1 do 17 slučajeva na 100 000 dece i javlja se uglavnom na jugu Azije (98; 99). Bolest daje masivnu proteinuriju i povećava rizik od tromboembolije, sepse i može progredirati do hronične bolesti bubrega (3; 100). Bolest se čak može javiti ponovo i u alograftu nakon transplantacije (80). Pacijenti koji su imali pSSNS u detinjstvu mogu imati kasnije relapse bolesti u odraslom dobu (74). Prethodne studije asocijacije na nivou genoma identifikovale su lokus rizika u regionu HLA klase II i dodatne lokuse van HLA koji su uključeni u imunski odgovor, kao i varijante u genima *NPHS1* i *TNFSF15* (58; 101).

Bolest sa antitelima na antigene glomerularne bazalne membrane pogađa sve starosne grupe. Stariji pacijenti obično imaju blažu bolest. Bolest se razvija kao rezultat konformacionih promena u a3NC1 i a5NC1 podjedinicama kolagena IV uzrokovanim antitelima (2; 102; 103; 104). Ova bolest se može javiti kao striktno bubrežna bolest ili udruženo sa krvarenjem u plućima (Goodpasture-ova bolest). Lečenje bolesti membrane treba započeti što pre, koristeći kortikosteroide, ciklofosfamid i plazmaferezu (2; 47).

C1q nefropatija je uzrokovana mezangijalnim ili glomerularnim kapilarnim naslagama C1q (2). Klinička slika se kreće od minimalnog nalaza u urinu do nefrotskog sindroma (105). Histološki nalaz ide od bolesti minimalnih promena, preko FSGS do glomerulonefritisa sa imunskim kompleksima. Pacijenti sa nalazom FSGS mogu dospeti na dijalizu.

Fibrilarni glomerulonefritis je bolest nepoznatog uzroka povezana sa malignitetima, paraproteinemijom i drugim autoimunom bolestima (106). Proteinurija je često nefrotskog ranga (2). Polovina pacijenata napreduje do završnog stadijuma bubrežne bolesti, sa čestim recidivom bolesti čak i nakon transplantacije. Ne zna se da li imunosupresija i rituksimab utiču na tok ove bolesti (107).

1.5.6. LUPUS NEFRITIS

Lupus nefritis (LN) je autoimuna bolest koja je devet do deset puta češća kod žena nego muškaraca (32). Uglavnom se javlja u reproduktivnom periodu. Azijati i Afroamerikanci imaju veći rizik da razviju LN u poređenju sa belcima.

Kliničke manifestacije LN su često suptilne i najčešće se otkrivaju pregledom urina (108). Stoga, sve pacijente sa sistemskim eritemskim lupusom (SLE) treba testirati na zahvaćenost bubrega pri početnom postavljanju dijagnoze i najmanje jednom godišnje nakon toga, čak i ako nemaju simptome bolesti bubrega. Procena je jednostavna i trebalo bi da uključuje analizu urina i merenje funkcije bubrega, prvenstveno koncentraciju kreatinina u serumu i procenjenju brzinu glomerularne filtracije.

Klinički prag za izvođenje biopsije bubrega nije dobro definisan, ali predlaže se izvođenje biopsije ako je proteinurija ≥ 500 mg/dan, sa ili bez drugih kliničkih abnormalnosti, ili bilo koji nivo proteinurije ili hematurije sa oštećenom funkcijom bubrega, koji se ne može pripisati drugom uzroku.

Svi aktuelni široko prihvaćeni režimi lečenja LN uključuju visoke doze kortikosteroida za brzu kontrolu zapaljenskog procesa i mikofenolat mofetil ili ciklofosfamid (47; 109). Svi pacijenti (osim ako ne postoje kontraindikacije) treba da budu lečeni i antimalarikom. Imunosupresivi visokog intenziteta se daju tokom prvih 3–6 meseci, a zatim se zamenjuju mikofenolat mofetilom (ili nižom dozom mikofenolat mofetila ako je korišćen za indukciju) ili azatioprinom da bi se održala imunosupresija.

1.5.6.1. GENI POVEZANI SA LUPUS NEFRITISOM

Studije genetičke asocijacije su identifikovale preko pedeset polimorfizama u genima, koji mogu biti u osnovi patogeneze LN (110). Ovi geni su uključeni u puteve povezane sa programiranom ćelijskom smrću i imunološkim klirensom ostataka nakon ćelijske smrti. Niz polimorfizama povezan je sa svim fazama imuniteta, od urođenog imuniteta do adaptivne faze imunskog odgovora (32).

HLA polimorfizmi su bili prvi genetički faktori povezani sa LN. Aleli DR15 i DR3 su faktori rizika za razvoj LN, a DR4 i DR11 protektivni faktori (32). Geni značajni za interferonsko signaliziranje su takođe povezani sa LN, uključujući gene *IFNG*, *STAT4* i *BANK1* (32). Ovaj put je značajan jer vodi do sazrevanja Th1 ćelija koje su važne efektorske ćelije kod LN (32). Smanjena produkcija IFN inhibiše razvoj Th1 ćelija i ide u pravcu predominacije Th2 ćelija, koje nadalje proizvode IL4 i posredno IgG4 antitela koja se mogu deponovati u mikrocirkulaciji i bazalnoj membrani glomerula što može dovesti do pojave MN (32).

1.5.7. GLOMERULONEFRITIS U SKLOPU *HENOCH-SCHONLEIN*-OVE PURPURE

Henoch-Schonlein-ova purpura (HSP) je sistemski IgA vaskulitis uzrokovan taloženjem imunih kompleksa i aktivacijom komplementa u malim krvnim sudovima, uključujući bubrežne glomerule

(111). Radi se o reakciji hipersenzitivnosti. Klinička prezentacija IgA vaskulitisa klasično uključuje kombinaciju kožnog vaskulitisa, artritisa, gastrointestinalnih i bubrežnih simptoma, a pacijenti mogu imati relapsno-remitentni tok bolesti. Retke varijante mogu zahvatiti pluća ili centralni nervni sistem (CNS) ili biti ograničene na kožu (purpura) ili bubrege (IgA nefropatija).

Oko 90% slučajeva IgA vaskulitisa javlja se kod dece između 3. i 15. godine, sa prosečnom starošću obolelih od 6 godina (112; 113). IgA vaskulitis je najčešći sistemski vaskulitis, sa procenjenom globalnom incidencom u 2019. od 3-27 na 100 000 (111; 112). U populacionoj studiji u Velikoj Britaniji, godišnja incidencija je bila približno 20 na 100 000 kod dece mlađe od 17 godina (114). U SAD, godišnja incidenca IgA vaskulitisa je približno 3-27 slučajeva na 100 000 kod dece i odojčadi (112). Na severnoj hemisferi, IgA vaskulitis se javlja uglavnom između novembra i januara zbog učestalosti respiratornih infekcija.

Kada je klinička slika tipična, klinički nalazi palpabilne purpure bez trombocitopenije ili koagulopatije i dve ili tri preostale kliničke karakteristike: artritis ili artralgija, bol u stomaku i bubrežna bolest upućuju na dijagnozu IgA vaskulitisa (112; 115). Nivoi IgA u serumu su povećani kod 50–70% pacijenata sa IgA vaskulitisom, a visoki nivoi su povezani sa IgA nefropatijom (116; 117). Nalazi iz rutinskih testova krvi mogu biti nespecifični, zbog čega je biopsija sa histopatologijom, koja pokazuje leukocitoklastični vaskulitis, pretežno u postkapilarnim venulama, i imunohistohemija ili imunofluorescencija na IgA od suštinskog značaja za dijagnozu. Imunohistohemija i imunofluorescencija mogu da identifikuju IgA imune komplekse.

Biopsija bubrega se može uraditi ako je dijagnoza nejasna ili postoje klinički dokazi zahvaćenosti bubrega. Svetlosna mikroskopija IgA nefropatije može da varira od mezangijalne proliferacije do teškog polumesečastog glomerulonefritisa (118; 119). Imunofluorescencija pokazuje IgA, C3, fibrin, IgG i, ređe, IgM u bubrežnim glomerularnim kapilarama i mezangijalnim ćelijama. Elektronska mikroskopija takođe može pokazati subepitelne i mezangijalne naslage koje se protežu u subendotelna područja.

1.5.7.1. GENI POVEZANI SA GLOMERULONEFRITISOM U SKLOPU *HENOCH-SCHONLEIN-OVE* PURPURE

Genetičke epidemiološke studije su pokazale da su polimorfizmi u genima HLA lokusa i genima imunskog sistema povezani sa IgA vaskulitisom (120; 121; 122). Najznačajnija asocijacija HSP je uočena sa alelima HLA-DRB1 01, HLA-DRB1 07 i HLA-DRB1 11 (123; 124). Identifikovane su i asocijacije sa polimorfizmima u genima koji kodiraju endotelnu sintazu azot oksida (eNOS), interleukin-18 (IL-18) i enzim koji konvertuje angiotenzin (ACE) (115; 125). Učestalost polimorfizma rs6677604-A u genu koji kodira H komponentu komplekta veća je kod pacijenata sa HSP u odnosu na opštu populaciju (101).

1.6. GENI POVEZANI SA HRONIČNOM BUBREŽNOM BOLEŠĆU

Hronična bubrežna bolest (HBB) se definiše kao trajno oštećenje strukture i/ili funkcije bubrega (84; 126). Kriterijumi za postavljanje dijagnoze HBB su smanjenje procenjene brzine glomerularne filtracije (eGFR) na <60 ml/min/1,73 m², prisustva proteinurije sa odnosom albumin – kreatinin ≥ 30 mg/g i/ili prisustvo abnormalnosti uočene snimanjem ili patohistologijom (84; 126). HBB postaje sve veći problem usled rastuće incidencije i prevalencije širom sveta (127). HBB može napredovati do terminalne bubrežne bolesti (TBB), koja zahteva dijalizu ili transplantaciju, a takođe je udružena sa metaboličkim poremećajima i povećava rizik od kardiovaskularnog morbiditeta i mortaliteta (128; 129). HBB je jedan od vodećih uzroka smrti (130) i pokazuje jedan od najvećih porasta mortaliteta koji se može pripisati bolesti u poslednjoj deceniji (131). Glomerulonefritisi mogu progredirati ka HBB i TBB.

Kao što često nije poznat uzrok samih primarnih i sekundarnih BG, tako su nejasno definisani i faktori koji dovode do progresije BG u TBB kod pojedinih osoba, dok kod drugih postoji samo blag poremećaj bubrežne funkcije, minimalna proteinurija i/ili mikrohematurija (2). Smatra se da su prognostički faktori lošeg ishoda gojaznost, arterijska hipertenzija, dijabetes melitus i pušenje duvana, ali je značaj ovih faktora očekivano veći kod odraslih u odnosu na pedijatrijsku populaciju. Jedna od značajnijih studija je studija kohorte hronične bubrežne insuficijencije (CRIC) - tekuća, višecentrična, longitudinalna studija koja obuhvata od skoro 5500 odraslih sa HBB u Sjedinjenim Državama (132). Potencijalni faktori rizika su grupisani u šest kategorija: (1) sociodemografski i ekonomski (pol, rasa/etnička pripadnost i nefrološka nega); (2) ponašanje (zdrav način života, ishrana i spavanje); (3) genetički (apoL1, geni iz studija asocijacije na nivou genoma i geni renin angiotenzin aldosteronskog sistema); (4) kardiovaskularni (atrijalna fibrilacija, hipertenzija i vaskularna rigidnost); (5) metabolički (faktor rasta fibroblasta 23 i oksalat u urinu); i (6) novi faktori (akutna bubrežna povreda i biomarkeri povrede bubrega). Podaci ukazuju da kod odraslih, a posebno kod dece, značajnu ulogu igra genetička predispozicija (2; 84; 133).

Visokorizični pacijenti sa glomerulonefritisom koji idu ka HBB su obično oni sa arterijskom hipertenzijom, klinički značajnom proteinurijom (tj. >1 g/dan kod onih sa IgA nefropatijom ili >3,5 g/dan kod onih sa ostalim formama glomerulonefritisa), smanjenom procenjenom brzinom glomerularne filtracije i patohistološkim prisustvom skleroze i fibroze (2). Proteinurija koja se održava preko 6-24 meseci je moćan prediktor lošeg ishoda.

Geni koji definišu HBB se uglavnom ne preklapaju sa onima koji su identifikovani kao geni podložnosti specifičnih bubrežnih bolesti koje vode u HBB (84). Dosadašnja istraživanja identifikuju dve različite grupe gena u kojima određene varijante mogu dati podložnost za obolevanje od HBB (134; 135). Studije asocijacije u čitavom genomu (*GWAS*) pokazuju da je više od 50 genskih lokusa udruženo sa jačinom glomerularne filtracije, nastankom hronične bubrežne bolesti i TBB (134; 136).

Prva grupa su geni koji kodiraju proteine bubrega, gde se u studijama konzistentno izdvajaju polimorfizmi u genima *UMOD* i *SHROOM3* (*SHROOM* Family Member 3). Gen *UMOD* kodira protein uromodulin (*Tamm-Horsfall*-ov protein), koji sintetišu epitelne ćelije ushodnog kraka Henleove petlje i koji je najzastupljeniji protein u urinu čoveka. On je najverovatnije protektivan za inflamaciju i infekciju urinarnog trakta, kao i za nastanak bubrežnih kamenaca (137). Mutacije u ovom genu daju retke autozomno dominantne bolesti bubrega poput medularne cistične bolesti bubrega tipa 2, familijarne juvenilne hiperuremijske nefropatije i glomerulocistične bolesti bubrega (138; 139; 140). *Knock-out UMOD* miševi imaju za 63% niži klirens kreatinina nego zdravi miševi (141). U *GWAS* studijama i manjim studijama gena kandidata, pokazana je udruženost polimorfizama u genu *UMOD* sa jačinom glomerularne filtracije i nastankom hronične bubrežne bolesti različite etiologije kod kavkazoida (polimorfizam rs12917707), azijata (polimorfizam rs11864909) i afričke populacije (rs4293393) (134; 135; 142; 143). *UMOD* je pokazao jaču povezanost sa bubrežnom funkcijom kod starijih osoba i efekat varijanti u genu *UMOD* raste sa godinama (134).

Gen *SHROOM3* kodira protein koji se vezuje za F-aktin i održava citoarhitekturu podocita. Polimorfizmi u genu *SHROOM3* povezani su sa jačinom glomerularne filtracije, HBB i TBB kod kavkazoida (polimorfizam rs17319721), azijata (polimorfizam rs13146355) i Afroamerikanaca (135; 144; 145; 146). *Knock-out SHROOM3* miševi imaju glomerularne promene i patološki izmenjene podocyte, a heterozigoti sa jednim neaktivnim alelom razvijaju bubrežnu bolest u odraslom dobu (147).

Kombinovanjem međunarodnih podataka od preko 60000 pojedinaica identifikovana je varijanta povezana sa bubrežnom funkcijom u genu *CUBN* koji kodira protein kubilin (148). Kubilin posreduje u ponovnom preuzimanju filtriranog albumina u proksimalnom delu tubula (149). Mutacije u ovom genu mogu izazvati Imerslund-Grasbekov sindrom (takođe poznat kao megaloblastna anemija tipa 1), koji je udružen sa proteinurijom.

Pored gore navedenih gena, preko 300 različitih genskih lokusa je povezano sa funkcijom bubrega, a najvažniji su dati u tabeli (150; 151). Meta-analiza studija asocijacije u celom genomu

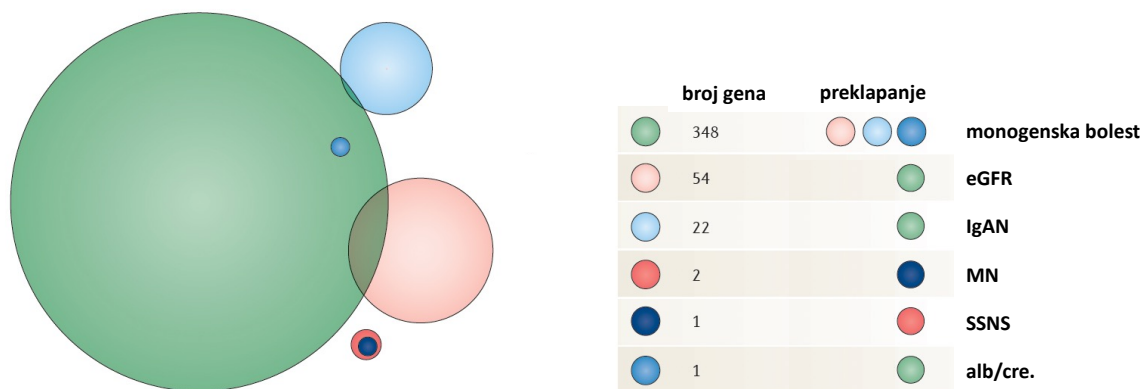
identifikovala je 23 značajna lokusa za HBB, uključujući 17 verovatno relevantnih za funkciju bubrega (*SDCCAG8*, *LARP4B*, *DCDC1*, *WDR72*, *UMOD-PDILT*, *MYO19*, *AQP4*, *NFATC1*, *PSD4*, *HOXD8*, *NR1P1*, *SHROOM3*, *FGF5*, *SLC34A1*, *DAB2*, *UNCX* i *PRKAG2*).

Druga grupa polimorfizama se registruje u genima koji kodiraju proteine imunskog sistema. Polimorfizmi rs1800871 i rs1800896 u genu koji kodira interleukin 10 (IL10), koji je antiinflamatorni citokin, mogu se povezati sa nastankom komplikacija bubrežnih bolesti kod dece (136). Opisana je i udruženost polimorfizama gena za druge interleukine i faktore rasta sa nastankom hroničnih bubrežnih bolesti, uključujući polimorfizam rs8179190 u genu *IL4*, kao i rs1800469, rs1800471, rs1800470 u genu *TGFβ1* (152).

Studija pod nazivom Pedijatrijsko ispitivanje genetičkih faktora rizika povezanih sa progresijom bolesti bubrega (PediGFR) je u toku (133); internacionalni tim istraživača sprovodi studiju asocijacije na nivou genoma (GWAS).

1.7. PREDNOSTI I NEDOSTACI DOSADAŠNJIH STUDIJA GENETIČKE ASOCIJACIJE KOD GLOMERULONEFRITISA I HRONIČNE BUBREŽNE BOLESTI

Dosadašnja genetička istraživanja dovela su do značajnih saznanja o patogenezi bolesti glomerula i hroničnih bubrežnih bolesti, ali mnoga pitanja i dalje ostaju otvorena. Razumevanje genetičke predispozicije za bolesti bubrega predstavlja novi pristup u otkrivanju osnovnih patofizioloških mehanizama ovih bolesti, koji mogu olakšati razvoj ciljanih terapija (144). Pored toga, identifikacija specifičnih patofizioloških mehanizama pomaže da se definišu homogenije podgrupe pacijenata (primer je gen *PLA2R1* kod MN). Geni koji su povezani sa monogenским bubrežnim bolestima mogu biti i uzrok pojedinih formi glomerulopatija ali i uzrok smanjene bubrežne funkcije (Slika 1.4). Takođe, povremeno se uočava da isti gen može biti povezan sa glomerulopatijom i bubrežnom insuficijencijom.



Slika 1.4. Odnos gena koji izazivaju monogenske bolesti bubrega sa genima podložnosti za razvoj bubrežnih bolesti

prilagođeno iz rada: Wuttke M, Kottgen A. Insights into kidney diseases from genome-wide association studies. Nat Rev Nephrol 2016;12(9):549-62. (referenca 84)

eGFR – procenjena brzina glomerularne filtracije, IgAN – IgA nefropatija, MN – membranozni nefritis, SSNS – nefrotski sindrom osetljiv na steroide, alb/cre. - odnos albumina i kreatinina u urinu

Nedostatak dosadašnjih studija koje ispituju genetičku osnovu nenaslednih bolesti bubrega je nedovoljna analiza epigenetičkih faktora, npr. metilacije, modifikacije histona, te mikro RNK (135). Manje istraženi biološki faktori su i dužina telomera, mitohondrijska DNK, varijacije u broju kopija u genima i genomu (153).

Većina *GWAS* studija su fokusirane na odrasle, a ne na decu sa bubrežnim bolestima te je replikacija rezultata ovih velikih studija neophodna i u manjim kohortama pedijatrijskih bolesnika (133; 136). Naročito je nepoznato kako genski polimorfizmi utiču na tok hronične bubrežne bolesti kod dece, tj. da li mogu biti prediktori razvoja bubrežne insuficijencije i različitih komplikacija BG (84). Takođe je nejasno da li su sami genski polimorfizmi bolji prediktori ishoda bolesti, nego već poznati prediktori poput jačine glomerularne filtracije u početnoj fazi, prisustva proteinurije i arterijske hipertenzije (2). Za razliku od BG kod odraslih, koja se razvija veoma sporo i neprimetno, kod dece je početak bolesti jasniji te uzorkovanje krvi na samom početku i analiza genskih polimorfizama može značajno uticati na razumevanje toka bolesti (136). U tom smislu, analiza genskih polimorfizama kod dece može rano uticati na izbor ciljane terapije i na lečenje faktora rizika za progresiju bolesti, koji su podložni terapiji, što ukazuje na značaj ovakvih ispitivanja. Ovo bi konačno moglo dovesti do boljeg krajnjeg ishoda bolesti i boljeg kvaliteta života kod dece obolele od BG i njihovih roditelja.

Nedostatak dosadašnjih istraživanja je i činjenica da su ona često uključivala heterogene grupe bolesnika sa glomerulonefritisom, hroničnom ili terminalnom bubrežnom bolešću različite etiologije. Konačno, genski polimorfizmi mogu često biti specifični za određenu rasnu ili etničku pripadnost, a to se odnosi i na polimorfizme koji se povezuju sa bubrežnim bolestima (84; 135; 136). Oskudni su podaci o genetičkoj predispoziciji za nastanak i tok BG u populaciji Srbije i okolnim zemljama, kod dece i kod odraslih.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Utvrđivanje učestalosti genotipova i alela polimorfizma rs12917707 u genu *UMOD*, rs17319721 u genu *SHROOM3*, rs1800871 i rs3024505 u genu *IL10*, rs1800795 u genu *IL6*, rs3212227 u genu *IL12B*, rs11209026 i rs1800896 u genu *IL23R*, kao i rs361525 i rs1800629 u genu *TNFA* kod dece obolele od bolesti glomerula i u uzorku iz zdrave populacije Srbije.
2. Analiza povezanosti navedenih genotipova i alela polimorfizama u genima *UMOD*, *SHROOM3*, *IL10*, *IL6*, *IL12B*, *IL23R* i *TNFA* sa težinom, ishodom i komplikacijama BG kod dece.
3. Sekvenciranje celog egzoma kod pacijenata sa primarnim i sekundarnim bolestima glomerula sa ciljem detektovanja genetičkog uzroka bolesti.

3. PACIJENTI I METODE

3.1. PACIJENTI

Ovo istraživanje je studija preseka sprovedena nakon dobijanja dozvole br. 1322/VII-48 Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu od 29.07.2020. Istraživanje je sprovedeno na Odeljenju za ispitivanje i lečenje bolesti bubrega i mokraćnih kanala Pedijatrijske klinike Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ u periodu od 1. marta 2021. do 1. marta 2022. godine. Obuhvaćeni su pacijenti koji su u ovom periodu bili hospitalizovani na Klinici ili su bili pregledani u pedijatrijskoj nefrološkoj ambulanti Klinike, a nakon provere njihovih podataka iz elektronske baze Heliant. Uključeni su pacijenti sa sledećim formama BG, čija je dijagnoza postavljena na osnovu kliničke slike, laboratorijskih i patohistoloških nalaza: bolest sa minimalnim promenama na glomerulima i fokalna segmentna glomeruloskleroza, membranozni glomerulonefritis, IgA nefropatija, membranoproliferativni glomerulonefritis, sekundarni glomerulonefritis u sklopu Henoch-Schonlein-ove purpore i u sklopu sistemskog eritemskog lupusa (lupus nefritis). Isključeni su pacijenti sa drugim formama BG i pacijenti koji imaju pozitivnu porodičnu anamnezu na bolesti bubrega ili imaju dokazane genetičke bolesti bubrega, kao i oni koji imaju BG ali uz prisustvo druge značajne bolesti koja nije povezana sa BG. Primarno je sakupljeno 85 pacijenata, ali je iz ove kohorte isključeno 10 pacijenata koji su imali sistemsku bolest vezivnog tkiva sa sumnjom na prisustvo BG, ali im je dijagnoza BG isključena dopunskim nefrološkim ispitivanjima. Roditelji tri pacijenta su odbili da njihova deca učestvuju u istraživanju. Jedan pacijent je isključen, jer je genetičkim ispitivanjem potvrđeno prisustvo jasne genetičke bolesti – atipičnog hemolitičko-uremijskog sindroma. Konačan broj pacijenata uključen u ovo istraživanje bio je 71. Nakon potpisivanja informisanog pristanka od strane roditelja i/ili pacijenata, pacijentima je uzorkovana krv za laboratorijske i genetičke analize.

Iz elektronske baze Instituta, prikupljeni su detaljni podaci o sledećim sociodemografskim i kliničkim karakteristikama ispitanika: pol, uzrast na početku bolesti i na pregledu, vreme proteklo od pojave bolesti do dijagnoze, trajanje bolesti do pregleda, visina, težina, indeks telesne mase u trenutku postavljanja dijagnoze i na pregledu, primenjena terapija sa dozom i dužinom primene terapije, vreme do remisije (farmakološke i potpune), broj relapsa bolesti, vreme do dijalize, vrsta primenjene dijalize, trajanje dijalize, prisustvo udruženih bolesti poput hipertenzije, vreme njihovog nastanka, trajanje i način lečenja. Praćene su i laboratorijske analize iz istorija bolesti i ambulantnih kartona, kao i u trenutku pregleda: krvna slika, glikemija, C-reaktivni protein, sedimentacija eritrocita, urea, kreatinin, klirens kreatinina, procenjena brzina glomerularne filtracije, odnos koncentracije proteina i kreatinina u urinu, prisustvo eritrocita u urinu, proteini i albumini u serumu i urinu, 24h proteinurija, elektroliti u serumu, trigliceridi, holesterol i njegove frakcije, nivo paratireoidnog hormona i vitamina D.

3.2. MOLEKULARNO-GENETIČKE ANALIZE

3.2.1. IZOLACIJA GENOMSKE DEZOKSIRIBONUKLEINSKE KISELINE

Svim pacijentima sa BG uzorkovano je 10ml periferne venske krvi u epruvete sa antikoagulansom (EDTA) radi genetičke analize. Genomska dezoksiribonukleinska kiselina (DNK) je izolovana iz uzorka periferne krvi bolesnika upotrebom komercijalnog seta *PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, SAD)* prema uputstvu proizvođača.

Protokol za izolaciju genomske DNK iz periferne krvi podrazumeva sledeće korake:

1. U tubu od 1,5 ml dodato je 20 µl proteinaze K, 200 µl periferne krvi i 20 µl RNaze A;

2. Smeša je kratko vorteksovana i kratko centrifugirana (*Centrifuge 5804 R*, rotor FA-45-30-11, *Eppendorf*, Nemačka);
3. Potom je dodato 200 µl pufera za lizu, uzorak je kratko vorteksovao i inkubiran 10 minuta na 56°C;
4. Zatim je dodato 200 µl 99% etanola, uzorak je kratko vorteksovao i centrifugiran;
5. Potom je uzorak prenet u QIAamp mini spin kolonicu i centrifugiran 1 minut na 9700 rpm;
6. Nakon centrifugiranja kolonica je prebačena u čistu kolektorsku tubicu od 2 ml;
7. Dodato je 500 µl pufera 1 u kolonicu, centrifugirano 1 minut na 9700 rpm, nakon toga kolonica je prebačena u kolektorsku tubicu od 2 ml;
8. Potom je dodato 500 µl pufera 2 u kolonicu, centrifugirano 3 minuta na 13000 rpm, a nakon toga kolonica je prenet u tubicu od 1,5 ml;
9. Za eluciju DNK dodato je 100 µl dejonizovane vode u kolonicu, inkubirano 5 minuta na sobnoj temperaturi, potom centrifugirano 2 minuta na 13000 rpm;
10. Eluirani uzorak čuvan je na 4°C do analize.

3.2.2. ANALIZA GENSKIH POLIMORFIZAMA METODOM POLIMERAZNE LANČANE REAKCIJE U REALNOM VREMENU

Analiza polimorfizama rs12917707 u genu *UMOD* i rs17319721 u genu *SHROOM3* sprovedena je u Laboratoriji za molekularnu i genetičku dijagnostiku neuroloških oboljenja Klinike za neurologiju Univerzitetskog kliničkog centra Srbije. Analiza polimorfizama rs1800871 i rs3024505 u genu *IL10*, rs1800795 u genu *IL6*, rs3212227 u genu *IL12B*, rs11209026 i rs1800896 u genu *IL23R* i rs361525 i rs1800629 u genu *TNFA* učinjena je na Institutu za imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U obe laboratorije korišćena je metoda polimerazne lančane reakcije u realnom vremenu (engl. *real-time polymerase chain reaction*, skraćeno RT-PCR, odnosno qPCR) i upotrebljeni su komercijalni TaqMan esaji za genotipizaciju.

RT-PCR je postupak koji se temelji na standardnoj PCR metodi. Pri RT-PCR analizi detekcija PCR amplifikacije se vrši u eksponencijalnoj fazi u kojoj se amplifikacija najbrže dešava, a reakcija je u ovoj fazi visoko specifična i precizna. Detekcija putem RT-PCR se vrši u ciklusima koji su sastavni deo eksponencijalne faze, a podrazumeva registrovanje fluorescencije emitovane od strane produkta amplifikacije. Izvor fluorescencije može da bude fluorescentna boja, koja se nespecifično vezuje za dvolančanu DNK (npr. *SYBR Green*), ili pak specifična fluorescentno obeležena proba koja hibridizuje sa ciljanim regionom. U ovom istraživanju je primenjena metoda koja podrazumeva primenu TaqMan fluorescentno obeleženih proba.

TaqMan proba je konstruisana tako da je komplementarna regionu od interesa, koji se nalazi u segmentu DNK između prajmera. Ova proba na svom 5' kraju ima kovalentno vezanu reportersku (R) boju, a na 3' kraju prigušivač (engl. *quencher*, skraćeno Q). Kada je proba slobodna ili vezana za DNK molekul, prigušivač blokira emisiju fluorescencije sa reporterske boje. U toku RT-PCR reakcije, kada se nakon denaturacije DNK za matricu vezuju prajmeri, dolazi i do vezivanja TaqMan probe za specifičan region na DNK. Ključni korak nastupa u sledećoj fazi, u kojoj Taq polimeraza 5'-3' polimeraznom aktivnošću dodaje nukleotide. Kada Taq polimeraza dospe do hibridizovane probe, zahvaljujući svojoj 5'-3' egzonukleaznoj aktivnosti ona najpre uklanja 5' nukleotid sa reporterskom bojom, koja je sada slobodna i emituje fluorescenciju.

Polimorfizam koji potiče od razlike u samo jednom jedinom nukleotidu između dve alelne forme (engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) može se detektovati primenom opisane metode. U tu svrhu obično se koriste dve TaqMan probe koje se razlikuju u jednoj bazi od interesa i obeležene su različitim bojama, te emituju različitu fluorescenciju. Ukoliko aparat detektuje samo jednu od dve boje – u uzorku

je prisutan jedan alel (homozigotna konstitucija), dok detekcija obe boje označava prisustvo oba alela (heterozigotna konstitucija).

U ovom radu korišćeni su komercijalni TaqMan SNP eseji za genotipizaciju (*ThermoFisher Scientific, Foster City, SAD*). Eseji sadrže odgovarajuće prajmere i po dve TaqMan probe, obeležene fluorescentnim bojama VIC i FAM. Smeša dNTP, Taq polimeraze i pufera nalazila se u gotovom TaqMan RT-PCR mastermiksi. Sastav smeše za RT-PCR opisan je u Tabeli 3.1.

Tabela 3.1. Sastav smeše za RT-PCR

Komponenta	Količina
TaqMan RT-PCR Master Mix 2x	7,50 µl
TaqMan SNP genotyping assay 20x	0,75 µl
DNK (30ng/µl)	2,00 µl
dejonizovana voda	do 15 µl

Reakcija je vršena na aparatu *ABI Prism 7500 Fast Real-Time PCR* (*Applied Biosystems, SAD*). Reakcija genotipizacije odvijala se prema sledećem temperaturnom profilu: očitavanje početnog nivoa fluorescencije (engl. *pre-read*) vršeno je na 60°C u trajanju od 1 minut, potom je sledila faza PCR reakcije (engl. *read*) gde je aparat beležio fluorescenciju reporterskih boja hidrolizovanih TaqMan proba i na kraju, po završenoj PCR reakciji, vršeno je završno očitavanje fluorescencije (engl. *post-read*) na temperaturi od 60°C u trajanju od 1 minut. PCR reakcija sastojala se od 40 ciklusa u kojima su se smenjivale faze denaturacije DNK, hibridizacije prajmera i TaqMan probe sa jednolančanom DNK matricom, elongacija i hidroliza TaqMan proba. Nakon faza *pre-read-a*, *read-a* i *post-read-a* u aparatu je vršena obrada podataka integrisanim softverom (ABS 7500 fast SDS Real Time PCR Sequence Detection Software v.1.4), koji je automatski dodeljivao adekvatan genotip svakom od uzoraka.

3.2.2.1. KONTROLNA GRUPA ZA KOHORTU BOLESNIKA KOJA JE ISPITIVANA METODOM RT-PCR NA PRISUSTVO GENSKIH POLIMORFIZAMA

Podaci o zastupljenosti genotipova i alela za ispitivane polimorfizme u zdravoj populaciji analizirani su u uzorcima zdrave dece iz kolekcije Instituta za humanu genetiku Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. U pitanju su uzorci DNK ispitanika iz različitih regiona Srbije, uključenih u “Jugoslovensku studiju prekursora ateroskleroze kod školske dece”. Od ukupno 118 ispitanika u ovoj grupi, bilo je 60 ispitanika ženskog pola i 58 ispitanika muškog pola, u trenutku uzorkovanja materijala za analizu svi su bili učenici 8. razreda osnovne škole u uzrastu od 14 godina. U ovoj kontrolnoj grupi DNK je izolovana iz uzoraka periferne krvi metodom iseljavanja po Mileru (154).

3.2.3. SEKVENCIRANJE NOVE GENERACIJE

Prva grupa sastavljena od 40 bolesnika sa BG (po redosledu prikupljanja uzoraka) predstavljala je kohortu kod koje je, pored genotipizacije odabranih polimorfizama gore navedenom metodom RT-PCR, vršeno i sekvenciranje celog egzoma (engl. *whole exome sequencing*, WES) primenom metode sekvenciranja nove generacije (engl. *next generation sequencing*, NGS). Ovaj deo istraživanja sproveden je u laboratoriji 3billion, Inc. u Seulu, u Južnoj Koreji. NGS omogućava precizno, masivno, paralelno sekvenciranje velikog broja DNK fragmenata u kratkom vremenskom periodu. Za izvođenje NGS metode korišćen je xGen Exome Research Panel v2 dopunjen sa xGen humanim mtDNA panelom za mitohondrijalnu DNK i xGen Custom Hyb Panelom v1 (*Integrated DNA Technologies, Coralville, SAD*)

na Illumina Novaseq 6000 platformi (Illumina, San Diego, SAD) da bi se sekvencirali svi kodirajući egzoni u oko 20.000 poznatih gena što čini oko 1% humanog genoma (približno 30 miliona baznih parova). Povezanost gena obuhvaćenih WES analizom sa različitim bolestima opisana je u online dostupnim bazama podataka: DECIPHER (155) (<https://decipher.sanger.ac.uk>), ClinVar (156) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), OMIM (157) (www.omim.org) i HGMD (158) (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php). Upotrebom WES mogu se detektovati pojedinačne nukleotidne varijante, kao i male insercije i delecije u ispitivanoj DNK.

Analiza i interpretacija podataka dobijenih NGS metodom sastojala se od primarne, sekundarne i tercijarne analize i rađena je takođe u referentnoj laboratoriji za genetička testiranja, 3billion Inc., Seul, Južna Koreja. Primarna analiza je podrazumevala pretvaranje sirovih podataka u obliku signala dobijenih posle sekvenciranja u nukleotidne sekvence fragmenata, pri čemu su se formirali FASTQ fajlovi. Sekundarni nivo analize se vršio pomoću dostupnih bioinformatičkih alata i *in house* kreiranog softvera (159). Kvalitet FASTQ fajlova dobijenih sekvenciranjem sa Illumina Novaseq 6000 platformi je procenjen korišćenjem FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Nakon toga, baze sa lošim kvalitetom su uklonjene trimmomatic alatom (160). FASTQ fajlovi su poravnati sa humanim referentnim genomom GRCh37/hg19 uz pomoć BWA-MEM (v.0.7.17) (161). Poravnati BAM (engl. *binary alignment map*, BAM) fajlovi su potom sortirani i ekstrahovani korišćenjem alata Samtools (v.1.9) (162). Uklanjanje duplikata sekvenci vršeno je Picard alatom (v.2.20.8) (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Jednonukleotidne varijante i kratke insercije i delecije (indel) su pozivane tj. detektovane HaplotypeCaller alatom koji je deo GATK (engl. *Genomic Analysis ToolKit*) platforme (v.3.8) (163) i time su formirani VCF fajlovi (engl. *variant call format*, VCF).

Tercijarni nivo analize WES podataka uobičajeno podrazumeva anotaciju, filtriranje i klasifikaciju varijanti i to je rađeno *in house* kreiranim softverom EVIDENCE (159). Ovaj program ima tri glavna koraka: filtriranje varijanti, klasifikaciju varijanti i izračunavanje zbira sličnosti za fenotip bolesnika. U prvom koraku, informacije o učestalosti određenih varijanti u drugim populacijama i na globalnom nivou zasnovane su na podacima prikupljenim u gnomAD projektu (<http://gnomad.broadinstitute.org/>) (164) i 3billion Inc. bazi podataka (<https://3billion.io/>). U skladu sa preporukama Američkog koledža za medicinsku genetiku i Asocijacije za molekularnu patologiju (ACMG/AMP), sve varijante sa učestalošću >5% su odbačene, osim onih čestih varijanti za koje je dokazano da su registrovane kao uzročne za bolesti kod ljudi (165). U drugom koraku, podaci o patogenosti date varijante i njenoj povezanosti sa određenim oboljenjem su preuzimani iz baza podataka kao što su OMIM, ClinVar i UniProt (<https://www.uniprot.org>) i od značaja je bilo uzeti u obzir gensku funkciju, mehanizam nastanka bolesti, način nasleđivanja bolesti i klinički značaj varijante (156; 157; 166). Predikcija funkcionalnog efekta svake varijante i stepen evolucione konzervisanosti su procenjeni korišćenjem *in silico* predikcionih softvera, kao što je REVEL koji služi za predikciju patogenosti retkih *missense* varijanti (167). Takođe, korišćeni su i *in silico* softveri za predikciju patogenosti varijanti koje utiču na iskrajanje introna gena (*splice* varijante) (168). Zbir predikcionog softvera iznad 0.5 je označavao da varijanta ima patološki efekat. Patogenost svake varijante je procenjena prema ACMG/AMP preporukama (165). U trećem koraku, klinički fenotip svakog bolesnika je preveden u odgovarajući termin fenotipske abnormalnosti povezane sa bolestima kod ljudi (engl. *Human Phenotype Ontology*, HPO) (<https://hpo.jax.org/>) (169) na osnovu podataka unetih u sistem 3billion od strane lekara. Fenotip datog pacijenta je korišćen za izračunavanje sličnosti sa svakom od oko 7000 retkih genetičkih bolesti (170; 171). Zbir sličnosti između fenotipa svakog bolesnika i simptoma povezanih sa tom bolešću, prema ACMG/AMP preporukama, je rangiran na skali od 0 do 10. Svaki simptom bolesnika je bio upoređen sa svakim poznatim simptomom date bolesti.

Konačno, EVIDENCE softver je izdvojio kao prioritete varijante one koje su klasifikovane kao patogene, verovatno patogene i varijante nejasnog značaja (engl. *variants of uncertain significance*, VUS) prema ACMG/AMP preporukama. One su kategorizovane u trostepeni sistem na osnovu bajesijskog skora (172). Prvi stepen su varijante sa skorom preko 0.9, drugi stepen sa skorom 0.5-0.9

i treći sa skorom 0.1-0.5. Sve retke varijante detektovane u genima povezanim sa određenim oboljenjima su dalje uzimane u obzir kako bi se okarakterisale od strane medicinskih genetičara. Varijante u genima sa manjim skorom sličnosti sa simptomima datog bolesnika su bile ručno evaluirane. Pored toga, analizirane su i one retke varijante koje nisu bile u genima povezanim sa simptomima datim za određenog bolesnika.

Od ukupno 40 bolesnika kojima je urađeno sekvenciranje celog egzoma, nakon detaljne kliničke evaluacije odabran je 31 bolesnik sa BG za dalju analizu. Ukupno osam bolesnika je isključeno iz dalje analize, jer su imali druge autoimunske bolesti bez zahvaćenosti bubrega. U prvom koraku sprovedena je analiza prisustva retkih varijanti povezanih sa monogenim bolestima bubrega. Jedan pacijent je odbačen, jer je kod njega postavljena dijagnoza monogeneske nefrološke bolesti – Alportovog sindroma. U drugom koraku rađena je analiza na prisustvo visoko rizičnih varijanti u genima povezanim sa nastankom lupus nefritisa, IgA nefropatije, anti glomerularne bolesti bazalne membrane, primarnog glomerulonefritisa, membranoznog glomerulonefritisa, fokalne segmentne glomeruloskleroze, idiopatske membranozne nefropatije, nefrotskim sindromom. Selektovane su varijante koje su karakteristične za Evropsku populaciju i koje su prethodno identifikovane u GWAS studijama. Lista analiziranih varijanti i gena povezanih sa razvojem BG je data u Tabeli 3.2. Pored selektovanog 31 bolesnika sa BG, na prisustvo datih varijanti analizirana je i kohorta od 50 zdravih kontrola, u cilju procene učestalosti navedenih varijanti u našoj populaciji. Kontrolne uzorke su činili pedijatrijski bolesnici kod kojih nije bilo prisutno bubrežno oboljenje. Od ukupno 50 testiranih, 31 (62%) je bilo muškog pola, dok je 19 (38%) bilo ženskog pola. Prosečna starost kontrola je bila $8,8 \pm 4,3$ godine.

Podaci su analizirani uz pomoć Illumininog BaseSpace Variant Interpreter softvera (*Illumina, San Diego, SAD*). Analizirani su VCF fajlovi dobijeni nakon sekvenciranja čitavog egzoma u referentnoj laboratoriji za genetička testiranja, 3billion Inc., Seul, Južna Koreja. Za svakog bolesnika i ispitanika iz kontrolne grupe pretraživane su visokorizične varijante u genima asociranim sa nastankom BG koje su navedene u Tabeli 3.2. Nakon pretrage određen je genotip za svakog bolesnika i ispitanika iz kontrolne grupe. Ukoliko data varijanta nije bila detektovana u pretraživanom genu značilo je da je bolesnik ili kontrolni uzorak normalan homozigot, odnosno oba alela su *wild type* (ista su kao i u referentnom genomu). Ukoliko je na jednom alelu bila prisutna *wild type* nukleotidna sekvenca a na drugom visoko rizična značilo je da je bolesnik ili kontrola heterozigot za datu varijantu. Konačno, ukoliko su na oba alela bile prisutne visoko rizične nukleotidne sekvence značilo je da je bolesnik ili kontrola mutirani homozigot, odnosno ima povećan rizik za nastanak BG u odnosu na normalnog homozigota i heterozigota.

3.3. STATISTIČKE ANALIZE

Korišćene su metode deskriptivne statistike: proporcija, medijana i interkvartilni opseg, srednja vrednost i standardna devijacija. Za poređenje nominalnih i ordinalnih varijabli korišćen je χ^2 test ili Fisher-ov test tačne verovatnoće. Značajnost razlike kontinuiranih varijabli između dve grupe ispitanika analizirana je pomoću Mann-Whitney-evog U testa ili Student-ovog t testa, u zavisnosti od normalnosti raspodele podataka. Za poređenje tri ili više grupa ispitanika korišćena je parametarska ANOVA ili Kruskal-Wallis-ov test. Korelacije dvaju varijabli ispitivane su Spearman-ovim koeficijentom korelacije ranga. Prediktivni značaj nezavisnih varijabli na kontinuiranu zavisnu varijablu određivan je multiplom linearnom regresionom analizom.

Rezultati genotipizacije polimorfizama u navedenim genima testirani su na prisustvo Hardy-Weinberg-ove ravnoteže. Frekvencija genotipova, alela i haplotipova između pacijenata i kontrola upoređene su pomoću Pearson-ovog hi-kvadrat testa ili Fisher-ovog testa tačne verovatnoće. Izračunate su p vrednosti, odnosi šansi (OR) i 95% intervali poverenja (CI). Procena frekvencija haplotipova za gene u kojima je analizirano dva ili više polimorfizama izvršena je pomoću algoritma maksimizacije

očekivanja koristeći *Arlequin* 3.5.1.3 (173). Nivo značajnosti greške prvog reda definisana je kao $p < 0,05$. Za statističke analize korišćen je *IBM Statistical Package for Social Sciences*, verzija 20 (IBM SPSS, Čikago, Illinois, SAD).

Tabela 3.2. Geni i njihove visokorizične varijante povezane sa nastankom BG identifikovane u studijama asocijacije u čitavom genomu i analizirane u našoj kohorti pacijenata analiziranih WES analizom

Fenotip	Geni	Jednonukleotidni polimorfizmi
Primarni glomerulonefritisi		
IgA nefropatija	<i>HLA-DPB1; CTLA4; NOS3; ICOS; IFNG; TGFB1</i>	rs9277535; rs231777; rs1799983; rs4270326, rs4404254; rs430561; rs1800469, rs6957;
Membranozni glomerulonefritis	<i>TSBP1; GPANK1; MUCL3; STK19; EGFL8; EHMT2; HLA-DQA1; PRRC2A; POU5F1; PSORS1C1; TCF19; SYN3; IRF4; PLA2R</i>	rs3129939; rs3130618; rs3132580; rs389884; rs3096697; rs652888; rs2187668; rs3115663; rs1265159; rs3130564; rs7750641; rs130544; rs9405192; rs35771982, rs3749117, rs3792189, rs3792192, rs6722275
Fokalna segmentna glomeruloskleroza	<i>ALMS1; OR14A16; GPATCH1; CCDC30; GRB2; FGFR4; KCNK6; CDH12; IPO4; SCNN1G; CCDC7; PTPRJ; APOL1; DNAH6;</i>	rs28730852; rs78195097; rs138243974; rs148306592; rs540401032; rs1966265; rs76086051; rs10941934; rs114924943; rs5732; rs11595844; rs13377246; rs73885319; rs4832089
Bolest sa antitelima na glomerularnu bazalnu membranu	<i>HLA-DRA; HLA-DQB; FCGR2B; IL23R; IL17A;</i>	rs3135388; rs0602, rs0501; rs1050501; rs7517847; rs2275913
Primarni glomerulonefritis – mešovite kohorte	<i>HLA-DQB; ITGAX; VAV3; CARD9; CFH; TNFSF13; PADI4; C1GALT1; HLA-DQA1; PLA2R1; NFKB1; APOL1; MYH9</i>	rs11244, rs2857106; rs11574637; rs17019602; rs4077515; rs6677604; rs3803800; rs2240335; rs1008897, rs13226913; rs2187668, rs9272729; rs4664308, rs17830558, rs17831251; rs230540; rs7284919; rs2239784
Sekundarni glomerulonefritisi		
Lupus nefritis	<i>HLA-DQA1; FCGR3A; FCGR2A; KLK1; ITGAM; BANK1; STAT4; TYK2; TNIP1; DNASE1; DNASE1L3; ATRIP</i>	rs2187668; rs396991; rs2205960; rs5516, rs2740502; rs1143679; rs4699261; rs7582694; rs11880341; rs2304256; rs7708392; rs1053874; rs35677470; rs56203834
IgA nefropatija	<i>HLA-DPB1; CTLA4; NOS3; ICOS; IFNG; TGFB1</i>	rs9277535; rs231777; rs1799983; rs4270326, rs4404254; rs430561; rs1800469, rs6957;
Ostala bubrežna stanja		
Nefrotski sindrom	<i>HLA-DQB1; NPHS1; AH11; TNFSF15; CLEC16A; CD28; BTC; MICA;</i>	rs1063355, rs1794497; rs412175; rs7759971; rs10817678; rs8062322; rs55730955; rs28862935; rs2256318

4. REZULTATI

4.1. SOCIODEMOGRAFSKE I KLINIČKE KARAKTERISTIKE ISPITIVANIH BOLESNIKA SA BOLESTIMA GLOMERULA

U ispitivanoj kohorti koja je obuhvatila 71 dete sa glomerulonefritisom, primarni glomerulonefritis je dijagnostikovao kod 40 (56,3%) slučajeva iz naše kohorte, a sekundarni kod 31 (43,7%) (Tabela 1). Najčešći tip primarnog glomerulonefritisa bio je steroid senzitivni nefrotski sindrom registrovan kod 12 (16,9%) obolelih, te IgA nefropatija registrovana kod 10 (14,1%) pacijenata. Najčešći uzročnik sekundarnog glomerulonefritisa bio je SLE koji je imalo 19 (26,8%) pacijenata, dok je glomerulonefritis u sklopu HSP nađen kod 10 (14,1%) obolelih. Trideset tri (46,5%) pacijenta su pre pojave bubrežne bolesti imala infekciju koja je prethodila bolesti od dva dana do maksimalno šest nedelja. Kod četiri pacijenta postojali su značajni podaci u porodičnoj anamnezi – babe dva pacijenta su bile na hemodijalizi, kod majke jednog pacijenta je registrovan SLE, a otac jednog pacijenta je imao mikrohematuriju nepoznatog uzroka. Ni u jednoj od ovih porodica nije utvrđen genetički uzrok bolesti.

Medijana uzrasta na početku bolesti bila je 8 (4-13) godina, a prilikom uzorkovanja 14 (7-17) godina. Većina pacijenata je lečena steroidima i/ili nesteroidnim imunosupresorima (80,3%). Svi pacijenti su praćeni najmanje 6 meseci, a medijana praćenja od trenutka postavljanja dijagnoze je bila 67 (38-103) meseci za celu grupu. Medijana broja relapsa osnovne bolesti po pacijentu je bila 1 (0-3). Kompletne remisije, koja podrazumeva da su pacijenti dobro i bez terapije, postignute su kod 39 (54,9%) dece. Kod četiri pacijenta sprovedena je hemodijaliza – kod dva akutna, a kod dva hronična.

Tokom trajanja bolesti arterijsku hipertenziju su razvila 32 (45,1%) pacijenta. Svi drugi komorbiditeti su se javljali sa značajno manjom učestalošću. Od ukupnog broja pacijenata, njih 12 (16,9%) je imalo neki drugi komorbiditet. Tri pacijenta su imala nizak rast i zbog toga su lečeni hormonima rasta, dvoje dece je razvilo kataraktu, dvoje vaskulitis centralnog nervnog sistema, a po jedan pacijent je imao mentalnu retardaciju, glutensku enteropatiju, insulinsku rezistenciju, medularnu cističnu bubrežnu bolest, osteoporozu, posteriorni reverzibilni encefalopatski sindrom i sepsu. Glavne sociodemografske i kliničke karakteristike ispitivanih pacijenata prikazane su u Tabeli 4.1.

Antropometrijski i laboratorijski nalazi ispitivanih pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze i u momentu uzorkovanja krvi za aktuelno istraživanje prikazani su u Tabeli 4.2. Tokom trajanja bolesti uočena je normalizacija parametara inflamacije, poboljšanje vrednosti hemoglobina, proteina i albumina u krvi, uz značajno smanjenje hematurije i proteinurije.

Tabela 4.1. Glavne sociodemografske i kliničke karakteristike ispitivane dece sa GN (N=71)

Karakteristika	N (%) ili medijana (interkvartilni opseg)
Tip glomerulonefritisa	
Primarni	40 (56,3%)
Nefrotski sindrom osetljiv na steroide	12 (16,9%)
IgA nefropatija	10 (14,1%)
IgM nefropatija	7 (9,9%)
Membranoproliferativni glomerulonefritis	5 (7,0%)
Fokalna segmentna glomeruloskleroza	3 (4,2%)
Membranozni glomerulonefritis	1 (1,4%)
Glomerulonefritis sa antitelima na glomerularnu bazalnu membranu	1 (1,4%)
Brzoprogresivni glomerulonefritis	1 (1,4%)
Sekundarni	31 (43,7%)
Lupusni nefritis	19 (26,8%)
Nefritis kod Henoh-Šenlajnovе purpure	10 (14,1%)
Glomerulonefritis kod ANCA vaskulitisa	2 (2,8%)
Pol	
Muški	33 (46,5%)
Ženski	38 (53,5%)
Starost na početku (godine)	8 (4-13)
Dijagostičko kašnjenje (meseci)	1 (0-2)
Procenjena brzina glomerularne filtracije (ml/min/1,73 m ²) pri dijagnozi	133 (103-158)
<90%	12 (16,9%)
Normalno	55 (77,5%)
Trajanje bolesti do uzorkovanja (meseci)	67 (38-103)
Starost pri uzorkovanju (godine)	14 (7-17)
Terapija tokom bolesti	
Bez terapije	7 (9,9%)
Kortikosteroidi	23 (32,4%)
Kortikosteroidi i nesteroidni imunosupresivi	34 (47,9%)
Kortikosteroidi, nesteroidni imunosupresivi i rituksimab	7 (9,9%)
Trajanje terapije (meseci)	
Kortikosteroidi	31 (7-78)
Nesteroidni imunosupresori	41 (20-75)
Rituksimab	2 (1-4)
Kompletna remisija	
Da	39 (54,9%)
Ne	32 (45,1%)
Vreme od početka terapije do potpune remisije (godine)	6,5 (5-11,5)
Dijaliza	
Ne	67 (94,4%)
Akutna	2 (2,8%)
Hronična	2 (2,8%)
Arterijska hipertenzija pri uzorkovanju	
Da	32 (45,1%)
Ne	39 (54,9%)
Procenjena brzina glomerularne filtracije (ml/min/1,73 m ²) pri uzorkovanju	148 (126-163,5)
<90%	7 (9,9%)
normalno	62 (87,3%)

Tabela 4.2. Antropometrijski i laboratorijski nalazi ispitivanih pacijenata u trenutku postavljanja dijagnoze i u momentu uzorkovanja krvi (N=71)

Karakteristika	U trenutku dijagnostike (N (%)) ili srednja vrednost (standardna devijacija) ili medijana (interkvartilni opseg))	U trenutku uzorkovanja (N (%)) ili srednja vrednost (standardna devijacija) ili medijana (interkvartilni opseg))
Antropometrijski parametri		
Telesna visina (cm)	133,0 (31,0)	147,1 (27,1)
Telesna masa (kg)	35 (18-52)	54 (29-69)
Indeks telesne mase (kg/m ²)	18,7 (3,1)	21,4 (4,3)
Nalazi u krvi		
C reaktivni protein (mg/L)	3,5 (0,75-10,7)	0,5 (0,3-2,15)
Sedimentacija eritrocita (mm/h)	60 (20-80)	8 (5-18,5)
Hemoglobin u krvi (g/L)	121,7 (17,2)	131,1 (15,9)
Glikemija (mmol/L)	4,8 (0,9)	4,8 (0,4)
Urea (mmol/L)	4,5 (3,7-6,1)	4,1 (3,5-5,2)
Kreatinin (umol/L)	50 (35,5-70)	50 (39-69)
Proteini (g/L)	62,0 (13,6)	67,4 (8,6)
Albumini (g/L)	37 (26-43)	45 (41,5-46)
Natrijum (mmol/L)	137,6 (2,8)	138,8 (2,8)
Kalijum (mmol/L)	4,3 (0,8)	4,3 (0,4)
Hloridi (mmol/L)	101,6 (3,3)	102,0 (2,7)
Kalcijum (mmol/L)	2,12 (0,56)	2,36 (0,33)
Magnezijum (mmol/L)	0,81 (0,19)	0,82 (0,13)
Fosfor (mmol/L)	1,44 (0,42)	1,45 (0,34)
Bikarbonati (mmol/L)	22,4 (2,8)	23,6 (2,1)
Trigliceridi (mmol/L)	1,5 (0,89-2,29)	1,0 (0,61-1,56)
Ukupni holesterol (mmol/L)	5,04 (4,18-7,57)	4,7 (4,14-5,74)
HLD holesterol (mmol/L)	1,34 (1,02-1,84)	1,79 (1,2-2,0)
LDL holesterol (mmol/L)	2,68 (2,16-4,7)	2,94 (2,26-3,42)
Nalazi u urinu		
Hematurija	50 (70,4%)	18 (25,4%)
Proteinurija	35 (49,3%)	8 (11,3%)
24-h proteinurija (mg/dan)	942 (263,5-1877,5)	135,5 (81-304,5)

4.2. POREĐENJE PACIJENATA SA PRIMARNIM I SEKUNDARNIM BOLESTIMA GLOMERULA

U grupi pacijenata sa primarnim glomerulonefritisom procenat dečaka je bio veći nego u grupi pacijenata sa sekundarnim glomerulonefritisom (57,5% prema 32,3%, $p=0,03$). Medijana uzrasta na početku bolesti i prilikom uzorkovanja nije se razlikovala među grupama ispitanika. Dijagnostičko kašnjenje je takođe bilo slično u obe grupe. Trajanje bolesti do uzorkovanja je bilo nešto duže kod pacijenata sa primarnim glomerulonefritisom ($p=0,01$). Pristup u terapiji se razlikovao kod pacijenata sa primarnim i sekundarnim bolestima glomerula ($p=0,006$), ali je dužina terapije kortikosteroidima i imunosupresivima bila slična ($p>0,05$) (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Terapijski pristup kod dece sa primarnim i sekundarnim GN (N=71)

Karakteristika	Primarni GN	Sekundarni GN
Terapija tokom toka bolesti		
Bez terapije	7 (17,5%)	0 (0,0%)
Kortikosteroidi	14 (35,0%)	9 (29,0%)
Kortikosteroidi i nesteroidni imunosupresivi	13 (32,5%)	21 (67,7%)
Kortikosteroidi, nesteroidni imunosupresivi i rituksimab	6 (15,0%)	1 (3,2%)

Medijana broja relapsa po pacijentu je bila slična u obe grupe. Kompletne remisije, koja podrazumeva da su pacijenti u remisiji bez ikakve terapije, postignuta je kod 47,5% dece sa primarnim i 64,5% dece sa sekundarnim nefritisom ($p=0,15$). Tokom trajanja bolesti arterijsku hipertenziju je razvilo 42,5% pacijenata sa primarnim i 48,4% pacijenata sa sekundarnim glomerulonefritisom ($p=0,62$).

U pogledu antropometrijskih karakteristika, pacijenti sa primarnim glomerulonefritisom su bili niži u trenutku postavljanja dijagnoze u odnosu na pacijente sa sekundarnim glomerulonefritisom ($126,1 \pm 33,6$ cm prema $141,4 \pm 25,6$ cm, $p=0,04$), dok nije bilo razlike u telesnoj visini pri uzorkovanju, u telesnoj masi u trenutku dijagnoze i pri uzorkovanju, niti u indeksu telesne mase u trenutku dijagnoze i pri uzorkovanju. Sledeći laboratorijski parametri su se razlikovali u dve grupe ispitanika: vrednosti hemoglobina u krvi su bile niže kod pacijenata sa sekundarnim bolestima glomerula u odnosu na pacijente sa primarnim bolestima glomerula ($115,6 \pm 17,9$ g/L prema $126,8$ g/L, $p=0,006$); nivo proteina i albumina u krvi je bio viši kod pacijenata sa sekundarnim bolestima glomerula ($69,0 \pm 8,9$ g/L prema $56,7 \pm 14,3$ g/L, $p=0,0001$ za proteine i $38,5 \pm 5,5$ g/L prema $31,0 \pm 12,5$ g/L, $p=0,004$ za albumine); koncentracija kalijuma u krvi u trenutku uzorkovanja za potrebe ove studije je bila niža kod pacijenata sa sekundarnim glomerulonefritisom ($4,1 \pm 0,3$ mmol/L prema $4,4 \pm 0,4$ mmol/L, $p=0,004$). Nivoi ukupnog holesterola i obe njegove frakcije su bili viši kod pacijenata sa primarnim glomerulonefritisima u odnosu na pacijente sa sekundarnim glomerulonefritisima u trenutku postavljanja dijagnoze ($6,9 \pm 3,1$ mmol/L prema $4,6 \pm 1,3$ mmol/L, $p=0,001$ za ukupni holesterol; $4,2 \pm 2,2$ mmol/L prema $2,5 \pm 1,0$ mmol/L, $p=0,02$ za LDL holesterol; $1,6 \pm 0,6$ mmol/L prema $1,2 \pm 0,5$ mmol/L, $p=0,04$ za HDL holesterol). Nije bilo razlike u nivou triglicerida niti u nivou drugih laboratorijskih parametara između dve ispitivane grupe (Tabela 4.2).

4.3. UTICAJ SOCIODEMOGRAFSKIH, KLINIČKIH I LABORATORIJSKIH PARAMETARA NA ISHOD GLOMERULONEFRITISA

U ispitivanoj kohorti pedijatrijskih pacijenata sa bolestima glomerula, posmatrane su sledeće ishodne varijable: nastanak kompletne remisije bolesti, eGFR u trenutku uzorkovanja krvi za potrebe ove studije, kao i nastanak arterijske hipertenzije tokom trajanja bolesti. Sledeći parametri su u univariјantnoj analizi pokazali povezanost sa nastankom kompletne remisije: muški pol, primena određene terapije i veća eGFR u trenutku postavljanja dijagnoze. Naime, dečaci su imali šansu od 60,6% da postignu remisiju, a devojčice šansu od 31,6% ($p=0,018$). Remisiju je postiglo 78,3% pacijenata na kortikoterapiji, 42,9% pacijenata bez terapije, 32,4% pacijenata na kortikosteroidima i imunosupresivima, dok niko od pacijenata na rituksimabu nije postigao remisiju ($p<0,001$). Multivariјantna linearna regresiona analiza je pokazala da je model, koji uključuje pol (Beta=-0,199, $p=0,104$) i eGFR u trenutku postavljanja dijagnoze (Beta=0,232, $p=0,06$), statistički značajan, ali uz nisku vrednost prilagođenog R^2 (prilagođeni $R^2=0,085$, $p=0,022$).

Sledeći parametri su u univariјantnoj analizi pokazali povezanost sa eGFR u trenutku sprovođenja studije: muški pol, uzrast na početku bolesti, eGFR u trenutku postavljanja dijagnoze, kao i vrednost

kreatinina u trenutku postavljanja dijagnoze. Naime, dečaci su imali ishodnu eGFR od $153,6 \pm 36,2$ ml/min/1,73m², a devojčice $129,1 \pm 36,4$ ml/min/1,73m² ($p=0,007$). Stariji uzrast na početku bolesti bio je povezan sa nižom vrednošću eGFR u trenutku pregleda ($\rho=-0,247$, $p=0,041$). Brža eGRF u trenutku dijagnoze je bila povezana sa bržom eGFR na ishodu ($\rho=0,380$, $p=0,002$). Viša vrednost kreatinina u trenutku postavljanja dijagnoze je bila povezana sa lošijim eGFR na ishodu ($\rho=-0,330$, $p=0,007$). Multivarijantna linearna regresiona analiza je pokazala da je model, koji uključuje pol ($\text{Beta}=-0,284$, $p=0,017$), uzrast na početku bolesti ($\rho=-0,040$, $p=0,772$), eGFR u trenutku postavljanja dijagnoze ($\text{Beta}=0,162$, $p=0,455$) i nivo kreatinina u trenutku postavljanja dijagnoze ($\rho=-0,208$, $p=0,377$), bio statistički značajan (prilagođeni $R^2=0,201$, $p=0,001$). Pri tome se muški pol izdvojio kao nezavisni prediktor boljeg ishoda.

Sa razvojem arterijske hipertenzije su bili povezani sledeći parametri u univarijantnoj analizi: vrsta primenjene terapije, eGFR u trenutku postavljanja dijagnoze, kao i patološki laboratorijski nalazi u trenutku postavljanja dijagnoze, uključujući nivo hemoglobina, kreatinina i triglicerida u krvi, brzinu sedimentacije i prisustvo proteinurije. Arterijsku hipertenziju je razvilo 64,7% pacijenata na kortikosteroidima i imunosupresivima, 57,1% pacijenata koji su imali i rituksimab u terapiji, 21,7% pacijenata koji su bili samo na kortikosteroidima i 14,3% pacijenata koji nisu lečeni ($p=0,004$). Kod 75,0% pacijenata koji su imali patološke vrednosti eGFR u trenutku postavljanja dijagnoze razvila se hipertenzija u odnosu na samo 38,2% pacijenata sa urednim eGFR na dijagnozi ($p=0,02$). Pacijenti koji su kasnije razvili arterijsku hipertenziju su u trenutku postavljanja dijagnoze imali niži nivo hemoglobina u krvi ($117,2 \pm 19,0$ g/L prema $125,5 \pm 14,7$ g/L, $p=0,04$), viši nivo kreatinina ($76,2 \pm 57,0$ umol/L prema $50,7 \pm 21,9$ umol/L, $p=0,013$), viši nivo triglicerida ($1,6 \pm 1,3$ mmol/L prema $1,0 \pm 0,6$ mmol/L, $p=0,029$), kao i bržu sedimentaciju ($69,2 \pm 32,3$ mm/h prema $44,0 \pm 33,9$ mm/h, $p=0,030$). Među pacijentima sa proteinurijom u trenutku postavljanja dijagnoze, njih 54,3% je razvilo hipertenziju u poređenju sa 31,2% pacijenata bez proteinurije ($p=0,05$). Uključivanjem svih ovih parametara u multiplu linearnu regresionu analizu nije identifikovan značajan prediktivni model (prilagođeni $R^2=0,102$, $p=0,179$).

4.4. ANALIZA POLIMORFIZAMA U STRUKTURNIM GENIMA BUBREGA KOD PACIJENATA SA BOLESTIMA GLOMERULA U POREĐENJU SA ZDRAVIM KONTROLAMA

Polimorfizam na lokusu rs12917707 u genu *UMOD* nije bio u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži kod ispitivanih pacijenta, dok je isti polimorfizam bio u ravnoteži u kontrolnoj grupi. Polimorfizam na lokusu rs17319721 u genu *SHROOM3* bio je u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži u obe grupe ispitanika. Nisu primećene statistički značajne razlike između pacijenata sa glomerulonefritisom i zdravih osoba u pogledu frekvencije genotipova i frekvencije alela u ispitivanim genima (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Učestalost genotipova i alela polimorfizama rs12917707 u genu *UMOD* i rs17319721 u genu *SHROOM3* kod kontrolne grupe i pacijenata sa glomerulonefritisom

Gen (polimorfizam)	Zdrave kontrole (n=) n (%)	Pacijenti sa glomerulonefritisom (n=) n (%)	<i>p</i>	OR (95% CI)
<i>UMOD</i> (rs12917707)				
Alel	222	140		
G T	178 (80,18%) 44 (19,82%)	114 (81,43%) 26 (18,57%)	0,89	1,084 (0,632- 1,857)
genotip	111	70		
GG GT TT	73 (65,77%) 32 (28,83%) 6 (5,41%)	49 (70%) 16 (22,86%) 5 (7,14%)	0,64	1,214 (0,637- 2,313) 0,731 (0,366- 1,462) 1,346 (0,395- 4,589)
<i>SHROOM3</i> (rs17319721)				
Alel	224	142		
A G	90 (40,18%) 134 (59,82%)	57 (40,14%) 85 (59,86%)	0,92	0,998 (0,650- 1,533)
genotip	112	71		
AA AG GG	17 (15,18%) 56 (50%) 39 (34,82%)	14 (19,72%) 29 (40,85%) 28 (39,44%)	0,42	1,372 (0,629- 2,993) 0,690 (0,378- 1,259) 1,218 (0,659- 2,253)

P vrednost je računata na osnovu hi-kvadrat testa; OR, odnos šansi; CI, interval poverenja.

4.5. ANALIZA POLIMORFIZAMA U GENIMA IMUNSKOG SISTEMA KOD PACIJENATA SA BOLESTIMA GLOMERULA U POREĐENJU SA ZDRAVIM KONTROLAMA

Svi analizirani polimorfizmi u genima imunskog sistema bili su u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži i kod pacijenata i kod zdravih osoba, osim rs3212227 u genu *IL12B* u grupi zdravih osoba. Alel A za polimorfizam rs1800629 u genu *TNF* bio je statistički značajno češći kod pacijenata sa GN u poređenju sa zdravim kontrolama ($p=0,009$), dok razlika u genotipovima nije uočena. Nisu primećene druge razlike između pacijenata i kontrola u pogledu frekvencije genotipova i frekvencije alela u ispitivanim genima (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Učestalost genotipova i alela polimorfizama u genima imunskog sistema kod kontrolne grupe i pacijenata sa glomerulonefritisom

Gen (polimorfizam)	Zdrave kontrole (n=) n (%)	Pacijenti sa GN (n=) n (%)	p	OR (95% CI)
IL10 (rs1800896)				
Alel	238	142		
G	102 (42,86%)	64 (45,07%)	0,67	1,094 (0,719-1,663)
A	136 (57,14%)	78 (54,93%)		
Genotip	119	71		
GG	20 (17,09%)	12 (16,9%)	0,81	1,108 (0,506-2,424)
GA	62 (52,99%)	40 (56,34%)		0,843 (0,466-1,522)
AA	37 (31,62%)	19 (26,76%)		1,220 (0,635-2,343)
IL10 (rs1800871)				
Alel	238	142		
C	179 (75,21%)	114 (80,28%)	0,25	1,342 (0,807-2,229)
T	59 (24,79%)	28 (19,72%)		
genotip	119	71		
CC	66 (56,41%)	46 (64,79%)	0,43§	1,477 (0,805-2,709)
CT	47 (40,17%)	22 (30,99%)		0,687 (0,368-1,282)
TT	6 (5,13%)	3 (4,23%)		0,831 (0,201-3,431)
IL10 (rs3024505)				
Alel	236	142		
G	200 (84,75%)	120 (84,51%)	0,10	0,982 (0,552-1,747)
A	36 (15,25%)	22 (15,49%)		
genotip	118	71		
GG	83 (70,94%)	52 (73,24%)	0,39§	1,154 (0,598-2,227)
GA	34 (29,06%)	16 (22,54%)		0,718 (0,362-1,425)
AA	1 (0,85%)	3 (4,23)		5,161 (0,526-50,609)
TNF (rs1800629)				
Alel	238	142		
G	215 (90,34%)	115 (80,99%)	0,009	0,455 (0,249-0,830)
A	23 (9,66%)	27 (19,01%)		
genotip	119	71		
GG	97 (82,91%)	46 (64,79%)	0,21§	0,417 (0,213-0,817)
GA	21 (17,95%)	23 (32,39%)		2,236 (1,127-4,435)
AA	1 (0,85%)	2 (2,82%)		3,420 (0,304-38,418)
TNF (rs361525)				
Alel	238	142		
G	234 (98,32)	137 (96,48%)	0,30§	0,468 (0,124-1,773)
A	4 (1,68)	5 (3,52%)		

genotip	119	71		
GG	115 (98,29%)	66 (92,96%)	0,30§	0,459 (0,119-1,769)
GA	4 (3,42%)	5 (7,04%)		2,178 (0,565-8,394)
AA	0 (0%)	0 (0%)		-
IL6 (rs1800795)				
alel	238	142		
G	156 (65,55%)	93 (65,49%)	1,0	0,997 (0,644-1,544)
C	82 (34,45%)	49 (34,51%)		
genotip	119	71		
GG	52 (44,44)	31 (43,66%)	1,0	0,998 (0,552-1,806)
GC	52 (44,44)	31 (43,66%)		0,998 (0,552-1,806)
CC	15 (12,82)	9 (12,68%)		1,006 (0,415-2,436)
IL12B (rs3212227)				
alel	234	142		
T	177 (75,64%)	103 (72,54%)	0,06	0,850 (0,529-1,366)
G	57 (24,36%)	39 (27,46%)		
genotip	117	71		
TT	71 (60,68%)	35 (49,3%)	0,50§	0,629 (0,347-1,142)
TG	35 (29,91%)	33 (46,48%)		2,034 (1,103-3,750)
GG	11 (9,4%)	3 (4,23%)		0,425 (0,114-1,579)
IL23R (rs11209026)				
alel	238	140		
G	227 (95,38%)	135 (96,43%)	0,62§	0,308 (0,445-3,846)
A	11 (4,62%)	5 (3,57%)		
genotip	119	70		
GG	108 (92,31%)	65 (92,86%)	0,79§	1,324 (0,440-3,982)
GA	11 (9,4%)	5 (7,14%)		0,755 (0,251-2,271)
AA	0 (0%)	0 (0%)		-

P vrednost je računata na osnovu hi-kvadrat testa osim § gde je primenjen Fisher-ov test tačne verovatnoće; OR, odnos šansi; CI, interval poverenja.

Pošto su analizirana tri polimorfizma u genu *IL10*, izvršili smo i analizu haplotipa. Dva retka genotipa (CGG/TGG, n=1 and TGA/TAA, n=1) su izostavljena iz ove analize. Frekvencije haplotipova *IL10* bile su slične kod pacijenata sa GN i zdravih osoba. Takođe smo analizirali i haplotip za gen *TNF*, jer su u njemu analizirana dva polimorfizma. Genotip niske frekvencije (GA/AG, n=1) je izostavljen iz analize. Pronađena je značajna razlika u učestalosti haplotipova kod pacijenata i zdravih osoba u genu *TNF* (p=0,04) (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Učestalost haplotipova za polimorfizme rs1800629 i rs361525 u *TNF* genu kod zdravih kontrola i pacijenata sa glomerulonefritisom

<i>TNF</i> haplotip	Zdrave kontrole [#] (n=118) n (%)	Pacijenti sa glomerulonefritiso m (n=70) n (%)	<i>p</i>	OR (95% CI)
GG/GG	92 (77,9)	42 (60,0)	0,008	0,424 (0,222-0,809)
GG/GA	4 (3,4)	4 (5,7)	0,473 [§]	1,727 (0,418-7,136)
GG/AG	21 (17,8)	22 (31,4)	0,031	2,117 (1,061-4,224)
AG/AG	1 (0,8)	2 (2,8)	0,556 [§]	3,441 (0,306-38,661)

P vrednost je računata na osnovu hi-kvadrat testa osim § gde je primenjen Fisher-ov test tačne verovatnoće; OR, odnos šansi; CI, interval poverenja.

P vrednost nije računata za genotipove sa frekvencijom manjom od 1% (GAAG genotip, n=1).

4.6. POVEZANOST POLIMORFIZAMA U STRUKTURNIM GENIMA BUBREGA I GENIMA IMUNSKOG SISTEMA SA SOCIODEMOGRAFSKIM I KLINIČKIM KARAKTERISTIKAMA PACIJENATA SA BOLESTIMA GLOMERULA

Analizirana je povezanost alela, genotipova i haplotipova (gde je to bilo primenljivo) sa kliničkim karakteristikama pacijenata: godinama na početku bolesti, prisustvom primarnog ili sekundarnog GN, načinom lečenja, postizanjem remisije i prisustvom hipertenzije. Korišćena je medijana od 8 godina kao granična vrednost za godine na početku bolesti i nije nađena statistički značajna asocijacija starosti na početku GN i učestalosti ispitivanih polimorfizama. Slično tome, nije bilo značajne razlike u distribuciji alela, genotipova, nosilaca alela i haplotipova između pacijenata:

- (I) sa primarnim i sekundarnim GN;
- (II) bez potrebe za terapijom u odnosu na one lečene kortikosteroidima i one kojima je bila potrebna imunosupresivna terapija ili rituksimab;
- (III) sa postizanjem i nepostizanjem remisije;
- (IV) sa prisustvom i odsustvom hipertenzije.

4.7. SEKVENCIRANJE CELOG EGZOMA KOD PACIJENATA SA BOLESTIMA GLOMERULA

Sociodemografski i klinički podaci kohorte ispitanika sa glomerulonefritisom kod koje je sprovedena analiza sekvenciranja celog egzoma su navedeni u Tabeli 4.7. Ispitivanje je obuhvatilo 10 pacijenata sa primarnim glomerulonefritisom (5 sa IgA nefropatijom, 2 sa nefrotskim sindromom osetljivim na kortikosteroide, 1 sa FSGS, 1 sa MGN, 1 sa anti-GBM nefritisom), 14 pacijenata sa lupus nefritisom i 7 pacijenata sa HSP nefritisom. Klinička kontrolna grupa obuhvatila je 4 pacijenta sa sistemskim lupusom bez glomerulonefritisa i 4 pacijenta sa HSP bez glomerulonefritisa. Pored toga, analizirana je i kontrolna grupa koju je činilo 50 pedijatrijskih pacijenata kod kojih nije bilo prisutno bubrežno oboljenje.

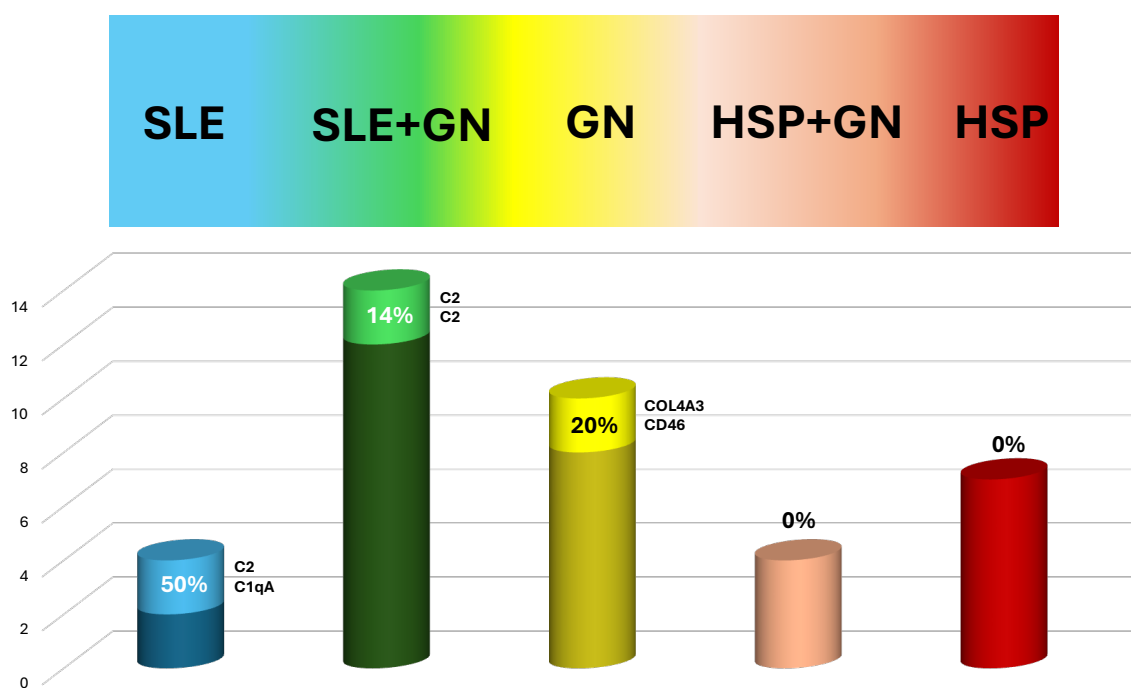
Tabela 4.7. Sociodemografske i kliničke karakteristike pacijenata

Ispitivana karakteristika	Svi pacijenti	Primarni GN	SLE i GN	HSP i GN	SLE	HSP
Broj	39	10	14	7	4	4
Pol (% muški)	51,3%	80,0%	21,4%	71,4%	50,0%	50,0%
Uzrast na početku (godine) medijana, interkvartilni opseg	10 (5-13)	9,5 (4-13)	13 (11-15,5)	5 (4-7)	11 (9-12)	4 (3-5)
Uzrast pri uzorkovanju (godine) medijana, interkvartilni opseg	15 (7-17)	15 (10-16)	17 (15-18)	7 (4-8)	17,5 (15,5-19)	4 (3-5)
Trajanje bolesti (mesece) medijana, interkvartilni opseg	30 (4-63)	39 (30-78)	22,5 (11-61)	4 (2-22)	81 (60-84)	1 (0,5-1)
Terapija (%)						
bez terapije	5,2%	20,0%	0,0%	0,0%	0,0%	50,0%
KS	33,3%	30,0%	7,1%	71,4%	50,0%	50,0%
KS i IS	48,7%	30,0%	85,7%	28,6%	50,0%	0,0%
KS, IS i mab	7,7%	20,0%	7,1%	0,0%	0,0%	0,0%
Broj relapsa GN	1 (0-2)	2 (0,5-4,5)	1 (1-2)	0 (0-2,5)	-	-

GN – glomerulonefritis, SLE – sistemski eritemski lupus, HSP – Henoch-Schoenlein-ova purpura, KS – kortikosteroidi, IS – imunosupresivna terapija, mab – monoklonsko antitelo rituksimab

Glavni WES rezultati su navedeni na Slici 4.1, a detaljna analiza varijanti je prikazana u Tabeli 4.8. Među 10 pacijenata sa primarnim glomerulonefritsom, dva pacijenta su imala pozitivan nalaz analizom WES (20%). Otkrivena je verovatno patogena heterozigotna *in frame* varijanta (c.3546_3548dup, p.Gly1183dup) u genu *COL4A3* kod jednog pacijenta. Ova varijanta je bila potpuno odsutna u kontrolnoj grupi. Varijante u *COL4A3* su povezane sa autozomno dominantnim Alportovim sindromom tipa 3A (OMIM:104200), autozomno recesivnim Alportovim sindromom tipa 3B (OMIM:620536), i autozomno dominantnom familijarnom benignom hematurijom tipa 2 (OMIM:620320). Varijanta c.3546_3548dup prethodno je opisana kod pacijenata sa autozomno dominantnim Alportovim sindromom (174). Kod našeg pacijenta simptomi u vidu hematurije su počeli u uzrastu od 6 godina. U to vreme histopatološki nalaz bubrega nije bio dovoljno informativan. U uzrastu od 9 godina kod dečaka je registrovana proteinurija, a sa 10 godina obostrano senzorineuralno oštećenje sluha za visoke frekvencije, što su sve odlike Alportovog sindroma. Ista varijanta je nađena kod njegove majke, koja nije imala simptome bolesti.

Heterozigotna do sada neopisana varijanta nejasnog značaja (c.1122G>C, p.Ter374TyrextTer23) pronađena je u *CD46* genu kod jednog pacijenta sa primarnim GN. Varijante u *CD46* su povezane sa sklonošću ka atipičnom hemolitičko-uremijskom sindromu (aHUS) tipa 2 (OMIM:612922), koji može da se nasledi autozomno dominantno ili recesivno. Simptomi su kod pacijenta počeli u uzrastu od 18 godina, u vidu hemoptizija, epileptičkog napada, mikrohematurije i anemije. Mladiću su registrovana pozitivna anti-GBM antitela, čime je potvrđena dijagnoza *Goodpasture*-ovog sindroma. Lečen je kortikosteroidima i ciklofosfamidom, sa pozitivnim terapijskim odgovorom.



Slika 4.1. Rezultati sekvenciranja celog egzoma kod ispitivanih pacijenata

Prikazan je procenat pacijenata sa pozitivnim genetičkim nalazom i geni u kojima su nađene varijante; GN – glomerulonefritis, SLE – sistemski eritemski lupus, HSP – Henoch-Schoenlein-ova purpura

Kod dvoje od 14 pacijenata sa lupus nefritisom pronađena je heterozigotna patogena varijanta (c.841_849+19del, p.?) u genu C2. Njihov početak bolesti je bio nešto raniji u poređenju sa drugim pacijentima sa lupus nefritisom (10 godina vs. 13,5 godina). Imali su dobar odgovor na terapiju steroidima i imunosupresivnim lekovima. Ista varijanta je pronađena kod jednog od 4 pacijenta sa SLE bez lupus nefritisa. Ova varijanta je nađena u heterozigotnom obliku i kod jednog pacijenta iz kontrolne grupe, koji nije imao simptome niti znake bilo koje autoimune bolesti. Varijante u C2 su povezane sa deficijencijom C2 komponente sistema komplementa, koja se nasleđuje autozomno recesivno (OMIM:217000). Varijanta c.841_849+19del je prethodno opisana u homozigotnom i složenom heterozigotnom stanju kod pacijenata sa deficijencijom C2 komponente sistema komplementa (175; 176; 177; 178). Prema softverskom predviđanju ova varijanta menja protein C2.

Jedan od četvoro pacijenata sa SLE bez glomerulonefritisa imao je homozigotnu patogenu *nonsense* varijantu (c.622C>T, p.Gln208Ter) u C1QA genu. Varijante u C1QA su povezane sa autozomno recesivnom C1q deficijencijom tipa 1 (OMIM:613652). Varijanta c.622C>T je prethodno opisana kod pacijenata sa SLE (179; 180; 181; 182). Naši SLE pacijenti sa navedenim varijantama su imali početak bolesti u uzrastu od 9 i 10 godina, tj ranije u poređenju sa drugima pacijentima obolelim od sistemskog lupusa, kojima je bolest počela sa 12 godina. Nisu pronađene značajne varijante na WES ni kod 7 pacijenata sa HSP i glomerulonefritisom, niti kod 4 pacijenata sa HSP bez GN.

Dodatna analiza prisustva visokorizičnih varijanti u genima povezanim sa nastankom BG identifikovanim u GWAS studijama, nije pokazala pozitivne rezultate u našoj kohorti.

Tabela 4.8. Pacijenti sa glomerulonefritisom i varijantama od značaja otkrivenim pomoću WES analize

Gen	Oznaka pacijenta	Klinička dijagnoza	Promena nukleotida	Promena proteina	Tip varijante, molekularna posledica, lokacija varijante	Klinički značaj (ACMG kategorija)	Učestalost prema gnomAD exome v4 i gnomAD genomes v4 MAF	Kohorta 50 pacijenata bez imunski posredovane bolesti	Teoretska predikcija	Način nasleđivanja / zigotnost	Refrence / nova varijanta	Bolest (OMIM)
<i>COL4A3</i>	G034	Primarni GN	<u>NM_000091.5:c.3546_3548dup</u>	p.Gly1183 dup	duplikacija, <i>in frame</i> , egzon	LP (PS1,PM1,PM2,PM4:Supporting,PS4:Supporting)	0.00000205/ 0.00000657	Nije nađena	NA	AD/heterozigot	ClinVarID:438655 PMID:30586318	Alportov sindrom tipa 3A (OMIM:104200)
<i>CD46</i>	G026	Primarni GN	<u>NM_172358.3:c.1122G>C</u>	p.(Ter374 Tyrext*23)	Tačkasta mutacija, <i>StopLoss</i> , egzon	VUS (PM4, PM2, BP4)	Nije nađena	Nije nađena	EIGEN PC:benigna jako; <u>FATHM M-MKL</u> :benigna jako;DANN:benigna umereno;MutationTaster:ne određeno;EIGEN:benigna umereno	AD/AR/heterozigot	novel	Atipično hemolitičko uremijski sindrom tipa 2 (aHUS) (OMIM:612922)
<i>C2</i>	G032, G027, G006	Jedno sa SLE, LN, jedno sa SLE bez LN, jedno u kontrolnoj grupi	NM_000063.6:c.841_849+19del	p.?	delecija, mesto isecanja	P (PVS1, PS3, PP1, PP5, BS2)	0.0046-0.000008 homozigot/ 0.00608-0.000032 homozigot	Jedna kontrola: 0.02	NA	AR/heterozigot	ClinVar ID:50634; PMID:35874679,34426522,33726816,31980526,31440263,27943079,26590091,260	C2 deficijencija (OMIM:217000)

											38300,254 54804,961 6367.	
CIQA	G003	SLE	<u>NM_015991.4:</u> <u>c.622C>T</u>	p.Gln208T er	Tačkasta mutacija, nonsens, egzon	P (PVS1, PP1, PM2)	0.0000253- 0.00000068 5 homozigot/ nije nađena	Nije nađena	EIGEN PC:benigna umereno;FAT HMM- MKL:benigna umereno;DA NN:benigna podržavajuće; MutationTaste r:neodređeno; EIGEN:benig na podržavajuće	AR/homozigo t	ClinVar ID:17073 PMID:300 08451,297 39689,265 63161,216 54842,922 5968,8840 296,75944 74	C1q deficijencija tipa 1 (OMIM:613 652)

AD-autozomno dominantno, AR-autozomno recesivno, NA-nije dostupno, P-patogena, LP- verovatno patogena, VUS-varijanta nejasnog značaja, PVS-veoma jak dokaz patogenosti, PS-jak dokaz patogenosti, PM-umeren dokaz patogenosti, PP-podržavajući dokaz patogenosti.

5. DISKUSIJA

U ispitivanoj kohorti koja je obuhvatila 71 dete sa glomerulonefritisom (GN) tokom perioda od godinu dana, primarni GN je dijagnostikovao kod 40 (56%) slučajeva, a sekundarni kod 31 (44%). U grupi primarnih GN, pedijatrijski nefrotski sindrom osetljiv na steroide (pSSNS) je činio 30%, IgA nefropatija (IgAN) 25%, IgM nefropatija 17,5%, membranoproliferativni glomerulonefritis (MPGN) 12,5%, fokalna segmentna glomeruloskleroza (FSGS) 7,5%, dok su membranozni glomerulonefritis (MN), anti-GBM nefritis i brzoprogresivni nefritis opisani u po jednom slučaju. Epidemiološki podaci o učestalosti GN kod dece se najčešće odnose na akutni poststreptokokni glomerulonefritis, koji je najčešći oblik, naročito u nerazvijenim zemljama, ali ova forma GN nije bila predmet našeg istraživanja koje se bavilo hroničnim GN. Podaci o učestalosti drugih formi GN nisu bazirani na podacima iz opšte pedijatrijske populacije, već se navode kao procenat određenih formi GN među biopsiranim pacijentima u tercijarnim ustanovama. Nefrotski sindrom osetljiv na steroide je heterogena grupa GN, jer 80-90% dece sa GN ima povoljan odgovor na kortikoterapiju (183). Istraživanja pokazuju da 94% dece sa dijagnozom pSSNS patohistološki zapravo ima bolest sa minimalnim promenama (BMP) (183; 184). Prema dostupnim podacima, FSGS obično čini 10-20% svih biopsija bubrega kod dece (185). Procenat u našoj kohorti je nešto manji (7,5%) što se može objasniti i relativno velikom učestalošću IgM nefropatije u našoj kohorti (17,5%). Naime, IgM nefropatija se najčešće može smatrati prelaznom formom između BMP i FSGS (186; 187). Prema dostupnim podacima, IgAN čini oko 25% svih biopsija bubrega kod dece što je u skladu sa našim rezultatima (188). MPGN se obično opisuje kod do 7% biopsiranih pacijenata, dok se u našoj kohorti uočava nešto veći procenat (12,5%) (189). Ostale forme GN su značajno ređe, što je u skladu i sa našim podacima. Važno je napomenuti da su incidencija i prevalencija GN potcenjene i kod odraslih i kod dece, jer epidemiološke studije ne uključuju osobe sa asimptomatskim varijantama BG, one čiji je GN spontano izlečen, ali i one kod kojih je BG dijagnostikovana u uznapređenoj fazi kada više nije opravdana biopsija bubrega i kada se više ne zna šta je dovelo do bubrežne insuficijencije.

Učestalost sekundarnih nefritisa u kohortama biopsiranih pedijatrijskih pacijenata je niža nego učestalost primarnih GN i iznosi oko 30%, sa oko 10-15% slučajeva koji imaju LN i 10-15% GN u sklopu HSP (190; 191; 192). Međutim, ova procena verovatno nije adekvatna, jer se mnogi pacijenti sa jasnom kliničkom slikom sistemske bolesti ili vaskulitisa sa afekcijom bubrega, posebno ako je ona blaga, ne biopsiraju.

Medijana uzrasta na početku bolesti kod naših ispitanika bila je 8 godina i nije se razlikovala kod ispitanika sa primarnim i sekundarnim GN, mada je srednji uzrast na početku primarnog GN bio 7,5 godina, a na početku sekundarnog GN 10,2 godine. Ovo je u skladu sa nalazima iz literature po kojima primarni GN nastaju u ranom školskom uzrastu, a sekundarni GN obično posle 10. godine života (191; 193).

U grupi ispitivanih pacijenata sa primarnim glomerulonefritisom procenat dečaka je bio veći nego u grupi pacijenata sa sekundarnim glomerulonefritisom (58% prema 32%). Literaturni podaci pokazuju da je učestalost primarnih GN veća kod dečaka. Poznato je da su muškarci u dvostruko većem riziku da dobiju membranozni glomerulonefritis u odnosu na žene (3). U dečjoj populaciji BMP, FSGS i IgAN češće pogađaju dečake nego devojčice sa odnosom od oko 2:1 (57; 194). Sa druge strane, lupus nefritis je autoimuna bolest koja je četiri do deset puta češća kod žena nego muškaraca, naročito od puberteta nadalje (32; 192). Ipak, GN u sklopu HSP je nešto češći, ali i blaži, kod dečaka nego kod devojčica (195).

Vrednosti hemoglobina u krvi su bile niže kod pacijenata sa sekundarnim bolestima glomerula u odnosu na pacijente sa primarnim bolestima glomerula. Nivo proteina i albumina u krvi je bio niži kod naših pacijenata sa primarnim bolestima glomerula. Koncentracija kalijuma u krvi u trenutku uzorkovanja za potrebe ove studije je bila viša kod pacijenata sa primarnim GN. Nivoi ukupnog holesterola i obe njegove frakcije su bili viši kod pacijenata sa primarnim glomerulonefritisima u odnosu na pacijente sa sekundarnim glomerulonefritisima. Razlika u nivou hemoglobina kod pacijenata sa primarnim u odnosu na sekundarne GN, najverovatnije je uzrokovana prisustvom anemije u sklopu SLE kod pacijenata sa LN. Pošto je SLE sistemska autoimunska bolest praćena

generalizovanom inflamacijom, depozicijom imunskih kompleksa, aktivacijom komplementa i često izraženijim oštećenjem glomerula, kod ovih pacijenata se može očekivati izraženija proteinurija, hipoalbuminemija, poremećaji lipida i anemija (zbog prisustva hronične bolesti, oštećenja bubrega ili sistemske inflamacije), u poređenju sa blažim oblicima primarnog glomerulonefritisa. Sa druge strane, više kohortnih studija i preglednih radova pokazuje povećanje ukupnog holesterola, LDL holesterola i triglicerida kod različitih formi GN, što je u korelaciji sa hipoalbuminemijom (196). Međutim, nema poređenja između primarnih i sekundarnih formi GN u literaturi.

Kompletna remisija, koja podrazumeva da su pacijenti dobro i bez terapije, postignuta je kod 55% dece, i to kod 48% dece sa primarnim i 64% dece sa sekundarnim nefritisom u našoj kohorti. Literaturni podaci pokazuju da je procenat pacijenata sa primarnim GN koji postižu remisiju oko 60% (197; 198), i to do 90% kod pacijenata sa pSSNS, odnosno sa BMP (57). Nešto lošiju prognozu ima MPGN sa procentom remisije oko 50% i FSGS sa procentom remisije od oko 40% i sa većom šansom za razvoj hronične bubrežne bolesti (HBB) (199; 200). U skladu sa tim, naši pacijenti koji su tokom trajanja bolesti morali da pređu na hroničnu hemodijalizu, upravo su imali dijagnozu FSGS i MPGN. Što se tiče ishoda bolesti kod sekundarnih GN, remisija se postiže kod oko 60-80% pedijatrijskih slučajeva, i to obično već tokom šest meseci do godinu dana od postavljanja dijagnoze (201; 202). Ovo je u skladu sa našim nalazom od 64% pacijenata koji su postigli kompletnu remisiju tokom 6,5 godina praćenja.

Tokom trajanja bolesti arterijsku hipertenziju je razvilo 45% pacijenata sa GN, i to 42% pacijenata sa primarnim i 48% pacijenata sa sekundarnim glomerulonefritisom. Arterijska hipertenzija se razvija kod GN usled: zadržavanja natrijuma i vode u telu usled oštećenja glomerula, prekomerne aktivacije renin–angiotenzin–aldosteronskog sistema (RAAS) usled hipoperfuzije bubrega, smanjene sposobnosti bubrega da reguliše pritisak usled nemogućnosti adekvatne natriureze, endotelne disfunkcije i inflamacije, proteinurije i albuminurije, kao i usled simpatičke hiperaktivnosti (1; 203; 204). U određenim formama GN pojedini mehanizmi su dominantniji. Učestalost HTA kod pacijenata sa primarnim GN se razlikuje kod pojedinih formi: 10-25% kod pacijenata sa BMP i IgAN, oko 50% kod pacijenata sa FSGS i kod čak 80% pacijenata sa MPGN (1; 99; 205; 206; 207). Učestalost hipertenzije raste sa stepenom oštećenja glomerula i sa trajanjem bolesti. I u našoj studiji, pacijenti lečeni multiplim terapijama imali su veću šansu da dobiju arterijsku hipertenziju. Ako se uzmu u obzir sekundarni GN, arterijska hipertenzija se viđa kod 40-50% pacijenata sa LN, dok je kod GN u sklopu HSP učestalost hipertenzije manja nego kod LN i kod primarnih GN (192; 208). Ovi podaci su u skladu sa našim nalazom prisustva hipertenzije kod 48% pacijenata sa sekundarnim GN, među kojima je većina imala LN.

Od ukupnog broja pacijenata, njih 12 (16,9%) je imalo neki drugi komorbiditet. Tri pacijenta su imala nizak rast (jedan sa LN i dva sa pSSNS) i zbog toga su lečeni hormonom rasta. Nizak rast je obično povezan sa MPGN i FSGS. Kod BMP, tj. pSSNS, nizak rast je najčešće povezan sa upotrebom kortikosteroidne terapije, što je slučaj i kod LN (99; 209; 210; 211). Kortikosteroidi i imunosupresivi mogu dati i druga neželjena dejstva, a pojedina od njih opisana su i u našoj kohorti pacijenata, uključujući kataraktu, insulinsku rezistenciju, osteoporozu, posteriorni reverzibilni encefalopatski sindrom, sepsu itd.

U ispitivanoj kohorti pedijatrijskih pacijenata sa bolestima glomerula, posmatrane su sledeće ishodne varijable: nastanak kompletne remisije bolesti, eGFR u trenutku uzorkovanja krvi za potrebe ove studije, kao i nastanak arterijske hipertenzije tokom trajanja bolesti. Sledeći parametri su u univarijantnoj analizi pokazali povezanost sa nastankom kompletne remisije: muški pol, primena određene terapije i veća eGFR u trenutku postavljanja dijagnoze. Muški pol je kod naših pacijenata bio povezan sa boljim ishodom bolesti kada se on meri stepenom remisije ili pomoću brzine glomerulske filtracije. Prema literaturnim podacima, muški pol je bio povezan sa bržim odgovorom na kortikoterapiju (99). Međutim, muški pol nije bio nezavisan prediktor boljeg ishoda bolesti ni u jednoj formi GN (99; 192; 206; 207; 208; 212).

Remisiju je postiglo 78,3% pacijenata na kortikoterapiji, 42,9% pacijenata bez terapije, 32,4% pacijenata na kortikosteroidima i imunosupresivima, dok niko od pacijenata na rituksimabu nije postigao kompletnu remisiju. Ovaj nalaz potvrđuje činjenicu da su teži pacijenti, refraktarni na svu prethodnu terapiju, koji imaju veću šansu od komplikacija, lečeni intenzivnijom terapijom, uključujući rituksimab. Važno je napomenuti da se kod ovih pacijenata sa primenom rituksimaba značajno redukuje broj relapsa bolesti, a kod nekih je postignuta parcijalna remisija GN. Niži eGFR bio je povezan sa lošim ishodom bolesti u našoj kohorti, bilo da se kao ishod uzme prisustvo remisije ili stepen glomerulske filtracije u trenutku uzorkovanja krvi. Slično tome, viša vrednost kreatinina u trenutku dijagnoze bila je povezana sa lošijim ishodom kada se on meri kao eGFR u trenutku pregleda. Poznato je da je niži eGFR u trenutku postavljanja dijagnoze snažan prediktor lošijeg ishoda bolesti bubrega, ukazuje na sporiju ili nepotpunu remisiju i veći rizik od progresije ka hroničnoj bubrežnoj bolesti (HBB), i to gotovo u svim oblicima glomerulonefritisa (GN) (192; 205; 206; 207; 211; 213; 214). Takođe je poznato da se prognoza GN pogoršava ukoliko je vrednost kreatinina iznad normale za uzrast (192; 207; 213; 214).

Multivarijantna linearna regresiona analiza je pokazala da je model, koji uključuje pol ($\beta = -0,199$, $p = 0,104$) i eGFR u trenutku postavljanja dijagnoze, statistički značajan, ali uz nisku vrednost prilagođenog R^2 (oko 9%) što ukazuje na to da postoje brojni drugi faktori koji utiču na ishod GN, a nisu obuhvaćeni našim istraživanjem. Stope remisije su povezane sa težinom bolesti, odgovorom na terapiju i sa histološkim tipom GN (99; 192; 206; 207; 208; 212).

Stariji uzrast na početku bolesti bio je povezan sa lošijim ishodom bolesti, tj. sa nižom vrednošću eGFR u trenutku pregleda kod naših pacijenata. Literaturni podaci pokazuju da je stariji uzrast u trenutku postavljanja dijagnoze GN često povezan sa lošijom prognozom, mada jačina te povezanosti zavisi od tipa GN. Drugim rečima, mlađa deca imaju veću verovatnoću postizanja remisije i sporiju progresiju ka hroničnoj bubrežnoj bolesti (HBB) (192; 194; 205; 207; 208; 213; 215). Razlozi za to su višestruki. Kada se starija deca ili adolescenti jave lekaru, oštećenje glomerula često je već hronično, tj. postoje znaci fibroze i skleroze glomerula. Poznato je da polni hormoni utiču na imunski sistem tako da nastaju agresivniji i hroničniji imunski odgovori, ali je verovatno da polni hormoni imaju uticaja na tonus RAAS i na metabolizam podocita. Dalje, bubrezi mlađe dece imaju bolji regenerativni kapacitet - bolje se remodeluju i oporavljaju nakon akutnog oštećenja.

Sa razvojem arterijske hipertenzije u ispitivanoj kohorti su bili povezani sledeći parametri u univarijantnoj analizi: eGFR u trenutku postavljanja dijagnoze, kao i patološki laboratorijski nalazi u trenutku postavljanja dijagnoze, uključujući nivo kreatinina, hemoglobina i triglicerida u krvi, brzinu sedimentacije i prisustvo proteinurije. Literatura podržava ove nalaze. Naime, prisustvo arterijske hipertenzije u prethodnim studijama je bilo povezano sa lošijim bubrežnim funkcionalnim statusom (niži eGFR i viši kreatinin), proteinurijom, stepenom zapaljenja i dislipidemijom tipičnom za nefrotski sindrom (216). Važno je napomenuti da je proteinurija centralni marker aktivnosti GN, te da je kao takva povezana sa lošijom kontrolom krvnog pritiska i sa progresijom GN u HBB kod dece. Anemija je povezana sa težinom GN i lošijom regulacijom krvnog pritiska (216). Dislipidemija je tipičan nalaz kod nefrotskog sindroma i verovatno je da, pre svega preko modifikacije endotela, utiče na razvoj hipertenzije (217). Kohorte pacijenata sa GN, posebno sa LN, pokazuju da su proteinurija, sporiji eGFR i aktivnost bolesti povezani sa pojavom arterijske hipertenzije (218). Uključivanjem svih ovih parametara u multiplu linearnu regresionu analizu nismo identifikovali značajan prediktivni model što ukazuje na činjenicu da postoje i drugi značajni faktori rizika za nastanak hipertenzije kod pedijatrijskih pacijenata sa GN, koji nisu obuhvaćeni ovim istraživanjem, poput histoloških nalaza (intersticijska fibroza, tubularna atrofija, znaci polumeseca), aktivacija RAAS, simpatička hiperaktivnost, upotreba određenih lekova (204; 207; 210; 219; 220; 221; 221; 223).

Glavni nalaz selektivnog testiranja različitih SNP u genima imunskog sistema kod pedijatrijskih pacijenata sa GN jeste da je alel A na lokusu rs1800629 u genu *TNF* bio češći kod pacijenata sa GN u poređenju sa zdravim kontrolama. Ista razlika je uočena i u raspodeli genotipova između pacijenata sa GN i zdravih kontrola. Ovaj nalaz sugerise da opisani polimorfizam na lokusu rs1800629 može biti uključen u pogoršanje glomerularne inflamacije kod dece. Kao što je ranije

navedeno, TNF je jedan od glavnih proinflamatornih citokina imunskog sistema i kontrolor je inflamacije. Postoje dokazi da TNF učestvuje u nastanku i razvoju mnogih autoimunih i inflamatornih poremećaja, uključujući GN. Shodno tome, polimorfizmi u genima koji regulišu produkciju TNF mogu biti ključni faktori rizika za nastanak autoimune bolesti i ključni faktori koji određuju težinu bolesti.

Naše opažanje da je polimorfizam u vidu alela A na lokusu rs1800629 u genu *TNF* češći kod dece sa GN u skladu je sa činjenicom da ovaj polimorfizam utiče na ekspresiju gena. Ovaj polimorfizam je ranije povezivan sa različitim infektivnim i imunski posredovanim bolestima (224). U opštoj populaciji alel G je uobičajen na ovom lokusu, dok je A alel redak. Pokazano je da je upravo alel A povezan sa višim spontananim ili stimulisanim nivoima ekspresije gena *TNF*. Pored toga, osobe sa genotipom GA, u odnosu na osobe sa genotipom GG, imaju više nivoe informacione RNK prepisane sa gena *TNF* i više nivoe serumskog TNF proteina (225). Sa druge strane, povećana ekspresija gena *TNF* uočena je u *in vivo* animalnim modelima različitih formi GN (226). U skladu sa tim je i naše otkriće povezanosti polimorfizma u *TNF* genu sa GN, bez obzira na tip GN (primarni ili sekundarni). Naši rezultati impliciraju da, bez obzira na osnovni uzrok GN, prisustvo nukleotida A na jednom alelu na genskom lokusu rs1800629 može biti faktor koji podstiče pojačanu aktivnost TNF, olakšavajući upornu glomerularnu inflamaciju i imunološki posredovano oštećenje glomerula. Ovo je u skladu sa ustanovljenim mehanizmima patogeneze GN u kojima je TNF ključan za regrutovanje leukocita, aktivaciju endotela i pojačavanje glomerularnih citokinskih petlji. Naš nalaz sugerise da i primarni i sekundarni GN, sa svojim brojnim podtipovima, mogu deliti neke slične patogenetske puteve.

U ovom istraživanju nije uočena povezanost između SNP u genu *TNF* i specifičnih karakteristika GN, uključujući težinu bolesti, pojavu remisije i prisustvo komplikacija poput hipertenzije. Ovo može da implicira da, iako *TNF* polimorfizmi mogu biti faktori rizika za nastanak bolesti, oni nisu prediktori njenog kliničkog toka niti ishoda. Verovatno je da je tok bolesti određen kombinacijom različitih genetičkih faktora (ne samo polimorfizmom u genu *TNF*), epigenetičkih, sredinskih i terapijskih faktora. Da bi se ova kombinacija bolje razumela, neophodna su longitudinalna istraživanja u većim i potencijalno homogenijim kohortama obolelih. Naime, iako alel A na poziciji rs1800629 u genu *TNF* jeste povezan sa GN prema našim rezultatima, i dalje postoji kontroverza u vezi sa njegovim efektom na razvoj hronične bubrežne bolesti (CKD). Pojedina istraživanja navode da su čak G/G genotip i G alel bili češći kod pacijenata sa CKD (227). Suprotno tome, jedno istraživanje u kohorti pacijenata iz severne Indije pokazalo je da je GA haplotip na lokusu rs1800629 jak predisponirajući faktor rizika za razvoj završnog stadijuma bubrežne bolesti (ESRD) (228). Meta-analiza, koju je 2005. godine sproveo Sookoian i saradnici, pokazala je da je prisustvo alela A korelisalo sa pojavom gojaznosti, hipertenzije i povišenih nivoa insulina (229). U našoj kohorti, međutim, nismo pronašli statistički značajnu korelaciju između indeksa telesne mase i opisanog SNP. Međutim, moramo uzeti u obzir specifičnost naše kohorte, koja je bila sastavljena samo od pedijatrijskih pacijenata, a znamo da su stečeni metabolički poremećaji ređi kod dece nego kod odraslih te da se mogu ispoljiti kasnije tokom trajanja bolesti. Metabolički efekti ove genetičke varijacije mogli bi biti jasnije uočeni u budućim prospektivnim istraživanjima na adolescentima i mladim odraslim osobama.

Pronalaženje povezanosti između SNP u genu *TNF* i GN može imati i potencijalne terapijske implikacije. Poznato je da je kod pacijenata sa Behčetovim sindromom (BS) učestalost uobičajenog GG genotipa na lokusu rs1800629 veća kod onih pacijenata koji odgovaraju na standardnu terapiju u poređenju sa GA genotipom (230). Ovakav nalaz sugerise da bi možda pacijenti sa GA genotipom, koji su lošiji responderi, mogli imati benefit od primene anti-TNF lekova (230). Dakle, naši rezultati sugerisu da GA alel može biti faktor rizika za razvoj GN kod dece, dok podaci iz literature dodatno ukazuju da GA alel može biti faktor povezan sa lošijim odgovorom na imunoterapiju, što otvara potencijalnu mogućnost lečenja TNF inhibitorima. Ipak, treba biti vrlo oprezan sa TNF terapijom, jer nije poznato da li ovaj ili drugi polimorfizmi mogu nositi rizik od pogoršanja GN ili izazivanja više neželjenih efekata. Istina je da su TNF inhibitori značajno poboljšali lečenje mnogih autoimunih bolesti kao što su Kronova bolest, reumatoidni artritis, psorijaza, psorijatični artritis, ankilozirajući

spondilitis i juvenilni idiopatski artritis (231; 232). Sa druge strane, ovi lekovi su kao neželjeno dejstvo pokazali sposobnost indukcije proizvodnje antinuklearnih antitela, antitela prema dvostrukom lancu DNK (anti-dsDNA) antitela i antifosfolipidnih antitela, između ostalog (233). Nekoliko autoimunskih bolesti povezano je sa izloženošću TNF inhibitorima, uključujući vaskulitis, SLE i psorijazu (234). Postoje i prikazi pacijenata koji su razvili GN tokom lečenja anti-TNF lekovima (235; 236; 237). Dakle, uloga ovih lekova u GN je još uvek neizvesna i verovatno je da može biti korisna u određenim podtipovima GN, verovatno u zavisnosti od prisustva određenih SNP u genu *TNF*. Neophodna su dalja istraživanja, koja bi vodila razvoju terapije kreirane za pojedinačnog pacijenta. Naši rezultati podržavaju ideju da će strategije personalizovane medicine, koje uzimaju u obzir *TNF* genotip, u budućnosti koristiti za identifikaciju pacijenata koji bi imali najviše koristi od anti-TNF terapije, uz istovremeno sprečavanje mogućih neželjenih efekata kod onih koji su genetički predisponirani. Način na koji polimorfizam na lokusu rs1800629, ali i druge srodne varijante u *TNF* genu, utiču na odgovor na primenu TNF inhibitora kod GN mogao bi biti predmet budućih farmakogenomskih istraživanja.

Pored udruženosti polimorfizma A i genotipa GA sa prisustvom GN u dečjoj populaciji, u ovoj studiji identifikovali smo i povezanost između GN i *TNF* haplotipa GGAG (na lokusima rs1800629 i rs361525 redom). Drugim rečima, GGGG haplotip je bio češći kod zdravih kontrola, što je u skladu sa činjenicom da je GG genotip slab proizvođač TNF. Ovo ukazuje na mogući uticaj haplotipa na regulaciju gena *TNF*, verovatno kao rezultat kombinovanog sinergističkog dejstva oba polimorfizma na transkripcionu aktivnost. Naime, poznato je da pojedinačni SNP mogu imati samo blage efekte, dok više regulatornih varijanti sinergistički može predstavljati jaku genetičku predispoziciju. Jedno istraživanje analiziralo je povezanosti polimorfizama na lokusima rs1800629 i rs361525 u genu *TNF* kod pacijenata sa CKD u meksičkoj populaciji. Međutim, istraživači nisu uočili asocijaciju između bilo koje kombinacije haplotipova i CKD (238). Prema našim saznanjima, nijedna druga studija nije istraživala povezanosti ovih haplotipova i CKD. Moguće da je ova povezanost specifična za rasnu pripadnost i starosnu dob pacijenata.

Prema rezultatima dobijenim u ovoj studiji, distribucije ispitivanih alela i genotipova za gene *IL10*, *IL6*, *IL23R* i *IL12B*, kao i distribucije haplotipova za *IL10*, nisu se statistički značajno razlikovale kod pacijenata sa GN i kontrola. Uprkos tome što su ovi geni uključeni u regulaciju imuniteta i povezani su sa brojnim autoimunskim i inflamatornim bolestima, u našem istraživanju nismo pronašli povezanost između ovih gena i GN. Ovo može biti posledica populaciono-specifičnih genetičkih varijacija u kohorti dece iz Srbije, posledica analize na malom uzorku ili mogućnosti da ove varijante doprinose težini ili progresiji bolesti, a ne njenom nastanku. Poznato je, recimo, od ranije da polimorfizmi u genu *IL10* mogu biti povezani sa komplikacijama bubrežnih bolesti kod dece (239). Možda bi longitudinalna prospektivna analiza mogla bolje da obuhvati pacijente sa razvojem hroničnih komplikacija kod različitih formi GN, te da bolje razjasni povezanost polimorfizama u genu *IL10* sa hroničnim komplikacijama GN. Naime, medijana perioda praćenja od trenutka postavljanja dijagnoze do uzorkovanja za potrebe ove studije u našoj kohorti je bila samo 67 meseci.

U ispitivanoj grupi pacijenata sa GN nisu uočene razlike u pogledu frekvencije alela i genotipova u analiziranim strukturnim genima bubrega (*UMOD* i *SHROOM3*) u odnosu na kontrole. Razlog može biti to što smo uključili sve pacijente sa GN, i one kod kojih je bolest napredovala do hroničnog stadijuma ali i akutne pacijente, dok su geni *UMOD* i *SHROOM3*, prema dostupnim podacima iz literature, uglavnom povezani sa CKD (145; 146; 240; 241; 242; 243; 244). Međutim, čak ni naša podanaliza nije pokazala povezanost ovih gena sa lošijom prognozom GN. Glavni razlog može biti mali broj analiziranih pacijenata. Takođe je moguće da ovi geni ispoljavaju svoj patogeni uticaj kasnije tokom bolesti ili kao odgovor na hronično oštećenje, što možda ne može biti registrovano studijama preseka u pedijatrijskim kohortama. Uzorkovanje kasnije tokom bolesti, sprovođenje studija sa longitudinalnim dizajnom ili korišćenje većih skupova podataka stratifikovanih prema stadijumu CKD moglo bi olakšati otkrivanje manjih genetičkih doprinosa od strane gena *UMOD* i *SHROOM3* na nastanak, razvoj i tok GN.

Kao što smo gore već naveli, glavna ograničenja ovog istraživanja jesu relativno mali broj uključenih pacijenata i heterogenost uključenih pacijenata, pre svega u pogledu podtipa GN. Nažalost,

naše istraživanje nije imalo dovoljnu statističku snagu da omogući testiranje distribucija polimorfizama među pacijentima sa različitim tipovima GN. I pored ovog nedostatka, ovo je prva studija sprovedena u Srbiji i okolnim zemljama, koja istražuje genetičku podložnost za nastanak GN kod dece u ovom delu sveta. Naše istraživanje naglašava značaj regionalno prilagođenih genetičkih istraživanja, koja mogu otkriti populaciono-specifične faktore rizika, koji nisu uočljivi u velikim, multinacionalnim grupama pacijenata. Takođe, naše istraživanje postavlja osnovu za buduće zajedničke inicijative za analizu genetičke epidemiologije GN, ali i drugih bubrežnih bolesti, u pedijatrijskoj populaciji u jugoistočnoj Evropi.

U zaključku možemo istaći da je prisustvo alela A na lokusu rs1800629 u genu *TNF* bilo češće kod pacijenata sa GN u poređenju sa zdravim kontrolama. U skladu s tim, genotipovi GA i AA, sa pretpostavljenom većom produkcijom TNF, bili su zastupljeniji među pacijentima. Pored toga, pronašli smo i statistički značajne razlike u distribuciji haplotipova između pacijenata i zdravih kontrola, pri čemu su pacijenti sa GN češće imali GGAG haplotip, dok su zdrave kontrole primarno imale GGGG haplotip. Ipak, zbog malog broja pacijenata sa određenim podvrstama GN, nismo sprovodili zasebne SNP asocijacione analize sa svakim pojedinačnim kliničkim entitetom. Pretpostavljamo da povezanost između polimorfizama u genu *TNF*, ali i nekim drugim genima, kod različitih tipova GN kod dece može doprineti razumevanju patogeneze ovih poremećaja i razvoju novih terapija.

U podgrupi naših pacijenata sprovedena je i analiza sekvenciranja celog egzoma. Ova analiza kod pedijatrijskih pacijenata sa GN može biti od višestrukog značaja. Pre svega, na ovaj način se mogu otkriti nasledne bolesti koje imaju kliničku sliku poput GN i zahtevaju specifično praćenje i lečenje, kao što su aHUS i Alportov sindrom. Pored toga, pronalaženje gena koji predstavljaju predpoziciju za obolevanje od GN može da pomogne da se razume patofiziologija bolesti i da se pacijentima ponude nove terapije.

Dvoje od 10 naših pacijenata sa primarnim GN dobilo je genetičku dijagnozu druge bolesti. Jedna verovatna patogena heterozigotna varijanta (c.3546_3548dup) identifikovana je u genu *COL4A3* kod našeg pacijenta sa dijagnozom IgA nefropatije, koja nije potvrđena histopatološki. Varijante u *COL4A3* su povezane sa autozomno dominantnim Alportovim sindromom tipa 3A (OMIM:104200), autozomno recesivnim Alportovim sindromom tipa 3B (OMIM:620536) i autozomno dominantnom porodičnom benignom hematurijom tip 2 (OMIM:620320). Naš pacijent je vremenom razvio punu kliničku sliku Alportovog sindroma. Varijanta c.3546_3548dup je prethodno opisana u heterozigotnom stanju kod pacijenata sa Alportovim sindromom (174). Ova varijanta je prisutna sa učestalošću od 0,00000205 u gnomAD bazi egzoma, odnosno 0,00000657 u gnomAD bazi genoma i nije pronađena kod naših 50 pedijatrijskih kontrola. Istovremeno prisustvo Alportovog sindroma sa IgA nefropatijom je prijavljeno kod nekoliko pacijenata (245; 246). Alportov sindrom je inače bolest koja se često ne prepoznaje u kliničkoj praksi, pre svega zbog niske učestalosti ove bolesti, posebno u slučajevima bez ekstrarenalnih manifestacija (246). U takvim situacijama genetičke analize pružaju novi uvid u bolest i mogu značajno uticati na izbor terapije (174; 247).

Prilikom WES analize, otkrili smo jednu heterozigotnu stop-loss novootkrivenu varijantu neodređenog značaja (c.1122G>C) u genu *CD46* (*MCP*) kod jednog pacijenta sa dijagnozom antiGBM bolesti. Varijante u genu *CD46* su povezane sa većom sklonošću za nastanak/razvoj atipičnog hemolitičko-uremijskog sindroma (aHUS) (OMIM:612922), koji se može naslediti autozomno dominantno ili recesivno. Genetičke varijante gena *CD46* su ranije bile povezane sa drugim bolestima kao što su SLE, pobačaj, sistemska skleroza, ali i glomerulonefritisi (248; 249; 250; 251). Prethodna studija koja je analizirala 248 pacijenata sa glomerulopatijom koja je dokazana biopsijom bubrega, otkrila je da je 6 pacijenata zapravo imalo aHUS (252). Međutim, prema našim saznanjima, izveštaji o povezanosti varijanti *CD46* i anti-GBM bolesti još uvek nisu opisani. Opisana varijanta je odsutna u gnomAD bazi, kao i našoj kohorti od 50 kontrola. Varijante u ovom genu kod aHUS su pretežno u heterozigotnom stanju, međutim retko se opisuju i homozigotne varijante, koje su povezane sa ranijim početkom i težim simptomima bolesti (253). Jedna studija je otkrila da oko 10% (11 pacijenata od 120) pacijenata sa aHUS ima varijante u genu *CD46*, od kojih su njih pet bile

u heterozigotnom stanju i rezultirale su smanjenim nivoima MCP. Štaviše, kod ovih pacijenata je primećena nepotpuna penetrantnost, što sugerise da je MCP pre predisponirajući faktor nego direktan uzrok bolesti (254; 255).

Heterozigotna patogena varijanta (c.841_849+19del) je otkrivena u genu *C2* kod tri pacijenta u našoj kohorti (dva sa LN i jednog sa SLE bez GN) kao i kod jednog od naših 50 pacijenata iz kontrolne grupe. Varijante u genu *C2* su povezane sa autozomno recesivnim nedostatkom *C2* komponente komplementa (OMIM:217000) (175; 176; 177; 178). Ova varijanta je pronađena sa frekvencijom od 0,0046 u gnomAD bazi egzoma i sa učestalošću homozigota od 0,000008. U gnomAD bazi genoma ova varijanta je pronađena sa frekvencijom od 0,00608, dok je 0,000032 bila učestalost homozigota. Veća učestalost je uočena u našoj grupi kontrola gde je varijanta otkrivena kod 2% pacijenata. Ovi podaci ukazuju na to da je varijanta verovatno povezana sa SLE, ali očigledno ispoljava smanjenu penetrantnost. U literaturi su opisana dva pacijenta sa varijantom c.841_849+19del u heterozigotnom stanju. Jedno je devojčica sa SLE i nefritisom, koji je nastao 2 godine od početka bolesti i kojoj je učinjena transplantacija bubrega, a drugi je dečak sa aktivnim artritisom (256). Takođe, kod pacijenta čiji su simptomi počeli u dvadesetim godinama života, opisana je heterozigotna varijanta c.841_849+19del udružena sa imunodeficijencijom specifičnom za patogen (175).

Jedan od četiri naša pacijenta sa SLE bez GN je imao homozigotnu patogenu varijantu neodređenog značaja (c.622C>T) u genu *CIQA*. Varijante u genu *CIQA* su povezane sa autozomno recesivnim nedostatkom *C1q* komponente komplementa tipa 1 (OMIM:613652). Varijanta opisana kod naših pacijenata pronađena je sa frekvencijom od 0,0000253 u gnomAD bazi egzoma sa učestalošću homozigota od 0,000000685 i nije pronađena u gnomAD bazi genoma. Navedena varijanta je prethodno opisana kod pedijatrijskih pacijenata sa SLE (179; 180; 181; 182). Ova varijanta stvara rani stop kodon, koji verovatno remeti pravilno formiranje celog kompleksa *C1q* komponente komplementa, što je potvrđeno niskim nivoom *C1qA* proteina u serumu kod pacijenata sa SLE koji imaju c.622C>T varijantu u homozigotnom stanju (180).

U zaključku možemo da rezimiramo da smo analizirajući 31 sporadičnog pacijenta sa GN pomoću WES, detektovali jednog pacijenta sa Alportovim sindromom koji je prethodno vođen pod dijagnozom primarnog GN. Kod drugog pacijenta sa primarnim GN smo uočili varijantu neodređenog značaja u genu *CD46*, koji je povezan sa atipičnim hemolitičko-uremijskim sindromom. Heterozigotna patogena varijanta c.841_849+19del je nađena u genu *C2* kod dva pacijenta sa GN u sklopu SLE. Pomoću WES analize, dakle, registrovali smo nasledne bolesti koje su imale prezentaciju sličnu imunski posredovanim primarnim GN. Precizna identifikacija oboljenja može značajno uticati na dalju terapiju i prognozu bolesti, kao i na adekvatno savetovanje u porodici obolelog. Pored toga, detekcija varijante u genu podložnosti za nastanak sekundarnog GN u sklopu SLE može nam pomoći da razumemo patofiziologiju ove bolesti i da potencijalno pacijentima ponudimo nove terapije.

6. ZAKLJUČCI

1. Zastupljenost polimorfizama na lokusima rs361525 i rs1800629 u genu *TNFA* je bila različita kod dece sa glomerulonefritisom u odnosu na zdrave kontrole. Alel A na lokusu rs1800629 je bio češće zastupljen kod pacijenata, kao i genotipovi AA i GA. Prema dostupnim podacima, ovi genotipovi su povezani sa većom produkcijom faktora nekroze tumora (TNF) alfa. Deca sa glomerulonefritisom češće su imala haplotip GG/AG u genu *TNF*, dok su zdrava deca češće imala genotip GG/GG. Ovo saznanje može doprineti razumevanju patogeneze glomerulonefritisa kod dece i potencijalno omogućiti razvoj novih terapija.

Nismo uočili razlike između dece sa glomerulonefritisom i zdravih kontrola u distribuciji polimorfizama u genima *UMOD* i *SHROOM3*, koji kodiraju strukturne proteine bubrega, niti u drugim ispitivanim genima imunskog sistema, uključujući gene *IL10*, *IL6*, *IL12B* i *IL23R*.

2. Nije primećena povezanost između ispitivanih genskih polimorfizama i kliničkih karakteristika pacijenata, uključujući godine na početku bolesti, tip glomerulonefritisa (primarni ili sekundarni), težinu bolesti, pojavu remisije i prisustvo hipertenzije, kao jedne od najčešćih komplikacija hronične bubrežne bolesti.
3. Sekvenciranje celog egzoma je sprovedeno kod 10 pacijenata sa primarnim glomerulonefritisom i kod dva pacijenta je nađena varijanta koja se može povezati sa bolešću (Alportovim sindromom i atipičnim hemolitičko-uremijskim sindromom). Precizna identifikacija bubrežnog oboljenja može značajno uticati na dalju terapiju i prognozu bolesti, kao i na adekvatno genetičko savetovanje u porodici obolelog.

Kod dva od 14 pacijenata sa sistemskim eritematoznim lupusom i glomerulonefritisom otkrivena je heterozigotna patogena varijanta (c.841_849 + 19del) u genu *C2*. Detekcija varijante u genu podložnosti za nastanak sekundarnog glomerulonefritisa može nam pomoći da razumemo patofiziologiju ove bolesti i da pacijentima potencijalno ponudimo nove, ciljane terapije.

7. LITERATURA

1. Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N, Emma F, Goldstein SL. Glomerular disease in: *Pediatric Nephrology*. Springer, Heidelberg, 2016.
2. Floege J, Amann K. Primary glomerulonephritides. *Lancet* 2016;387:2036-48.
3. McGrogan A, Franssen CF, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. *Nephrol Dial Transplant*. 2011;26(2):414-30.
4. Bello AK, Okpechi IG, Levin A, Ye F, Damster S, Arruebo S, et al, ISN-GKHA Group. An update on the global disparities in kidney disease burden and care across world countries and regions. *Lancet Glob Health* 2024;12:e382-95.
5. Masalskienė J, Rudaitis Š, Vitkevič R, Čerkauskienė R, Dobilienė D, Jankauskienė A. Epidemiology of Chronic Kidney Disease in Children: A Report from Lithuania. *Medicina (Kaunas)*. 2021;57(2):112.
6. Johnson RJ, Hurtado A, Merszei J, Rodriguez-Iturbe B, Feng L. Hypothesis: dysregulation of immunologic balance resulting from hygiene and socioeconomic factors may influence the epidemiology and cause of glomerulonephritis worldwide. *Am J Kidney Dis*. 2003;42(3):575-81.
7. Wu MY, Chen YC, Chiu IJ, Wu MS. Genetic insight into primary glomerulonephritis. *Nephrology (Carlton)*. 2022;27(8):649-657.
8. Rovin BH, Adler SG, Barratt J, Bridoux F, Burdge KA, Chan TM, et al. Executive summary of the KDIGO 2021 Guideline for the Management of Glomerular Diseases. *Kidney Int*. 2021;100(4):753-779.
9. van den Brand JA, Hofstra JM, Wetzels JF. Low-molecular-weight proteins as prognostic markers in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(12):2846-53.
10. Nicholson ML, Wheatley TJ, Doughman TM, White SA, Morgan JD, Veitch PS, et al. A prospective randomized trial of three different sizes of core-cutting needle for renal transplant biopsy. *Kidney Int*. 2000;58(1):390-5.
11. Whittier WL, Korbet SM. Timing of complications in percutaneous renal biopsy. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15(1):142-7.
12. Hergesell O, Felten H, Andrassy K, Kühn K, Ritz E. Safety of ultrasound-guided percutaneous renal biopsy-retrospective analysis of 1090 consecutive cases. *Nephrol Dial Transplant*. 1998;13(4):975-7.
13. Floege J. Primary glomerulonephritis: A review of important recent discoveries. *Kidney Res Clin Pract*. 2013;32:103-10.
14. Kiryluk K, Li Y, Sanna-Cherchi S, Rohanizadegan M, Suzuki H, Eitner F, et al. Geographic differences in genetic susceptibility to IgA nephropathy: GWAS replication study and geospatial risk analysis. *PLoS Genet*. 2012;8(6):e1002765.
15. Magistroni R, D'Agati VD, Appel GB, Kiryluk K. New developments in the genetics, pathogenesis, and therapy of IgA nephropathy. *Kidney Int*. 2015;88(5):974-89.
16. Floege J. The pathogenesis of IgA nephropathy: what is new and how does it change therapeutic approaches? *Am J Kidney Dis*. 2011;58(6):992-1004.
17. Suzuki H, Fan R, Zhang Z, Brown R, Hall S, Julian BA, et al. Aberrantly glycosylated IgA1 in IgA nephropathy patients is recognized by IgG antibodies with restricted heterogeneity. *J Clin Invest*. 2009;119(6):1668-77.
18. Berthouix F, Suzuki H, Thibaudin L, Yanagawa H, Maillard N, Mariat C, et al. Autoantibodies targeting galactose-deficient IgA1 associate with progression of IgA nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(9):1579-87.
19. Gutiérrez E, Zamora I, Ballarín JA, Arce Y, Jiménez S, Quereda C, et al. Long-term outcomes of IgA nephropathy presenting with minimal or no proteinuria. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(10):1753-60.
20. Nakagawa N, Kabara M, Matsuki M, Chinda J, Fujino T, Hirayama T, et al. Retrospective comparison of the efficacy of tonsillectomy with and without steroid-pulse therapy in IgA nephropathy patients. *Intern Med*. 2012;51(11):1323-8.

21. Nishi H, Sugimoto K, Fujita S, Miyazaki K, Miyazawa T, Sakata N, et al. Effect and therapeutic mechanisms of tonsillectomy for childhood IgA nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2012;17(7):658-64.
22. Maeda I, Hayashi T, Sato KK, Shibata MO, Hamada M, Kishida M, et al. Tonsillectomy has beneficial effects on remission and progression of IgA nephropathy independent of steroid therapy. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(7):2806-13.
23. Ponticelli C. What is the role of rituximab in idiopathic membranous nephropathy? *Expert Rev Clin Immunol*. 2013;9(1):13-6.
24. Ohsawa I, Kusaba G, Ishii M, Sato N, Inoshita H, Onda K, et al. Extraglomerular C3 deposition and metabolic impacts in patients with IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(7):1856-64.
25. Jiyun Y, Guisen L, Li Z, Yi S, Jicheng L, Fang L, et al. The genetic variants at the HLA-DRB1 gene are associated with primary IgA nephropathy in Han Chinese. *BMC Med Genet*. 2012;13:33.
26. Yang C, Jie W, Yanlong Y, Xuefeng G, Aihua T, Yong G, et al. Genome-wide association study identifies TNFSF13 as a susceptibility gene for IgA in a South Chinese population in smokers. *Immunogenetics*. 2012;64(10):747-53.
27. Ding X, Mei Y, Mao Z, Long L, Han Q, You Y, et al. Association of Immune and Inflammatory Gene Polymorphism With the Risk of IgA Nephropathy: A Systematic Review and Meta-Analysis of 45 Studies. *Front Immunol*. 2021;12:683913.
28. Yeo SC, Liu X, Liew A. Complement factor H gene polymorphism rs6677604 and the risk, severity and progression of IgA nephropathy: A systematic review and meta-analysis. *Nephrology (Carlton)*. 2018;23(12):1096-1106.
29. Ju T, Cummings RD. A unique molecular chaperone Cosmc required for activity of the mammalian core 1 beta 3-galactosyltransferase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(26):16613-8.
30. Kiryluk K, Li Y, Scolari F, Sanna-Cherchi S, Choi M, Verbitsky M, et al. Discovery of new risk loci for IgA nephropathy implicates genes involved in immunity against intestinal pathogens. *Nat Genet*. 2014;46(11):1187-96.
31. Ma X, Li F, Zhang Q, Wang X, Guo H, Xie J, et al. Genetic architecture to cause dynamic change in tiller and panicle numbers revealed by genome-wide association study and transcriptome profile in rice. *Plant J*. 2020;104(6):1603-1616.
32. Huang SU, Kulatunge O, O'Sullivan KM. Deciphering the Genetic Code of Autoimmune Kidney Diseases. *Genes (Basel)*. 2023;14(5):1028.
33. Liu D, Zhang J, Shi Y, Liu Z. Gene polymorphism and risk of idiopathic membranous nephropathy. *Life Sci*. 2019;229:124-131.
34. Beck LH Jr, Bonegio RG, Lambeau G, Beck DM, Powell DW, Cummins TD, et al. M-type phospholipase A2 receptor as target antigen in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2009;361(1):11-21.
35. Debiec H, Hanoy M, Francois A, Guerrot D, Ferlicot S, Johanet C, et al. Recurrent membranous nephropathy in an allograft caused by IgG3κ targeting the PLA2 receptor. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(12):1949-54.
36. Glasscock RJ. The pathogenesis of membranous nephropathy: evolution and revolution. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(3):235-42.
37. Hofstra JM, Debiec H, Short CD, Pellé T, Kleta R, Mathieson PW, et al. Antiphospholipase A2 receptor antibody titer and subclass in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(10):1735-43.
38. Kanigicherla D, Gummadova J, McKenzie EA, Roberts SA, Harris S, Nikam M, et al. Anti-PLA2R antibodies measured by ELISA predict long-term outcome in a prevalent population of patients with idiopathic membranous nephropathy. *Kidney Int*. 2013;83(5):940-8.
39. Hoxha E, Thiele I, Zahner G, Panzer U, Harendza S, Stahl RA. Phospholipase A2 receptor autoantibodies and clinical outcome in patients with primary membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(6):1357-66.

40. Ruggenenti P, Debiec H, Ruggiero B, Chianca A, Pellé T, Gaspari F, et al. Anti-Phospholipase A2 Receptor Antibody Titer Predicts Post-Rituximab Outcome of Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26(10):2545-58.
41. Hofstra JM, Beck LH Jr, Beck DM, Wetzels JF, Salant DJ. Anti-phospholipase A₂ receptor antibodies correlate with clinical status in idiopathic membranous nephropathy. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(6):1286-91.
42. Fan S, Wang Q, Wang AY, Zhang P, Zhong X, Chen S, et al. The association between variants in PLA2R and HLA-DQA1 and renal outcomes in patients with primary membranous nephropathy in Western China. *BMC Med Genomics*. 2021;14(1):123.
43. Beck LH Jr, Fervenza FC, Beck DM, Bonegio RG, Malik FA, Erickson SB, et al. Rituximab-induced depletion of anti-PLA2R autoantibodies predicts response in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2011;22(8):1543-50.
44. Tomas NM, Beck LH Jr, Meyer-Schwesinger C, Seitz-Polski B, Ma H, Zahner G, et al. Thrombospondin type-1 domain-containing 7A in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2014;371(24):2277-2287.
45. Huang G, Liu F, Yu L, Wang J, Chen J, Mao J. Pediatric membranous nephropathy: In the novel antigens era. *Front Immunol* 2022;13:962502.
46. Polanco N, Gutiérrez E, Covarsí A, Ariza F, Carreño A, Vigil A, et al. Spontaneous remission of nephrotic syndrome in idiopathic membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(4):697-704.
47. KDIGO. KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis. *Kidney Int* 2012; 2 (suppl 2): 139–274.
48. Hoxha E, Harendza S, Pinnschmidt HO, Tomas NM, Helmchen U, Panzer U, et al. Spontaneous remission of proteinuria is a frequent event in phospholipase A₂ receptor antibody-negative patients with membranous nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(11):1862-9.
49. Bobart SA, De Vriese AS, Pawar AS, Zand L, Sethi S, Giesen C, et al. Noninvasive diagnosis of primary membranous nephropathy using phospholipase A₂ receptor antibodies. *Kidney Int*. 2019;95(2):429-438.
50. Stanescu HC, Arcos-Burgos M, Medlar A, Bockenhauer D, Kottgen A, Dragomirescu L, et al. Risk HLA-DQA1 and PLA(2)R1 alleles in idiopathic membranous nephropathy. *N Engl J Med*. 2011;364(7):616-26.
51. Yoshikawa M, Asaba K. Single-nucleotide polymorphism rs4664308 in PLA2R1 gene is associated with the risk of idiopathic membranous nephropathy: a meta-analysis. *Sci Rep*. 2020;10(1):13119.
52. Sekula P, Li Y, Stanescu HC, Wuttke M, Ekici AB, Bockenhauer D, et al. Genetic risk variants for membranous nephropathy: extension of and association with other chronic kidney disease aetiologies. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32(2):325-332.
53. Cui Z, Xie LJ, Chen FJ, Pei ZY, Zhang LJ, Qu Z, et al. MHC Class II Risk Alleles and Amino Acid Residues in Idiopathic Membranous Nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(5):1651-1664.
54. Xie J, Liu L, Mladkova N, Li Y, Ren H, Wang W, et al. The genetic architecture of membranous nephropathy and its potential to improve non-invasive diagnosis. *Nat Commun*. 2020;11(1):1600.
55. Giacomelli M, Kumar R, Tampella G, Ceffa S, Bontempelli M, et al. IL-4, IL-10 and TNF- α polymorphisms in idiopathic membranous nephropathy (IMN). *Open J. Immunol*. 2015; 233.
56. Ho I.C, Miaw S.C. Regulation of IL-4 expression in immunity and diseases[M]//, Regulation of Cytokine Gene Expression in Immunity and Diseases. Springer Dordrecht. 2016; pp. 31–77
57. Vivarelli M, Massella L, Ruggiero B, Emma F. Minimal Change Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017;12(2):332-345.
58. Durand A, Winkler CA, Vince N, Douillard V, Geffard E, Binns-Roemer E, et al. Identification of Novel Genetic Risk Factors for Focal Segmental Glomerulosclerosis in Children: Results From the Chronic Kidney Disease in Children (CKiD) Cohort. *Am J Kidney Dis*. 2023;81(6):635-646.e1.

59. Herlitz LC, Markowitz GS, Farris AB, Schwimmer JA, Stokes MB, Kunis C, et al. Development of focal segmental glomerulosclerosis after anabolic steroid abuse. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(1):163-72.
60. Motoyama O, Sugawara H, Hatano M, Fujisawa T, Iitaka K. Steroid-sensitive nephrotic syndrome in two families. *Clin Exp Nephrol.* 2009;13(2):170-173.
61. Hinkes BG, Mucha B, Vlangos CN, Gbadegesin R, Liu J, Hasselbacher K, et al. Nephrotic syndrome in the first year of life: two thirds of cases are caused by mutations in 4 genes (NPHS1, NPHS2, WT1, and LAMB2). *Pediatrics.* 2007;119(4):e907-19.
62. Philippe A, Nevo F, Esquivel EL, Reklaityte D, Gribouval O, Tête MJ, et al. Nephrin mutations can cause childhood-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(10):1871-8.
63. Gbadegesin R, Hinkes BG, Hoskins BE, Vlangos CN, Heeringa SF, Liu J, et al. Mutations in PLCE1 are a major cause of isolated diffuse mesangial sclerosis (IDMS). *Nephrol Dial Transplant.* 2008;23(4):1291-7.
64. Hinkes B, Vlangos C, Heeringa S, Mucha B, Gbadegesin R, Liu J, et al. Specific podocin mutations correlate with age of onset in steroid-resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(2):365-71.
65. Gast C, Pengelly RJ, Lyon M, Bunyan DJ, Seaby EG, Graham N, et al. Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 2016;31(6):961-70.
66. Yao T, Udwan K, John R, Rana A, Haghighi A, Xu L, et al. Integration of Genetic Testing and Pathology for the Diagnosis of Adults with FSGS. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2019;14(2):213-223.
67. De Vriese AS, Sethi S, Nath KA, Glassock RJ, Fervenza FC. Differentiating Primary, Genetic, and Secondary FSGS in Adults: A Clinicopathologic Approach. *J Am Soc Nephrol.* 2018;29(3):759-774.
68. Lepori N, Zand L, Sethi S, Fernandez-Juarez G, Fervenza FC. Clinical and pathological phenotype of genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis in adults. *Clin Kidney J.* 2018;11(2):179-190.
69. Tory K, Menyhárd DK, Woerner S, Nevo F, Gribouval O, Kerti A, et al. Mutation-dependent recessive inheritance of NPHS2-associated steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 2014;46(3):299-304.
70. Shankland SJ, Smeets B, Pippin JW, Moeller MJ. The emergence of the glomerular parietal epithelial cell. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10(3):158-73.
71. Hakrrouch S, Cebulla A, Schaldecker T, Behr D, Mundel P, Weins A. Extensive podocyte loss triggers a rapid parietal epithelial cell response. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):927-38.
72. van de Lest NA, Zandbergen M, Ijpelaar DHT, Wolterbeek R, Bruijn JA, Bajema IM, et al. Nephrin Loss Can Be Used to Predict Remission and Long-term Renal Outcome in Patients With Minimal Change Disease. *Kidney Int Rep.* 2017;3(1):168-177.
73. Bertelli R, Bonanni A, Caridi G, Canepa A, Ghiggeri GM. Molecular and Cellular Mechanisms for Proteinuria in Minimal Change Disease. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:170.
74. Genovese G, Friedman DJ, Ross MD, Lecordier L, Uzureau P, Freedman BI, et al. Association of trypanolytic ApoL1 variants with kidney disease in African Americans. *Science.* 2010;329(5993):841-5.
75. Tzur S, Rosset S, Shemer R, Yudkovsky G, Selig S, Tarekegn A, et al. Missense mutations in the APOL1 gene are highly associated with end stage kidney disease risk previously attributed to the MYH9 gene. *Hum Genet.* 2010;128(3):345-50.
76. Parsa A, Kao WH, Xie D, Astor BC, Li M, Hsu CY, et al. APOL1 risk variants, race, and progression of chronic kidney disease. *N Engl J Med.* 2013;369(23):2183-96.
77. Kopp JB, Winkler CA, Zhao X, Radeva MK, Gassman JJ, D'Agati VD, et al. Clinical Features and Histology of Apolipoprotein L1-Associated Nephropathy in the FSGS Clinical Trial. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(6):1443-8.

78. Freedman BI, Kopp JB, Langefeld CD, Genovese G, Friedman DJ, Nelson GW, et al. The apolipoprotein L1 (APOL1) gene and nondiabetic nephropathy in African Americans. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(9):1422-6.
79. Beckerman P, Bi-Karchin J, Park AS, Qiu C, Dummer PD, Soomro I, et al. Transgenic expression of human APOL1 risk variants in podocytes induces kidney disease in mice. *Nat Med.* 2017;23(4):429-438.
80. Kopp JB, Nelson GW, Sampath K, Johnson RC, Genovese G, An P, et al. APOL1 genetic variants in focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(11):2129-37.
81. Kasembeli AN, Duarte R, Ramsay M, Mosiane P, Dickens C, Dix-Peek T, et al. APOL1 Risk Variants Are Strongly Associated with HIV-Associated Nephropathy in Black South Africans. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(11):2882-90.
82. Larsen CP, Beggs ML, Saeed M, Walker PD. Apolipoprotein L1 risk variants associate with systemic lupus erythematosus-associated collapsing glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(5):722-5.
83. Freedman BI, Langefeld CD, Andringa KK, Croker JA, Williams AH, Garner NE, et al. End-stage renal disease in African Americans with lupus nephritis is associated with APOL1. *Arthritis Rheumatol.* 2014;66(2):390-6.
84. Wuttke M, Kottgen A. Insights into kidney diseases from genome-wide association studies. *Nat Rev Nephrol* 2016;12(9):549-62.
85. Sethi S, Zand L, Leung N, Smith RJ, Jevremonic D, Herrmann SS, et al. Membranoproliferative glomerulonephritis secondary to monoclonal gammopathy. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2010;5(5):770-82.
86. Sethi S, Fervenza FC. Membranoproliferative glomerulonephritis: pathogenetic heterogeneity and proposal for a new classification. *Semin Nephrol.* 2011;31(4):341-8.
87. Gale DP, de Jorge EG, Cook HT, Martinez-Barricarte R, Hadjisavvas A, McLean AG, et al. Identification of a mutation in complement factor H-related protein 5 in patients of Cypriot origin with glomerulonephritis. *Lancet.* 2010;376(9743):794-801.
88. Sethi S, Fervenza FC, Zhang Y, Nasr SH, Leung N, Vrana J, et al. Proliferative glomerulonephritis secondary to dysfunction of the alternative pathway of complement. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(5):1009-17.
89. Sethi S, Nester CM, Smith RJ. Membranoproliferative glomerulonephritis and C3 glomerulopathy: resolving the confusion. *Kidney Int.* 2012;81(5):434-41.
90. Zhang Y, Meyer NC, Wang K, Nishimura C, Frees K, Jones M, et al. Causes of alternative pathway dysregulation in dense deposit disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2012;7(2):265-74.
91. Medjeral-Thomas NR, O'Shaughnessy MM, O'Regan JA, Traynor C, Flanagan M, Wong L, et al. C3 glomerulopathy: clinicopathologic features and predictors of outcome. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2014;9(1):46-53.
92. Bu F, Borsa NG, Jones MB, Takanami E, Nishimura C, Hauer JJ, et al. High-Throughput Genetic Testing for Thrombotic Microangiopathies and C3 Glomerulopathies. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(4):1245-53.
93. Caravaca-Fontán F, Lucientes L, Caverio T, Praga M. Update on C3 Glomerulopathy: A Complement-Mediated Disease. *Nephron.* 2020;144(6):272-280.
94. Osborne AJ, Breno M, Borsa NG, Bu F, Frémeaux-Bacchi V, Gale DP, et al. Statistical Validation of Rare Complement Variants Provides Insights into the Molecular Basis of Atypical Hemolytic Uremic Syndrome and C3 Glomerulopathy. *J Immunol.* 2018;200(7):2464-2478.
95. Levine AP, Chan MMY, Sadeghi-Alavijeh O, Wong EKS, Cook HT, Ashford S, et al. Large-Scale Whole-Genome Sequencing Reveals the Genetic Architecture of Primary Membranoproliferative GN and C3 Glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol.* 2020;31(2):365-373.
96. Smith RJH, Appel GB, Blom AM, Cook HT, D'Agati VD, Fakhouri F, et al. C3 glomerulopathy - understanding a rare complement-driven renal disease. *Nat Rev Nephrol.* 2019;15(3):129-143.

97. Zand L, Lorenz EC, Cosio FG, Fervenza FC, Nasr SH, Gandhi MJ, et al. Clinical findings, pathology, and outcomes of C3GN after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25(5):1110-7.
98. Barry A, McNulty MT, Jia X, Gupta Y, Debiec H, Luo Y, et al. Multi-population genome-wide association study implicates immune and non-immune factors in pediatric steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Nat Commun.* 2023;14(1):2481.
99. Noone DG, Iijima K, Parekh R. Idiopathic nephrotic syndrome in children. *Lancet.* 2018;392(10141):61-74.
100. North American Pediatric Renal Transplant Cooperative Study (NAPRTCS) (2005) Annual report 2005. NAPRTCS Administrative Office; 2005. https://www.naprtcs.org/system/files/2008_Annual_CKD_Report.pdf
101. Jia X, Yamamura T, Gbadegesin R, McNulty MT, Song K, Nagano C, et al. Common risk variants in NPHS1 and TNFSF15 are associated with childhood steroid-sensitive nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 2020;98(5):1308-1322.
102. Pedchenko V, Bondar O, Fogo AB, Vanacore R, Voziyan P, Kitching AR, et al. Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis. *N Engl J Med.* 2010;363(4):343-54.
103. Zhao J, Cui Z, Yang R, Jia XY, Zhang Y, Zhao MH. Anti-glomerular basement membrane autoantibodies against different target antigens are associated with disease severity. *Kidney Int.* 2009;76(10):1108-15.
104. Ohlsson S, Herlitz H, Lundberg S, Selga D, Mölne J, Wieslander J, et al. Circulating anti-glomerular basement membrane antibodies with predominance of subclass IgG4 and false-negative immunoassay test results in anti-glomerular basement membrane disease. *Am J Kidney Dis.* 2014;63(2):289-93.
105. Vizjak A, Ferluga D, Rozic M, Hvala A, Lindic J, Levart TK, et al. Pathology, clinical presentations, and outcomes of C1q nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2008;19(11):2237-44.
106. Nasr SH, Valeri AM, Cornell LD, Fidler ME, Sethi S, Leung N, et al. Fibrillary glomerulonephritis: a report of 66 cases from a single institution. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(4):775-84.
107. Javaugue V, Karras A, Glowacki F, McGregor B, Lacombe C, Goujon JM, et al. Long-term kidney disease outcomes in fibrillary glomerulonephritis: a case series of 27 patients. *Am J Kidney Dis.* 2013;62(4):679-90.
108. Almaani S, Meara A, Rovin BH. Update on Lupus Nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12(5):825-835.
109. Parikh SV, Rovin BH. Current and Emerging Therapies for Lupus Nephritis. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(10):2929-2939.
110. Rullo OJ, Tsao BP. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis.* 2013;72 Suppl 2(0 2):ii56-61.
111. Parums DV. A Review of IgA Vasculitis (Henoch-Schönlein Purpura) Past, Present, and Future. *Med Sci Monit.* 2024;30:e943912.
112. Oni L, Sampath S. Childhood IgA Vasculitis (Henoch Schonlein Purpura)-Advances and Knowledge Gaps. *Front Pediatr.* 2019;7:257.
113. Trapani S, Micheli A, Grisolia F, Resti M, Chiappini E, Falcini F, et al. Henoch Schonlein purpura in childhood: epidemiological and clinical analysis of 150 cases over a 5-year period and review of literature. *Semin Arthritis Rheum.* 2005;35(3):143-53.
114. Gardner-Medwin JM, Dolezalova P, Cummins C, Southwood TR. Incidence of Henoch-Schönlein purpura, Kawasaki disease, and rare vasculitides in children of different ethnic origins. *Lancet.* 2002;360(9341):1197-202.
115. Leung AKC, Barankin B, Leong KF. Henoch-Schönlein Purpura in Children: An Updated Review. *Curr Pediatr Rev.* 2020;16(4):265-276.
116. Davin JC, Ten Berge IJ, Weening JJ. What is the difference between IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis? *Kidney Int.* 2001;59(3):823-34.

117. Jennette JC, Falk RJ. Small-vessel vasculitis. *N Engl J Med*. 1997;337(21):1512-23.
118. Sestan M, Jelusic M. Diagnostic and Management Strategies of IgA Vasculitis Nephritis/Henoch-Schönlein Purpura Nephritis in Pediatric Patients: Current Perspectives. *Pediatric Health Med Ther*. 2023;14:89-98.
119. Ishizu A, Kawakami T, Kanno H, Takahashi K, Miyazaki T, Ikeda E, et al. Expert perspectives on pathological findings in vasculitis. *Mod Rheumatol*. 2023;33(1):1-11.
120. López-Mejías R, Genre F, Pérez BS, Castañeda S, Ortego-Centeno N, Llorca J, et al. Association of HLA-B*41:02 with Henoch-Schönlein Purpura (IgA Vasculitis) in Spanish individuals irrespective of the HLA-DRB1 status. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):102.
121. Jiang J, Duan W, Shang X, Wang H, Gao Y, Tian P, et al. Inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms are associated with a risk of nephritis in Henoch-Schönlein purpura children. *Eur J Pediatr*. 2017;176(8):1035-1045.
122. Koskela M, Nihtilä J, Ylinen E, Kolho KL, Nuutinen M, Ritari J, Jahnukainen T. HLA-DQ and HLA-DRB1 alleles associated with Henoch-Schönlein purpura nephritis in Finnish pediatric population: a genome-wide association study. *Pediatr Nephrol*. 2021;36(8):2311-2318.
123. He X, Yu C, Zhao P, Ding Y, Liang X, Zhao Y, et al. The genetics of Henoch-Schönlein purpura: a systematic review and meta-analysis. *Rheumatol Int*. 2013;33(6):1387-95.
124. López-Mejías R, Carmona FD, Castañeda S, Genre F, Remuzgo-Martínez S, Sevilla-Perez B, et al. A genome-wide association study suggests the HLA Class II region as the major susceptibility locus for IgA vasculitis. *Sci Rep*. 2017;7(1):5088.
125. Zhang X, Wu L, Chai M, Huang X, Zhu J, Li S, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism and susceptibility to Henoch-Schönlein purpura: a meta-analysis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. 2019;20(1):1470320319836302.
126. International Society of Nephrology. KDIGO Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. 2013; Suppl. 3, 1–150.
127. Eckardt KU, Coresh J, Devuyst O, Johnson RJ, Köttgen A, Levey AS, et al. Evolving importance of kidney disease: from subspecialty to global health burden. *Lancet*. 2013;382(9887):158-69.
128. Matsushita K, Coresh J, Sang Y, Chalmers J, Fox C, Guallar E, et al. Estimated glomerular filtration rate and albuminuria for prediction of cardiovascular outcomes: a collaborative meta-analysis of individual participant data. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(7):514-25.
129. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, et al. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet*. 2013;382(9889):339-52.
130. GBD 2016 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet*. 2017;390(10100):1151-1210. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32152-9. Erratum in: *Lancet*. 2017;390(10106):e38.
131. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, Li Z, Naicker S, Plattner B, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet*. 2013;382(9888):260-72.
132. Hannan M, Ansari S, Meza N, Anderson AH, Srivastava A, Waikar S, et al. Risk Factors for CKD Progression: Overview of Findings from the CRIC Study. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2021;16(4):648-659.
133. Gupta J, Kanetsky PA, Wuttke M, Kottgen A, Schaefer F, Wong CS. Genome-Wide Association Studies in Pediatric Chronic Kidney Disease. *Pediatr Nephrol*. 2016;31(8):1241-52.
134. Piras D, Zoledziwska M, Cucca F, Pani A. Genome-Wide Analysis Studies and Chronic Kidney Disease. *Kidney Dis*. 2017;3:106-10.
135. Ainsworth HC, Langeveld CD, Freedman BI. Genetic epidemiology in kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32:159-69.
136. Harshman LA, Zepeda-Orozco D. Genetic Considerations in Pediatric Chronic Kidney Disease. *J Pediatr Genet*. 2016;5:43-50.

137. Benetti E, Caridi G, Vella MD, Rampoldi L, Ghiggeri GM, Artifoni L, et al. Immature renal structures associated with a novel UMOD sequence variant. *Am J Kidney Dis.* 2009;53(2):327-31.
138. Hart TC, Gorry MC, Hart PS, Woodard AS, Shihabi Z, Sandhu J, et al. Mutations of the UMOD gene are responsible for medullary cystic kidney disease 2 and familial juvenile hyperuricaemic nephropathy. *J Med Genet.* 2002;39(12):882-92.
139. Vylet'al P, Kublová M, Kalbáčová M, Hodanová K, Baresová V, Stibůrková B, et al. Alterations of uromodulin biology: a common denominator of the genetically heterogeneous FJHN/MCKD syndrome. *Kidney Int.* 2006;70(6):1155-69.
140. Rampoldi L, Caridi G, Santon D, Boaretto F, Bernascone I, Lamorte G, et al. Allelism of MCKD, FJHN and GCKD caused by impairment of uromodulin export dynamics. *Hum Mol Genet.* 2003;12(24):3369-84.
141. Bachmann S, Mutig K, Bates J, Welker P, Geist B, Gross V, et al. Renal effects of Tamm-Horsfall protein (uromodulin) deficiency in mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;288(3):F559-67.
142. Żywiec J, Kiliś-Pstrusińska K, Tomaszewski M, Grzeszczak W. Analysis of the association between rs12917707 and rs11864909 single nucleotide polymorphisms in the region of the uromodulin gene and chronic kidney disease - a family-based study. *Ann Agric Environ Med.* 2017;24(3):464-66.
143. Liu CT, Garnaas MK, Tin A, Kottgen A, Franceschini N, Peralta CA, et al. Genetic association for renal traits among participants of African ancestry reveals new loci for renal function. *PLoS Genet.* 2011;7(9):e1002264.
144. Kottgen A, Glazer NL, Dehghan A, Hwang SJ, Katz R, Li M, et al. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet.* 2009;41:712-17.
145. Okada Y, Sim X, Go MJ, Wu JY, Gu D, Takeuchi F, et al. Meta-analysis identifies multiple loci associated with kidney function-related traits in East Asian populations. *Nat Genet.* 2012;44:904-09.
146. Yeo NC, O'Meara CC, Bonomo JA, Veth KN, Tomar R, Flister MJ, et al. Shroom3 contributes to the maintenance of the glomerular filtration barrier integrity. *Genome Res.* 2015;25:57-65.
147. Khalili H, Sull A, Sarin S, Boivin FJ, Halabi R, Svajger B, et al. Developmental Origins for Kidney Disease Due to Shroom3 Deficiency. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(10):2965-2973.
148. Böger CA, Chen MH, Tin A, Olden M, Köttgen A, de Boer IH, et al. CUBN is a gene locus for albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2011;22(3):555-70.
149. Amsellem S, Gburek J, Hamard G, Nielsen R, Willnow TE, Devuyst O, et al. Cubilin is essential for albumin reabsorption in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol.* 2010;21(11):1859-67.
150. Morris AP, Le TH, Wu H, Akbarov A, van der Most PJ, Hemani G, et al. Trans-ethnic kidney function association study reveals putative causal genes and effects on kidney-specific disease aetiologies. *Nat Commun.* 2019;10(1):29.
151. Wuttke M, Li Y, Li M, Sieber KB, Feitosa MF, Gorski M, et al. A catalog of genetic loci associated with kidney function from analyses of a million individuals. *Nat Genet.* 2019;51(6):957-972.
152. Mai M, Jiang Y, Wu X, Liu G, Zhu Y, Zhu W. Association of TGF-β1, IL-4, and IL-10 Polymorphisms With Chronic Kidney Disease Susceptibility: A Meta-Analysis. *Front Genet.* 2020;11(79).
153. Cañadas-Garre M, Anderson K, Cappa R, Skelly R, Smyth LJ, McKnight AJ, et al. Genetic Susceptibility to Chronic Kidney Disease - Some More Pieces for the Heritability Puzzle. *Front Genet.* 2019;10:453.
154. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(3):1215.
155. Firth HV, Richards SM, Bevan AP, Clayton S, Corpas M, Rajan D, et al. DECIPHER: Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans Using Ensembl Resources. *Am J Hum Genet.* 2009;84(4):524-533.

156. Landrum MJ, Chitipiralla S, Brown GR, Chen C, Gu B, Hart J, et al. ClinVar: improvements to accessing data. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D835-D844.
157. Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(Database issue):D514-D517.
158. Stenson PD, Ball EV, Mort M, Phillips AD, Shiel JA, Thomaset NST, et al. Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat.* 2003;21(6):577-581.
159. Seo GH, Kim T, Choi IH, Park JY, Lee J, Kim S, et al. Diagnostic yield and clinical utility of whole exome sequencing using an automated variant prioritization system, EVIDENCE. *Clin Genet.* 2020;98(6):562-570.
160. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics.* 2014;30(15):2114-2120.
161. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760.
162. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics.* 2009;25(16):2078-2079.
163. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303.
164. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wanget Q, et al. The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature.* 2020;581(7809):434-443.
165. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Fosteret J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424.
166. UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D506-D515.
167. Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants. *Am J Hum Genet.* 2016;99(4):877-885.
168. Jian X, Boerwinkle E, Liu X. In silico prediction of splice-altering single nucleotide variants in the human genome. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(22):13534-13544.
169. Köhler S, Gargano M, Matentzoglou N, Carmody LC, Lewis-Smith D, Vasilevskyet NA, et al. The Human Phenotype Ontology in 2021. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(D1):D1207-D1217.
170. Greene D; NIH BioResource, Richardson S, Turro E. Phenotype Similarity Regression for Identifying the Genetic Determinants of Rare Diseases. *Am J Hum Genet.* 2016;98(3):490-499.
171. Köhler S, Schulz MH, Krawitz P, Bauer S, Dölken S, Ott CE, et al. Clinical diagnostics in human genetics with semantic similarity searches in ontologies. *Am J Hum Genet.* 2009;85(4):457-464.
172. Tavgigian SV, Greenblatt MS, Harrison SM, Nussbaum RL, Prabhu SA, Boucher KM, et al. Modeling the ACMG/AMP variant classification guidelines as a Bayesian classification framework. *Genet Med.* 2018;20(9):1054-1060.
173. Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10(3):564-567.
174. Groopman EE, Marasa M, Cameron-Christie S, Petrovski S, Aggarwal VS, Milo-Rasouly H, et al. Diagnostic Utility of Exome Sequencing for Kidney Disease. *N Engl J Med.* 2019;380(2):142-151.
175. Mørup SB, Nazaryan-Petersen L, Gabrielaite M, Reekie J, Marquart HV, Hartlinget HJ, et al. Added Value of Reanalysis of Whole Exome- and Whole Genome Sequencing Data From Patients Suspected of Primary Immune Deficiency Using an Extended Gene Panel and Structural Variation Calling. *Front Immunol.* 2022;13:906328.

176. Kars ME, Başak AN, Onat OE, Ozcelik T. The genetic structure of the Turkish population reveals high levels of variation and admixture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(36):e2026076118.
177. Stranneheim H, Lagerstedt-Robinson K, Magnusson M, Kvarnung M, Nilsson D, Lesko N, et al. Integration of whole genome sequencing into a healthcare setting: high diagnostic rates across multiple clinical entities in 3219 rare disease patients. *Genome Med*. 2021;13(1):40.
178. Hou YC, Yu HC, Martin R, Cirulli ET, Schenker-Ahmed NM, Hicks M, et al. Precision medicine integrating whole-genome sequencing, comprehensive metabolomics, and advanced imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020;117(6):3053-3062.
179. Batu ED, Koşukcu C, Taşkıran E, Sahin S, Akman S, Sözeri B, et al. Whole Exome Sequencing in Early-onset Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol*. 2018;45(12):1671-1679.
180. Zoghi S, Ziaee V, Hirschmugl T, Jimenez-Heredia R, Krolo A, Boztug K, et al. Exome sequencing revealed C1Q homozygous mutation in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2018;46(6):594-598.
181. Bhattad S, Rawat A, Gupta A, Suri D, Garg R, de Boer M, et al. Early Complement Component Deficiency in a Single-Centre Cohort of Pediatric Onset Lupus. *J Clin Immunol*. 2015;35(8):777-785.
182. Topaloglu R, Bakkaloglu A, Slingsby JH, Mihatsch MJ, Pascual M, Norsworthy P, et al. Molecular basis of hereditary C1q deficiency associated with SLE and IgA nephropathy in a Turkish family. *Kidney Int*. 1996;50(2):635-642.
183. Hjorten R, Anwar Z, Reidy KJ. Long-term Outcomes of Childhood Onset Nephrotic Syndrome. *Front Pediatr*. 2016;4:53.
184. Nephrotic syndrome in children: prediction of histopathology from clinical and laboratory characteristics at time of diagnosis. A report of the International Study of Kidney Disease in Children. *Kidney Int*. 1978;13(2):159-165.
185. Rout P, Hashmi MF, Baradhi KM. Focal Segmental Glomerulosclerosis. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; December 11, 2024.
186. Mubarak M, Kazi JI. IgM nephropathy revisited. *Nephrourol Mon*. 2012;4(4):603-608.
187. Al Hussain T, Al Mana H, Akhtar M. IgM nephropathy: Clinical significance and pathologic characteristics in pediatric patients. *Pediatr Nephrol*. 2020;35(10):1803–1813.
188. Peruzzi L, Coppo R. IgAN Across the Age Spectrum: The Pediatric Perspective. *Semin Nephrol*. 2024;44(5):151569.
189. Xu L, Wei F, Feng J, Liu J, Liu J, Tanget X, et al. Characteristics and outcomes of glomerulonephritis with membranoproliferative pattern in children. *Transl Pediatr*. 2021;10(11):2985-2996.
190. Al Shehhi RM et al. Spectrum of biopsy-proven glomerular diseases in children: A 10-year single-center experience. *Pediatr Nephrol*. 2020;35(4):697–705.
191. Sethi S, Fervenza FC. Standardized classification and reporting of glomerulonephritis. *Nephrol. Dial. Transplant* 2019;34(2):193–199.
192. Mina R, Brunner HI. Pediatric lupus - clinical and therapeutic advances. *Curr Opin Rheumatol*. 2019;31(5):472–480.
193. Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet*. 2003;362(9384):629-639.
194. Hogg RJ et al. Etiology and outcome of glomerulonephritis in children: Southwest Pediatric Nephrology Study Group. *Kidney Int*. 1996;49(2):479-485.
195. Terano C, Hamada R, Tatsuno I, Hamasaki Y, Araki Y, Gotoh Y, et al. Epidemiology of biopsy-proven Henoch-Schönlein purpura nephritis in children: A nationwide survey in Japan. *PLoS One*. 2022;17(7):e0270796.
196. Dowerah P, Gogoi A, Shira CD, Sarkar B, Mazumdar S. A Study of Dyslipidemia and Its Clinical Implications in Childhood Nephrotic Syndrome. *Cureus*. 2023;15(10):e47434.
197. Mao Y, Zhou W, Zhou Z, Zhang C, Shen J, Yin L. Treatment and outcome of IgA nephropathy in children from one single center experience. *BMC Pediatr*. 2023;23(1):377.

198. Menon S, Valentini RP. Membranous nephropathy in children: clinical presentation and therapeutic approach. *Pediatr Nephrol.* 2010;25(8):1419-1428.
199. Bajeer IA, Khatri S, Kumar P, Hashmi S, Mubarak M, Lanewala AA. Clinical characteristics and short term outcomes of childhood immune complex membranoproliferative glomerulonephritis and C3 glomerulopathy: a single centre retrospective study. *BMC Nephrol.* 2025;26(1):143.
200. Agrwal S, Mantan M, Dabas A, Batra VV. Childhood Steroid-resistant Nephrotic Syndrome: Long-term Outcomes from a Tertiary Care Center. *Indian J Nephrol.* 2022;32(4):320-326.
201. Kang Z, Xun M, Li Z, Yang Z. Association of the clinicopathological characteristics and proteinuria remission of pediatric IgAV with nephrotic-range proteinuria: A retrospective cohort study. *Front Pediatr.* 2022;10:959212.
202. Chan EY, Yap DY, Wong WT, Wong WHS, Wong SW, Lin KYK, et al. Long-Term Outcomes of Children and Adolescents With Biopsy-Proven Childhood-Onset Lupus Nephritis. *Kidney Int Rep.* 2022;8(1):141-150.
203. Bidani AK, Griffin KA. Pathophysiology of hypertensive renal damage: implications for therapy. *Hypertension.* 2004;44(5):595-601.
204. Flynn JT, Kaelber DC, Baker-Smith CM, Blowey D, Carroll AE, Daniels SR, et al; Subcommittee on Screening and Management of High Blood Pressure in Children. Clinical Practice Guideline for Screening and Management of High Blood Pressure in Children and Adolescents. *Pediatrics.* 2017;140(3):e20171904. *Pediatrics.* 2018;142(3):e20181739.
205. Zaffanello M, Brugnara M, Franchini M, Fanos V. Clinical and prognostic significance of arterial hypertension in childhood IgA nephropathy: A systematic review. *Clin Nephrol.* 2007;68(1):1-8.
206. Sethi S, Fervenza FC. Membranoproliferative glomerulonephritis—a new look at an old entity. *N Engl J Med.* 2012;366(12):1119-1131.
207. Trautmann A, Vivarelli M, Samuel S, Gipson D, Sinha D, Schaefer F, et al. IPNA clinical practice recommendations for the diagnosis and management of children with steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2020;35(8):1529-1561.
208. Pillebout E, Nochy D. Henoch–Schönlein purpura nephritis in children and adults. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(9):2059–2067.
209. Rodig NM, McDermott KC, Schneider MF, Hotchkiss HM, Yadin O, Seikaly MG, et al. Growth and adult height in children with various forms of chronic GN. *Pediatr Nephrol.* 2008;23(5): 873–881.
210. Abdalla E, Jeyaseelan L, Ullah I, Abdwani R. Growth Pattern in Children with Systemic Lupus Erythematosus. *Oman Med J.* 2017;32(4):284–290.
211. Rygg M, Pistorio A, Ravelli A, Maghnie M, Di Iorgi N, Bader-Meunier et al. A longitudinal PRINTO study on growth and puberty in juvenile systemic lupus erythematosus. *Ann Rheumatic Dis.* 2012;71(4):511–517.
212. Brunner HI, Silverman ED. Growth and development in childhood systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 2007;19(5):482–487.
213. Coppo R, Troyanov S, Bellur S, Cattran D, Terence Cook H, Feehall J, et al. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments. *Kidney Int.* 2014;86(4):828-836.
214. Drake KA, Ellington N, Gattineni J, Torrealba JR, Hendricks AR. Clinicopathological features of C3 glomerulopathy in children: a single-center experience. *Pediatr Nephrol.* 2020;35(1):153-162.
215. Ronkainen J, Nuutinen M, Koskimies O. The adult kidney 24 years after childhood Henoch-Schönlein purpura: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2002;360(9334):666-670.
216. Warady BA, Abraham AG, Schwartz GJ, Wong CS, Muñoz A, Betoko A., et al. Predictors of Rapid Progression of Glomerular and Nonglomerular Kidney Disease in Children and Adolescents: The Chronic Kidney Disease in Children (CKiD) Cohort. *Am J Kidney Dis.* 2015;65(6):878-888.
217. Agrawal S, Zaritsky JJ, Fornoni A, Smoyer WE. Dyslipidaemia in nephrotic syndrome: mechanisms and treatment. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(1):57-70.

218. Jeong YK, Heeyeon C. Effect of Hypertension on Childhood-onset Systemic Lupus Erythematosus in a Tertiary Medical Center in Korea. *Child Kidney Dis.* 2020; 24(2):107-114.
219. Coppo R, D'Amico G. Factors predicting progression of IgA nephropathies. *J Nephrol.* 2005;18(5):503-512.
220. Bellur SS, Troyanov S, Cook HT, Roberts IS; Working Group of International IgA Nephropathy Network and Renal Pathology Society. Immunostaining findings in IgA nephropathy: correlation with histology and clinical outcome in the Oxford classification patient cohort. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(8):2533-2536.
221. Bidani AK, Griffin KA. Pathophysiology of hypertensive renal damage: implications for therapy. *Hypertension.* 2004;44(5):595-601.
222. Praga M, Morales E. The use of calcineurin inhibitors in glomerular diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2010;6(9):530-539.
223. Feld LG, Waz WR. Hypertension in chronic glomerulonephritis of childhood. *Pediatr Nephrol.* 1993;7(3):295-300.
224. Ozen S, Alikasifoglu M, Bakkaloglu A, Duzova A, Jarosova K, Nemcova D, et al. Tumour necrosis factor alpha G>A -238 and G>A -308 polymorphisms in juvenile idiopathic arthritis. *Rheumatology (Oxford).* 2002;41(2):223-227.
225. Yang YH, Liu YQ, Zhang L, Li H, Li XB, Ouyang Q, et al. Genetic polymorphisms of the TNF- α -308G/A are associated with metabolic syndrome in asthmatic patients from Hebei province, China. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(10):13739-13746.
226. Verweij CL. Tumour necrosis factor gene polymorphisms as severity markers in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 1999;58 Suppl 1(Suppl 1):I20-I26.
227. Lanka S, K VR, Arji A, Raju R, Suvvari TK, Thakwani M, et al. Association of Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) rs1800629 Polymorphism in Chronic Kidney Disease. *Cureus.* 2024;16(5):e60332.
228. Manchanda PK, Kumar A, Kaul A, Mittal RD. Correlation between a gene polymorphism of tumor necrosis factor-alpha (G/A) and end-stage renal disease: a pilot study from north India. *Clin Chim Acta.* 2006;370(1-2):152-157.
229. Sookoian SC, González C, Pirola CJ. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor alpha gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. *Obes Res.* 2005;13(12):2122-2131.
230. Padula MC, Padula AA, D'Angelo S, Lascaro N, Radice RP, Martelli G, et al. TNF α rs1800629 Polymorphism and Response to Anti-TNF α Treatment in Behçet Syndrome: Data from an Italian Cohort Study. *J Pers Med.* 2023;13(9):1347.
231. Kapila N, Gonzalez A, Rosado JM, Flocco G, Salomon F, Abusaif M, et al. Safety of anti-TNF agents in patients with compensated cirrhosis: a case-control study. *Therap Adv Gastroenterol.* 2021;14:17562848211037094.
232. Minozzi S, Bonovas S, Lytras T, Pecoraro V, González-Lorenzo M, Bastiampillai AJ, et al. Risk of infections using anti-TNF agents in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf.* 2016;15(sup1):11-34.
233. Fonseca R, Mariz E, Bernardes M, Costa L. Autoimmune pitfalls in treatment with TNF α inhibitors. *Reumatol Clin.* 2017;13(3):182-183.
234. Ramos-Casals M, Brito-Zerón P, Soto MJ, Cuadrado MJ, Khamashta MA. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies. *Best Pract Res Clin Rheumatol.* 2008;22(5):847-861.
235. Bounia CA, Theodoropoulou EN, Liossis SC. Glomerulonephritis in Two Patients with SpA Treated with TNF- α Blockers and a Review of the Literature. *Biologics.* 2021;15:61-66.
236. Stokes MB, Foster K, Markowitz GS, Ebrahimi F, Hines W, Kaufman D, et al. Development of glomerulonephritis during anti-TNF-alpha therapy for rheumatoid arthritis. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(7):1400-1406.
237. Valova S, Tilkiyan E, Kostyaneva S, Zdravkova I, Erkanyan I, Hristov B. Glomerulonephritis associated with anti -TNF- α therapy. *Nephrol Dial Transplant* 2024, 39, gfae069–1282–2475.

238. Vázquez-Huerta DI, Alvarez-Rodríguez BA, Topete-Reyes JF, Muñoz-Valle JF, Parra-Michel R, Fuentes-Ramírez F, et al. Tumor necrosis factor alpha -238 G/A and -308 G/A polymorphisms and soluble TNF- α levels in chronic kidney disease: correlation with clinical variables. *Int J Clin Exp Med*. 2014;7(8):2111-2119.
239. Harshman LA, Zepeda-Orozco D. Genetic Considerations in Pediatric Chronic Kidney Disease. *J Pediatr Genet*. 2016;5(1):43-50.
240. Piras D, Zoledziwska M, Cucca F, Pani A. Genome-Wide Analysis Studies and Chronic Kidney Disease. *Kidney Dis (Basel)*. 2017;3(3):106-110.
241. Ainsworth HC, Langefeld CD, Freedman BI. Genetic epidemiology in kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2017;32(suppl_2):ii159-ii169.
242. Żywiec J, Kiliś-Pstrusińska K, Tomaszewski M, Grzeszczak W. Analysis of the association between rs12917707 and rs11864909 single nucleotide polymorphisms in the region of the uromodulin gene and chronic kidney disease - a family-based study. *Ann Agric Environ Med*. 2017;24(3):464-466.
243. Liu CT, Garnaas MK, Tin A, Kottgen A, Franceschini A, Per CA, et al. Genetic association for renal traits among participants of African ancestry reveals new loci for renal function. *PLoS Genet*. 2011;7(9):e1002264.
244. Köttgen A, Glazer NL, Dehghan A, Hwang SJ, Katz R, Li M, et al. Multiple loci associated with indices of renal function and chronic kidney disease. *Nat Genet*. 2009;41(6):712-717.
245. Hao W, Ao L, Zhang C, Zhu L, Xie D. IgA nephropathy suspected to be combined with Fabry disease or Alport syndrome: a case report. *J Int Med Res*. 2020;48(3):300060519891290.
246. Rahimzadeh H, Ajlou S, Nili F, Razeghi E. Alport syndrome misdiagnosed with IgA nephropathy from familial history: a case report and brief review. *BMC Nephrol*. 2023;24(1):97.
247. Canetta PA, Radhakrishnan J. The Evidence-Based Approach to Adult-Onset Idiopathic Nephrotic Syndrome. *Front Pediatr*. 2015;3:78. Published 2015 Sep 25. doi:10.3389/fped.2015.00078
248. Jönsen A, Nilsson SC, Ahlqvist E, Svenungsson E, Gunnarsson I, Eriksson KG, et al. Mutations in genes encoding complement inhibitors CD46 and CFH affect the age at nephritis onset in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(6):R206.
249. Mohlin FC, Mercier E, Fremeaux-Bacchi V, Liszewski MK, Atkinson JP, Gris JC, et al. Analysis of genes coding for CD46, CD55, and C4b-binding protein in patients with idiopathic, recurrent, spontaneous pregnancy loss. *Eur J Immunol*. 2013;43(6):1617-1629.
250. Scambi C, Ugolini S, Jokiranta TS, De Franceschi L, Bortolami O, La Verde V, et al. The local complement activation on vascular bed of patients with systemic sclerosis: a hypothesis-generating study. *PLoS One*. 2015;10(2):e0114856.
251. Servais A, Frémeaux-Bacchi V, Lequintrec M, Salomon R, Blouin J, Knebelmann B, et al. Primary glomerulonephritis with isolated C3 deposits: a new entity which shares common genetic risk factors with haemolytic uraemic syndrome. *J Med Genet*. 2007;44(3):193-199.
252. Manenti L, Gnappi E, Vaglio A, Allegri L, Noris M, Bresin E, et al. Atypical haemolytic uraemic syndrome with underlying glomerulopathies. A case series and a review of the literature. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(9):2246-2259.
253. Caprioli J, Noris M, Brioschi S, Pianetti G, Castelletti F, Bettinaglio P, et al. Genetics of HUS: the impact of MCP, CFH, and IF mutations on clinical presentation, response to treatment, and outcome. *Blood*. 2006;108(4):1267-1279.
254. Esparza-Gordillo J, Jorge EG, Garrido CA, Carreras L, López-Trascasa M, Sánchez-Corral P, et al. Insights into hemolytic uremic syndrome: segregation of three independent predisposition factors in a large, multiple affected pedigree. *Mol Immunol*. 2006;43(11):1769-1775.
255. Fremeaux-Bacchi V, Moulton EA, Kavanagh D, Dragon-Durey MA, Blouin J, Caudy A, et al. Genetic and functional analyses of membrane cofactor protein (CD46) mutations in atypical hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):2017-2025.
256. Spârchez M, Lupan I, Delean D, Bizo A, Damian L, Muntean L, et al. Primary complement and antibody deficiencies in autoimmune rheumatologic diseases with juvenile onset: a prospective study at two centers. *Pediatr Rheumatol Online J*. 2015;13:51.

PUBLIKOVANI RADOVI IZ TEZE

1. Peric M, Anicin A, Brankovic M, Stajic N, Putnik J, Paripovic A, Jankovic M, Bozovic I, Perovic V, Novakovic I, Vukomanovic V, Milosevic E. Genetic Susceptibility to Glomerulonephritis in Children: Analysis of Structural Kidney Genes and Immune System Genes. *J Clin Med* 2025;14(14):5119. doi: 10.3390/jcm14145119. M21.
2. Peric M, Brankovic M, Stajic N, Putnik J, Paripovic A, Jankovic M, Nikolic D, Milanovic F, Novakovic I, Vukomanovic V. Whole-exome sequencing in pediatric patients with glomerulonephritis. *Front Genet* 2025;16:1611340. doi: 10.3389/fgene.2025.1611340. M22.
3. Peric M. Genetic basis of primary glomerulonephritides. *Medicinski podmladak* 2027;78(4). doi: 10.5937/mp78-53498. M53.

BIOGRAFIJA AUTORA

Dr Marina Perić je rođena 4. juna 1983. godine u Beogradu. Završila je Gimnaziju u Mladenovcu 2002. godine kao nosilac Vukove diplome. Tokom redovnih studija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu bila je stipendista Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka. Diplomirala je 2008. godine sa prosečnom ocenom 9,54.

Zaposlena je kao lekar Pedijatrijske klinike Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ od 2011. godine, a prethodno je dve godine bila volonter Pedijatrijske klinike. Specijalistički ispit iz pedijatrije je položila 30. januara 2020. godine sa odličnom ocenom. Kao specijalista pedijatar je zaposlena na Odeljenju za ispitivanje i lečenje bolesti bubrega i mokraćnih kanala od 2020. godine.

Član je Srpskog lekarskog društva (SLD), Evropskog udruženja za pedijatrijsku i neonatalnu intenzivnu negu (ESPNIC), Evropskog udruženja za pedijatrijsku nefrologiju (ESPN) i Međunarodnog udruženja za nefrologiju (IPNA).

Dr Perić je do sada objavila 16 naučnih radova u celini, od toga pet kao prvi autor. Dobitnik je nagrade Instituta za zdravstvenu zaštitu majke i deteta Srbije „Dr Vukan Čupić“ za naučno-istraživački rad mladih istraživača za 2017. godinu. Učestvovala je u Velikoj viziti pedijatrijske nefrologije ESPN u maju 2024. godine na temu renovaskularne hipertenzije kod dece. Pohađala je IPNA-ESPN *Junior Master Classes* u oktobru 2025. godine.

Dr Perić govori engleski jezik i služi se ruskim jezikom.

Udata je i majka je troje dece.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марина Перич
Број индекса ММ-14/11

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ИСПИТИВАЊЕ ГЕНЕТИЧКЕ ПРЕДИСПОЗИЦИЈЕ ЗА НАСТАНАК
ХРОНИЧНИХ, ИМУЊСКИ ПОСРЕДОВАНИХ БОЛЕСТИ ГЛОМЕРУЛА У
ДЕЧЈОЈ ПОПУЛАЦИЈИ

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 25.12.2025.

Марина Перич

образац изјаве о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истовестности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марина Перих

Број индекса ММ-14/11

Студијски програм ПАС МОЛЕКУЛАРНА МЕДИЦИНА

Наслов рада ИСПИТИВАЊЕ ГЕНЕТИЧКЕ ПРЕДИСПОЗИЦИЈЕ ЗА НАСТАНАК ХРОНИЧНИХ ИМУНСКИ ПОСРЕДОВАНИХ БОЛЕСТИ ГЛОМЕРУЛА У ДЕЧЈОЈ ПОПУЛАЦИЈИ

Ментор Проф. др Владислав Вукмановић

Коментатор: Проф. др Ивана Новаковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истовестна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 25. 12. 2025.

Марина Перих

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ИСПИТИВАЊЕ ГЕНЕТИЧКЕ ПРЕДИСПОЗИЦИЈЕ ЗА НАСТАНАК
ХРОНИЧНИХ, ИМУНСКИ ПОСРЕДОВАНИХ БОЛЕСТИ ГЛОМЕРУЛА У ДЕЧЈОЈ
ПОПУЛАЦИЈИ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ☒ 3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 25. 12. 2025.

Марина Терзић