Izražaj receptora za D vitamin, 25-hidroksivitamin D 1α–hidroksilaze i vitamin D3 24-hidroksilaze u bubrezima pacijenata s IgA nefropatijom

Arapović, Adela

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:171:277603

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

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

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET
UNIVERSITAS STUDIORUM SPALATENSIS
FACULTAS MEDICA

Repository / Repozitorij:

MEFST Repository

UNIVERSITY OF SPLIT

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

ADELA ARAPOVIĆ

IZRAŽAJ RECEPTORA ZA D VITAMIN, 25-HIDROKSIVITAMIN D 1α–HIDROKSILAZE I VITAMIN D3 24-HIDROKSILAZE U BUBREZIMA PACIJENATA S IgA NEFROPATIJOM

DOKTORSKI RAD

Split, 2022.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
MEDICINSKI FAKULTET

ADELA ARAPOVIĆ

IZRAŽAJ RECEPTORA ZA D VITAMIN, 25-HIDROKSIVITAMIN D 1α–HIDROKSILAZE I VITAMIN D3 24-HIDROKSILAZE U BUBREZIMA PACIJENATA S IgA NEFROPATIJOM

DOKTORSKI RAD

Akademska godina: 2021./2022.

Mentor:

izv. prof. dr. sc. Natalija Filipović

Split, 2022.

Rad je izveden u Laboratoriju za neurokardiologiju Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu.

Voditeljica rada: izv. prof. dr. sc. Natalija Filipović

ZAHVALA

„Iscrpljena si od tolikih lutanja, al' nisi rekla: Beznadno je! Snagu si svoju nanovo našla te nisi sustala.“ Soli Deo gloria!

Želim najiskrenije zahvaliti svima koji su omogućili i na bilo koji način pomogli izvedbi ovog rada, a posebice:

- mentorici, izv. prof. dr. sc. Nataliji Filipović na ideji, nesebičnoj pomoći, trudu i podršci, od srca hvala,

- prof. dr. sc. Katarini Vukojević na izdvojenom vremenu, riječima ohrabrenja, poticaju i nesebičnoj pomoći,

- prof. dr. sc. Marijanu Saragi na znanju kojeg ste mi prenijeli te pomoći u mom stručnom i znanstvenom usavršavanju,

- prof. dr. sc. Merici Glavina Durdov koja je svojim savjetima i pomoći uvelike doprinijela kvaliteti ovog rada,

- kolegama iz Zavoda za anatomiju, histologiju i embriologiju,

- mojoj obitelji i prijateljima na bezgraničnoj potpori i ljubavi koju mi pružate.

Sve što sam postigla, bez vas ne bi bilo moguće!

SADRŽAJ

1. UVOD…… 1

1.1. Građa i funkcija bubrega..... 2

1.1.1. Histologija bubrega..... 4

1.2. Biopsija bubrega..... 5

1.2.1. IgA nefropatija..... 7

1.3. Vitamin D..... 14

1.3.1. Metabolizam vitamina D..... 14

1.3.2. 25-hidroksivitamin D 1α-hidroksilaza; 1α-OHaza; CYP27B1..... 17

1.3.3. Vitamin D3 24-hidroksilaza; 24-OHaza; CYP24A1..... 17

1.3.4. Receptor vitamina D (VDR)..... 17

1.3.5. Nedostatak vitamina D..... 18

1.3.6. Izvanskeletni učinci vitamina D..... 20

1.3.7. Vitamin D i autoimune bolesti..... 20

2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA……..... 23

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA……..... 24

4. ISPITANICI I POSTUPCI..... 25

4.1. Ispitanici i uzorci..... 25

4.1.1. Obrada prikupljenih uzoraka..... 26

4.1.2. Mikroskopska analiza obojenih preparata..... 28

4.2. Statistički postupci..... 28

5. REZULTATI..……..……..... **29**

5.1. Kliničke indikacije za biopsiju bubrega u djece s rapodjelom patoloških dijagnoza od 2008 - 2017. godine..... 29

5.2. Usporedba patoloških nalaza perkutane bubrežne biopsije u djece u analiziranom i prethodnom razdoblju……..... 31

5.3. Imunohistokemijska analiza VDR-a, 1α-OHaze i CYP24A1 u bolesnika s IgAN-om…… 32

5.4. Izražaj VDR-a u bubrežnom tkivu…..... 34

5.5. Izražaj 1α-OHaze u bubrežnomtkivu…..... 36

5.6. Izražaj CYP24A1 u bubrežnom tkivu…..... 38

6. RASPRAVA.……..……..... **41**

6.1. Epidemiološka analiza perkutanih bubrežnih biopsija u desetogodišnjem razdoblju u Klinici za dječje bolesti KBC Split 41
6.2. Izražaj receptora za vitamin D i metabolizirajućih enzima D vitamina u bubrežnom tkivu bolesnika s IgA nefropatijom…….. 45
7. ZAKLJUČCI…….....…….... 50
8. LITERATURA ……....……. 51
9. SAŽETAK ……..... 66
10. SUMMARY ……...…… 68
11. ŽIVOTOPIS ……...……... 70

POPIS OZNAKA I KRATICA

1α-OHaza	1α-hidroksilaza (engl. *25-hydroxyvitamin D3-1α-hydroxylase*), **CYP27B1**
1,25(OH)$_2$D3	1,25-dihidroksivitamin D3; kalcitriol (engl. *1,25-dihydroxyvitamin D3*)
1,23,25(OH)$_3$D3	1,23,25-trihidroksivitamin D3 (engl. *1,23,25-trihydroxyvitamin D3*)
1,24,25(OH)$_3$D3	1,24,25-trihydroxyvitamin D3 (engl. *1,24,25-trihydroxyvitamin D3*)
24-OHaza	24-hidroksilaza (engl. *vitamin D3-24-hydroxylase*), **CYP24A1**
24,25(OH)$_2$D3	24,25-dihidroksivitamin D3 (engl. *24,25-dihydroxyvitamin D3*)
25-OHaza	25-hidroksilaza (engl. *vitamin D-25 hydroxylase*), **CYP27A1**
ACE	angiotenzin-konvertirajući enzima (engl. *angiotensin-converting enzyme*)
ADH	antidiuretski hormon
ARBs	blokatori angiotenzinskih receptora (engl. *angiotensin receptor blockers*)
AS	Alportov sindrom
AZB	akutno zatajenje bubrega
C1qN	C1q nefropatija
C3GN	C3 glomerulonefritis
CKD	kronična bolest bubrega (engl. *chronic kidney disease*)
D2	ergokalciferol
D3	kolekalciferol
DAPI	4', 6-diamid-2-fenilindol (engl. *4', 6-diamidino-2-phenylindole*)
DBP	vitamin D vezujući protein (engl. *vitamin D binding protein*)
DNA	deoksiribonukleinska kiselina (engl. *deoxyribonucleic acid*)
eGFR	procijenjena glomerularna filtracija (engl. *estimated glomerular filtration rate)*
EM	elektronska mikroskopija
ESRD	završni stadij bubrežnog zatajenja (engl. *end-stage renal disease*)
FGF-23	čimbenik rasta fibroblasta -23 (engl. *fibroblast growth factor-23*)
FITC	fluorescein izocijanat (engl. *fluorescein isothiocyanate*)
FSGS	fokalna segmentalna glomuloskleroza
FSNGN	fokalni segmentalni nekrotizirajući glomerulonefritis
GBM	glomerularna bazalna membrana
HSP	Henoch-Schönlein purpura
HSPN	Henoch-Schönlein nefritis (engl. *Henoch-Schönlein purpura nephritis*)
HUS	Hemolitičko-uremijski sindrom

IF	imunofluorescentna mikroskopija
IgA	imunoglobulin A
IgA1	IgA1 podtip IgA protutijela
IgA2	IgA2 podtip IgA protutijela
IgAN	IgA nefropatija
IgAN-P	pacijenti s IgA-nefropatijom
IgG	imunoglobulin G
IH	izolirana hematurija
IgM	imunoglobulin M
ISN	Međunarodno društvo za nefrologiju (engl. *International Society of Nephrology*)
KBC	Klinički bolnički centar
LN	lupusni nefritis
MCD	bolest minimalnih promjena (engl. *minimal change disease*)
MesPGN	mezangijski proliferativni glomerulonefritis
MEST(C)	**-m**ezangijska hipercelularnost
	-endokapilarna proliferacija
	-segmentalna skleroza
	-tubularna atrofija
	-polumjeseci (engl. ***c****rescents*)
MGN	membranski glomerulonefritis
MHC	glavni kompleks tkivne podudarnosti (engl. *major histocompatibility complex*)
NK stanice	prirođene stanice ubojice (engl. *natural killer cells*)
NS	nefrotski sindrom
PAS	engl. *periodic acid Schiff*
PBS	fiziološka otopina u fosfatnom puferu (engl. *phosphate buffer saline*)
PHD	patohistološka dijagnoza
PIGN	postinfekcijski glomerulonefritis
PTH	paratireoidni hormon
RAAS	renin-angiotenzin-aldosteronski sustav
RANTES	(engl. *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*)
RPGN	brzo progresivni glomerulonefritis (glomerulonefritis s polumjesecima)
RXR	retinoid X receptor
SM	svjetlosna mikroskopija

WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*)
TBMN	nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana (engl. *thin basement membrane disease*)
TEM	transmisijski elektronski mikroskop
TIN	tubulointersticijski nefritis
TLR	engl. *Toll-like receptor*
TTP	trombotična trombocitopenična purpura
VDR	receptor za vitamin D (engl. *vitamin D receptor*)
VDRA	aktivator receptora vitamina D (engl. *vitamin D receptor activator*)
VDRE	engl. *vitamin D response element*

1. UVOD

Bubrežne bolesti glomerula i tubulointersticija značajno doprinose morbiditetu u dječjoj dobi. Za njihovo uspješno liječenje i praćenje često je potrebno učiniti biopsiju bubrega i postaviti patološku dijagnozu (1). Na taj način su širom svijeta stvoreni nacionalni registri bubrežnih biopsija, koji su međutim pokazali različite epidemiološke podatke (1-14). U svakodnevnom radu na Klinici za dječje bolesti, tercijalnom centru kojem gravitira područje južne Hrvatske, primijetili smo promjenu u indikacijama za izvođenje bubrežnih biopsija i pojavnosti pojedinih glomerulopatija u posljednjih deset godina u odnosu na ranije razdoblje.

Najčešće indikacije za biopsiju bubrega su: nefrotski sindrom (NS), ne-nefrotska proteinurija s hematurijom, nefritički sindrom s nefrotskom proteinurijom i izolirana hematurija (IH). U čeških autora je IH-a bila glavna indikacija, u Maroku nefrotska proteinurija s hematurijom, a u Velikoj Britaniji ne-nefrotska proteinurija (1-14). Iz navedenog proizlazi da se u raznim zemljama indikacije za bubrežnu biopsiju bubrega donekle razlikuju. Ponekad je teško usporediti čak i rezultate bubrežnih biopsija iz istog centra, ako su urađene u različitim vremenskim razdobljima. Razlozi za to su promjene indikacija za biopsiju bubrega, proširenje metoda analize bioptiranog tkiva, pojava novoopisanih entiteta i nove dijagnostičke klasifikacije bubrežnih bolesti. Stoga, usporedba patoloških nalaza ponekad može biti teška, čak i nemoguća (2, 4-15).

IgA nefropatija (IgAN) je najčešći primarni glomerulonefritis u svijetu i značajno doprinosi nastanku kronične bolesti bubrega (CKD, engl. *chronic kidney disease*) i završnog stadija bubrežnog zatajenja (ESRD, engl. *end-stage renal disease*). Na učestalost i napredovanje IgAN-e utječu genski i okolišni čimbenici (16, 17). Patogeneza IgAN-e nije u potpunosti razjašnjena, ali se zna da sudjeluju komponente urođenog i stečenog imuniteta. Uključene su dendritičke stanice, makrofagi, prirođene stanice ubojice (NK stanice, engl. *natural killer cells*), podskupine T limfocita, B limfociti, kao i IgA1 protutijela, autoprotutijela na IgA1 i komponente sustava komplementa (18, 19). Dijagnoza IgAN-e je zasnovana isključivo na patološkom nalazu, pa je stoga neophodno učiniti biopsiju bubrega (20). Spektar kliničkih manifestacija IgAN-e je širok, a najčešća je makrohematurija ili

mikrohematurija. Klinički tijek bolesti je bez sveobuhvatne patološke i kliničke procijene, nepredvidljiv (21).

Brojna istraživanja su pokazala da nedostatak vitamina D pridonosi patogenezi bubrežnih bolesti, pa tako i IgAN-e (22). Kalcitriol [1,25$(OH)_2$D3], hormonski aktivni oblik vitamina D i prirodni ligand receptora za vitamin D (VDR, engl. *vitamin D receptor*), izaziva niz ekstraskeletnih bioloških odgovora. To su primjerice; učinak na kardiovaskularni sustav putem regulacije izražaja renina, inhibicija napredovanja zloćudnih bolesti i učinci na ravnotežu imunosnih stanica u autoimunim bolestima (22). Aktivacija VDR-a svestrano pridonosi zaštiti bubrega u bubrežnim bolestima; ima protuupalno djelovanje, suzbija aktivaciju renin-angiotenzin-aldosteronskog sustava (RAAS), obnavlja funkcije mitohondrija, smanjuje intersticijsku fibrozu, glomerulosklerozu i oštećenje podocita, suzbija proliferaciju, apoptozu i autoimunosni odgovor (22). VDR se nalazi u stanicama gotovo svih tkiva, uključujući T i B limfocite, dendritičke stanice, monocite i makrofage (19, 23). Imunosne stanice mogu izražavati metabolizirajuće enzime vitamina D: 25-hidroksivitamin D 1α-hidroksilazu (1α-OHaza; CYP27B1) i vitamin D3 24-hydroksilazu (24-OHaza; CYP24A1), što omogućuje autonomno stvaranje i razgradnju aktivnih metabolita vitamina D. Rasprostranjenost VDR-a i enzima aktivacije vitamina D (1α-OHaza) i inaktivacije vitamina D (CYP24A1) ukazuje da stanice u različitim tkivima imaju potencijal za aktivaciju, odnosno deaktivaciju vitamina D koji djeluje autokrino ili parakrino (23-25).

Među brojnim istraživanjima o učincima vitamina D ne postoje studije o izražaju VDR-a i metabolizirajućih enzima vitamina D u bubrezima pacijenata s IgAN-om.

1.1. Građa i funkcija bubrega

Bubreg (lat. *ren,* grč. *nephros*) je parni organ, oblika zrna graha koji filtriranjem krvi stvara mokraću. Smješten je retroperitonealno, po jedan sa svake strane kralježnice, lijevi između XII. prsnog i III. slabinskog kralješka, a desni nešto niže. Bubrežni parenhim obavijen je vezivnom čahurom (lat. *capsula fibrosa*). Iznad svakog bubrega nalazi se nadbubrežna žlijezda. Obavija ih masno tkivo (lat. *capsula adiposa*) čija je funkcija održavanje bubrega u normalnom položaju (26, 27).

Bubreg je građen od medularnog i kortikalnog dijela. Medulu (lat. *medulla renalis*) čine piramide (lat. *pyramides renales*) sačinjene od bubrežnih kanalića, međusobno odvojene izdancima bubrežne kore (lat. *cortex renalis*). Vrhovi piramida (lat. *papillae renales*) okrenuti su prema bubrežnom hilusu, a baze piramida prema vanjskoj površini bubrega. Papile su obavijene bubrežnim vrčevima (lat. *calices renales*), koji se slijevaju u bubrežnu nakapnicu (lat. *pelvis renalis*), a ona prelazi u mokraćovod (ureter).

Bubrežna kora je zrnatog izgleda zbog velikog broja glomerula, bubrežnih tjelešaca. Piramide su radijalno isprugane i građene od sabirnih cijevi. Svaka piramida s pripadajućom kortikalnom tvari tvori bubrežni režanj (lat. *lobus renalis*). Bubrežna kora koja se nalazi ispod čahure, među piramide šalje izdanke (lat. *columnae renales*). Kortikalna tvar se dijeli u vanjsku zonu (lat. *pars convoluta*) koja sadržava glomerule i zavijene kanaliće i unutarnju zonu (lat. *pars radiata*) koja sadržava jukstamedularne glomerule i ravne kanaliće koji odlaze u piramide (26, 27).

U središtu konkavne strane bubrega nalazi se hilus (lat. *hilum renale*) kojeg sačinjavaju bubrežna arterija (lat. *arteria renalis*), bubrežna vena (*lat. vena renalis*) i bubrežna nakapnica, na koju se nastavlja mokraćovod. Prije ulaska u hilus bubrežna arterija se dijeli na prednju i stražnju granu (lat. *ramus anterior et posterior*), koje se dijele na segmentalne arterije (lat. *arteriae segmenti*). U bubrežnom hilusu segmentalne arterije prelaze u intrarenalne (lat. *arteriae intrarenales*) a ove u interlobarne arterije (lat. *arteriae interlobares*). Interlobarna arterija se na bazi piramide dijeli u dvije lučne arterije (lat. *arteriea arcuatae*) koje prolaze bazom piramida i daju kortikalne zrakaste arterije (lat. *arteriae corticales radiatae*). Zrakaste arterije idu prema površini bubrega i daju arteriole koje ulaze u glomerularno tjelešce (lat. *arteriolae glomerularis afferens*). Aferentna arteriola grana se u glomerulu u kapilare i izlazi kao eferentna arteriola (lat. *arteriola glomerularis efferens*). Eferentna arteriola daje gustu peritubularnu kapilarnu mrežu oko proksimalnog i distalnog zavijenog kanalića. Iz te kapilarne mreže nastaju vene koje prate odgovarajuće arterije (lat. *venae corticales radiate*, *venae arcuate* i *venae interlobares*). Venska krv iz interlobarnih vena odlazi u bubrežnu venu (26, 27).U bubregu se filtrira velika količina krvi s protokom oko 1,2 L/min. Jedan dio izlučenih tvari potrebnih organizmu (glukoza, aminokiseline, elektroliti) ponovno se apsorbira u plazmu peritubularnih kapilara, a ostatak zajedno s otpadnim tvarima i vodom skuplja u bubrežnim čašicama i nakapnici, te kao mokraća odlazi u mokraćovod.

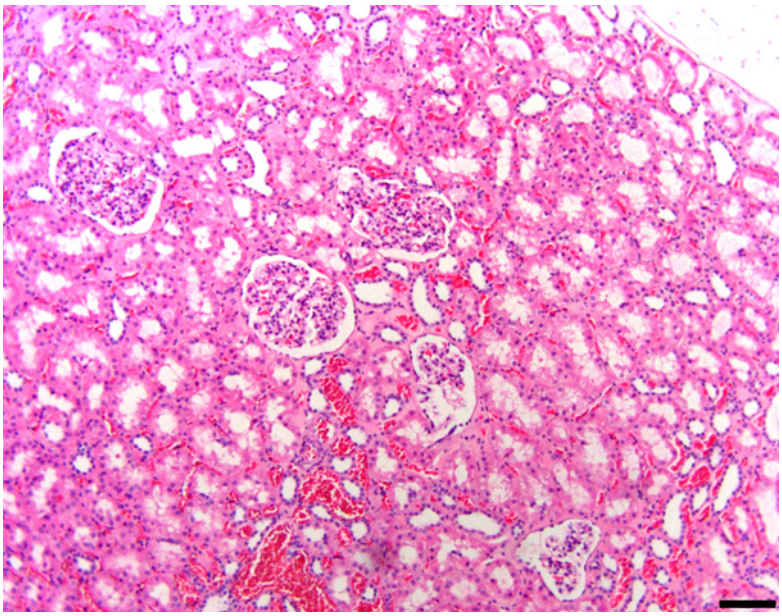
Glavne funkcije bubrega su održavanje ravnoteže vode, elektrolita i acidobaznog statusa, eliminacija otpadnih tvari iz organizma, izlučivanje hormona (eritropoetin, renin, prostaglandini, vitamin D) koji sudjeluju u eritropoezi i regulaciji krvnog tlaka i koštano-mineralnog metabolizma. Izlučivanje vode i/ili minerala mokraćom nadziru aldosteron i antidiuretski hormon (ADH) (26, 27).

1.1.1. Histologija bubrega

Osnovna funkcionalna jedinica bubrega je nefron kojeg čine bubrežno tjelešce (glomerul okružen Bowman-ovom čahurom), proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja, distalni zavijeni kanalić i sabirne cijevi (Slika 1). Svaki bubreg sadrži oko milijun nefrona. Između dvaju listova Bowman-ove čahure nalazi se urinarni prostor u koji se filtrira tekućina iz glomerularnih kapilara kroz glomerularnu filtracijsku membranu. Kapilare unutar glomerula obložene su endotelnim stanicama, ispod kojih se nalazi glomerularna bazalna membrana (GBM) debljine 250 - 450 nm, na koju se s vanjske strane naslanjaju nožice podocita, epitelnih stanica visceralnog lista Bowman-ove čahure. Ultrastrukturno GBM pokazuje troslojnu strukturu: središnji, tamniji sloj (lat. *lamina densa*) i sa svake strane svijetli sloj (lat. *lamina rara*). Fenestre endotela, GBM i pukotinasta membrana između sekundarnih nožica podocita predstavljaju filtracijsku barijeru. U središtu kapilarnog klupka glomerula nalazi se mezangij, kojeg čine mezangijske stanice i ekstracelularni matriks (28).

Na vaskularnom polu glomerula nalazi se jukstaglomerularni aparat, sastavljen od jukstaglomerularnih stanica i makule dense na blisko smještenom distalnom kanaliću. Citoplazma jukstaglomerularnih stanica sadrži sekretorna zrnca renina. Osmoreceptori u makuli densi reagiraju na manjak natrija u ultrafiltratu i potiču lučenje renina radi regulacije krvnog tlaka. Iz urinarnog pola glomerula izlazi proksimalni zavijeni kanalić u kojem se resorbira 60% glomerularnog filtrata; karakteristično je građen od niskog cilindričnog epitela s brojnim mikrovilima koji čine četkastu prevlaku. Proksimalni kanalić nastavlja se na Henleovu petlju koja ima važnu zadaću koncentriranja mokraće. Ima oblik slova „U“ i sastoji se od debelog dijela silaznog kraka, tankog dijela silaznog kraka, tankog dijela uzlaznog kraka i debelog dijela uzlaznog kraka. Za vodu je propustan samo tanki dio silaznog kraka, dok je uzlazni krak u potpunosti nepropustan. Debeli uzlazni krak Henleove petlje ulazi u koru,

nakon kratkog toka postaje zavijen i prelazi u distalni zavijeni kanalić. Distalni zavijeni kanalić je obložen jednoslojnim kubičnim epitelom bez četkaste prevlake. U kori prelazi u sabirne cjevčice koje se udružuju u veće sabirne cijevi, na vršku papila pretvaraju u Bellinijeve kanale i izlijevaju u bubrežnu nakapnicu. Manje sabirne cjevčice oblaže kubični epitel koji postupno prelazi u cilindrični. Glavna uloga sabirnih kanala je koncentriranje mokraće. Između glomerula i bubrežnih kanalića je oskudni intersticij s krvnim i limfnim žilama (28).



Slika 1. Kora zdravog zrelog bubrega s vezivnom čahurom. Glomeruli, tubulointersticij i krvne žile su u bliskom rasporedu, bojenje hemalaun-eozinom (povećanje objektiva 40x; mjerna skala – 500 µm). Autorica zahvaljuje na ustupljenoj fotografiji prof. dr. sc. Merici Glavina Durdov.

1.2. Biopsija bubrega

Danas je perkutana biopsija bubrega „zlatni standard“ u dijagnostici parenhimskih bubrežnih bolesti. Prve otvorene biopsije bubrega urađene su početkom XX. stoljeća. Alwahl je 1944. godine izveo prvu perkutanu biopsiju bubrega, a punkciju bubrega aspiracijskom iglom uradili su Iverson i Brun 1951. godine (29, 30).

Tehnika perkutane biopsije bubrega s vremenom se usavršavala. Danas se primjenjuje tzv. *cutting* ili *core* biopsija pomoću koaksijalnih igala, ručno ili automatski uz pomoć uređaja za okidanje (engl. *gun*). Bioptičke igle su kalibra od 14 do 18 gaugea. Prije zahvata potrebno je učiniti testove zgrušavanja krvi i kontrolirati krvnu sliku. Perkutana biopsija bubrega s automatskim uređajem na okidanje izvodi se pod ultrazvučnim nadzorom. Nativni bubrezi bioptiraju se u potrbušnom položaju bolesnika s kompresijskim jastukom ispod trbuha. Obično se bioptira donji pol lijevog bubrega, a rjeđe donji pol desnog bubrega. Perkutana biopsija transplantiranog bubrega koji je smješten u maloj zdjelici, izvodi se u položaju na leđima i bioptira dostupni pol transplantata. Prije postupka se uz pomoć ultrazvuka označi mjesto biopsije. Nakon čišćenja kože i lokalne anestezije, učini se mali rez na koži za lakši prolaz igle te pod ultrazvučnom kontrolom iglom dođe do čahure bubrega i aktivira automatski uređaj na okidanje. U djece se cijeli postupak radi u analgosedaciji. Uobičajeno se uzimaju dva uzorka tkiva. Nakon biopsije bolesnik treba ležati na leđima s kompresijskim jastukom ispod mjesta biopsije. Djeca su pod nadzorom 24 sata: prate se vitalni znakovi, kontrolira krvna slika i urin, 2 - 3 sata nakon biopsije uradi se kontrolni ultrazvuk bioptiranog bubrega, a po potrebi i nakon 24 sata (29, 30).

Indikacije za biopsiju bubrega razlikuju se ovisno o bolničkom centru i nacionalnim smjernicama. Indikacijska biopsija bubrega izvodi se radi točnog utvrđivanja prirode bubrežnog oštećenja u slučaju poremećene funkcije nativnog ili transplantiranog bubrega i odluke o načinu liječenja. Protokolarna biopsija bubrega radi se u nekoliko navrata prema utvrđenom planu nakon transplantacije bubrega, radi ranog otkrivanja povrata osnovne bolesti, akutnog/kroničnog odbacivanja transplantata ili pravovremenog dijagnosticiranja štetnog učinka imunosupresivnih lijekova. U bolesti nativnih bubrega, protokolom (rebiopsijom) precizno se utvrđuje napredovanje bolesti ili uspješnost liječenja radi prilagodbe terapije.

Komplikacije nakon biopsije bubrega su rijetke. Većina se odnosi na mikrohematuriju, makrohematuriju, perinefritički subkapsularni ili veći retroperitonealni hematom. Manifestno krvarenje se javlja u 1 - 2% slučajeva i najčešće spontano prestane. Teške komplikacije kao što su: krvarenje koje zahtijeva transfuziju krvi ili operacijsko zbrinjavanje (0,1 - 0,4% slučajeva), akutna opstrukcija mokraćnog sustava, akutno zatajenje bubrega (AZB), nastanak arteriovenske fistule ili aneurizme, ozljede susjednih organa,

pneumotoraks, sepsa i smrt su iznimno rijetke. Nakon biopsije bubrega, preporuča se mjesec dana poštede bolesnika od umjerenih i većih tjelesnih napora (30).

Opisanom tehnikom izvođenja biopsije dobije se potpuno očuvano bubrežno tkivo adekvatno za patološku analizu. Bioptirano tkivo treba staviti u fiziološku otopinu, zatvoriti u plastičnu posudicu koja je označena pacijentovim imenom i odmah dostaviti u patološki laboratorij. U prikladnom uzorku za svjetlosnu mikroskopiju (SM) prevladava bubrežna kora u kojoj se nalazi minimalno 10 - 20 glomerula, a bubrežnu srž čini manji dio uzorka. Imunofluorescencijska mikroskopija (IF) je neophodna za točnu dijagnozu: IgAN-e, C1q nefropatije (C1qN, engl. *C1q nephropathy*), lupusnog nefritisa (LN) i C3 glomerulonefritisa (C3GN, engl. *C3 glomerulonephritis*). Nalaz elektronske mikroskopije (EM) je neophodan za potvrdu i dopunu dijagnoze temeljene na SM-i i IF-i, npr. za određivanje stadija membranskog glomerulonefritisa (MGN, engl. *membranous glomerulonephritis*), lokalizacije i količine depozita u IgAN-i i LN-u, te za bolesti koje se bez EM-e ne mogu postaviti: bolest minimalnih promjena (MCD, engl. *minimal change disease*), Alportov sindrom (AS), nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana (TBMN, engl. *thin basement membrane disease*), rana amiloidoza, fibrilarni glomerulonefritis.

Apsolutne kontraindikacije za biopsiju bubrega su: izraziti poremećaj položaja i oblika bubrega koji ga čine nedostupnim za biopsiju, jako smanjeni bubrezi zbog uznapredovalog CKD-a odnosno ESRD-a, adultna policistična bolest bubrega, trudnoća nakon tridesetog tjedna gestacije i periparatalno razdoblje. U relativne kontraindikacije spadaju solitarni bubreg, teška hemoragijska dijateza, nekontrolirana arterijska hipertenzija, infekcija mokraćnog sustava i teška trombocitopenija (29, 30).

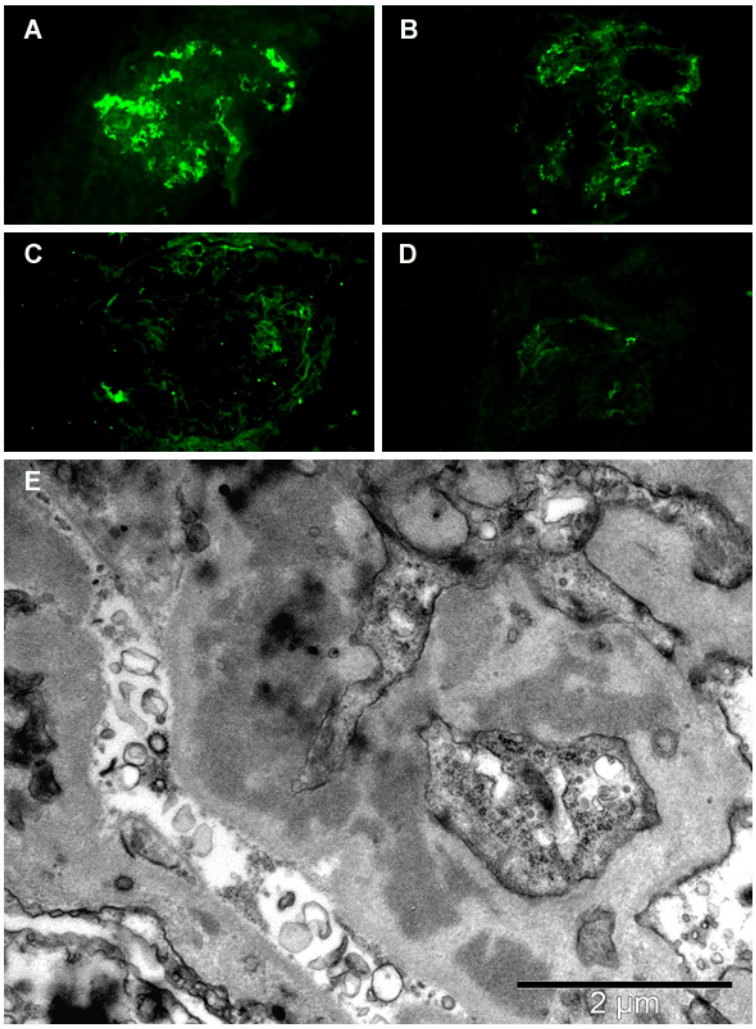
1.2.1 IgA nefropatija

IgA nefropatija (Bergerova bolest) je progresivna glomerularna bolest nepoznate etiologije i autoimune patogeneze. Karakterizirana je difuznim odlaganjem IgA1 imunih kompleksa u mezangiju bubrega, koje dovodi do aktivacije alternativnog i lektinskog puta komplementa, proliferacije mezangijskih stanica, glomerulonefritisa i oštećenja bubrežne funkcije. Bolest su 1968. godine prvi opisali francuski patolozi Jean Berger i Nicole Hinglais

koji su uporabom imunofluoroscentne metode dokazali interkapilarne depozite IgA i otkrili primarni IgA glomerulonefritis. Prosječna incidencija IgAN-e je 25 - 50 oboljelih na 100 000 stanovnika godišnje. IgAN je najčešća primarna glomerulopatija i javlja se širom svijeta (31-38).

Dijagnoza se postavlja isključivo biopsijom bubrega, tj. patološkom analizom bioptata uporabom metoda SM-e, IF-e i EM-e. Osnovno obilježje bolesti je imunofluoroscentni nalaz dominantnih galaktoza-deficijentnih IgA1 depozita u mezangiju ili rjeđe duž periferne kapilarne mreže. Mogu se naći slabije izraženi IgG i IgM depoziti te slabiji ili kodominantni depozit C3. Na EM-i vide se elektronski gusti depoziti u mezangiju (Slika 2). Nalaz SM-e je izrazito varijabilan. IgAN se može histološki očitovati kao mezangioproliferativni glomerulonefritis (MesPGN), fokalni segmentalni glomerulonefritis, difuzni ekstrakapilarni glomerulonefritis s polumjesecima i sklerozirajući glomerulonefritis sa fokalnim skleroziranim segmentima. Promjene u glomerulima mogu biti praćene intersticijskom fibrozom i atrofijom kanalića (30).

Jedna od najstarijih patohistoloških klasifikacija IgAN-e je klasifikacija po Lee-u iz 1982. godine (35). Klasifikacija po Haasu iz 1997. godine koristila je elemente klasifikacije LN-a prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, engl. *World Health Organization*), Međunarodnom društvu za nefrologiju (ISN, engl. *International Society of Nephrology*) i Društvu za bubrežnu nefrologiju (RPS, engl. *Renal Pathology Society*) (35, 39). Klasifikacija po Lee-u bila je subjektivna, a klasifikacija po Haasu nije razlikovala mezangijsku od endokapilarne proliferacije, što se u Oksfordskoj klasifikaciji IgAN-e iz 2009. godine pokazalo pogrešnim, jer su to dva zasebna i neovisna prognostička kriterija. Danas je u uporabi revidirana Oksfordska klasifikacija IgAN-e iz 2016. godine koja boduje pet patohistoloških značajki (M - mezangijska hipercelularnost, E - endokapilarna hipercelularnost, S - segmentalna glomeruloskleroza, T - tubularna atrofija/intersticijska fibroza i C - (engl. *crescent*) celularni polumjeseci koji su neovisni prediktori kliničkog ishoda bolesti (Tablica 1). Patohistološki znakovi aktivne bolesti su mezangijska hipercelularnost, endokapilarna proliferacija i celularni polumjeseci, a znakovi kroničnih promjena glomeruloskleroza, tubularna atrofija i intersticijska fibroza. Na rane aktivne lezije moguće je terapijski djelovati (32-43).

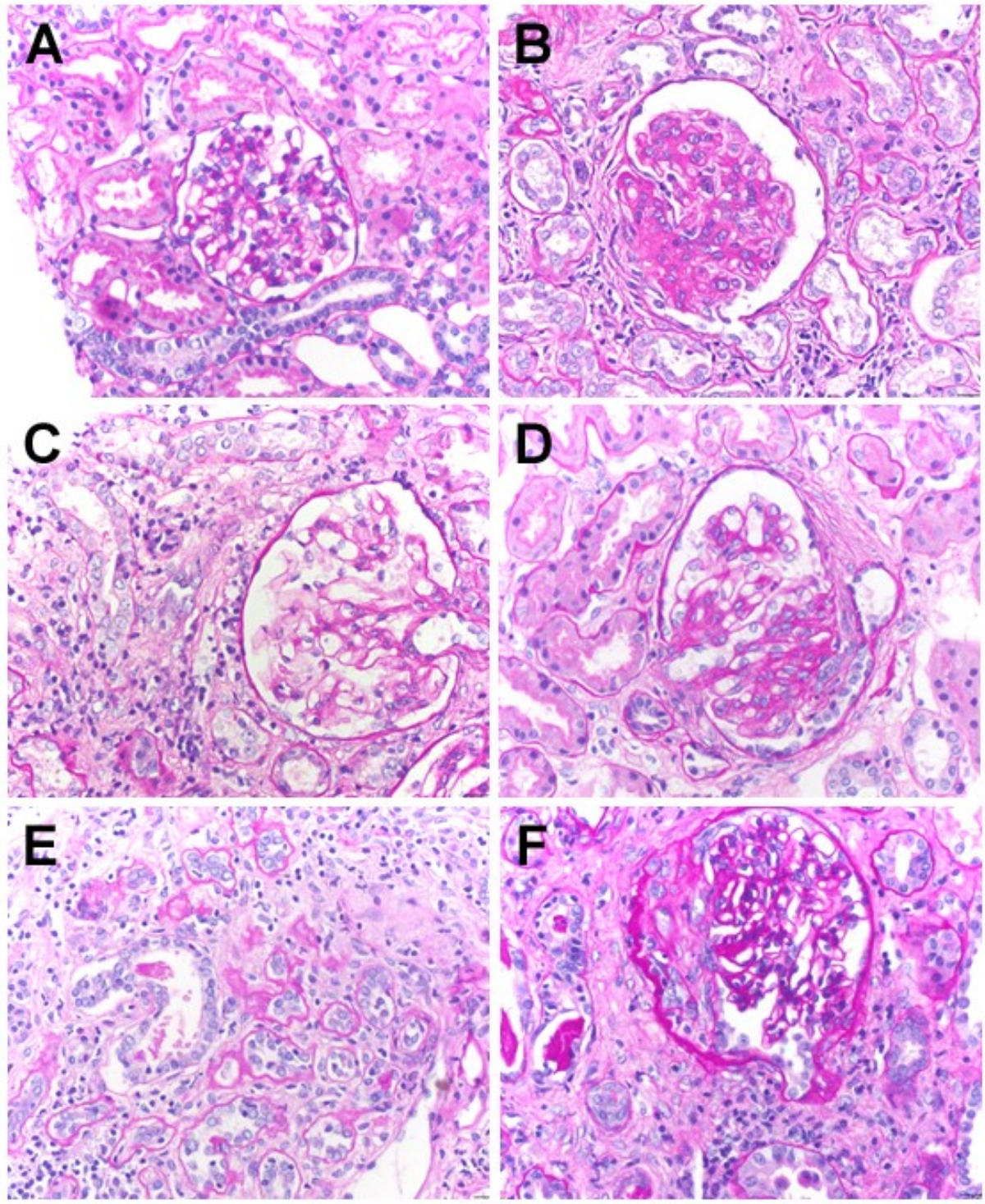


Slika 2. Karakteristični imunofluorescentni obrazac depozita u IgA nefropatiji: u mezangiju jako izraženi IgA (A) i umjereno izražen C3 (B), a negativan IgG (C) i IgM (D) (povećanje 400x). Protutijela su konjugirana fluorescein izotiocijanatom (FITC; zeleno). Gusti depoziti u mezangijskom matriksu (E) (TEM, povećanje 4000x). Autorica zahvaljuje na ustupljenim fotografijama prof. dr. sc. Merici Glavina Durdov i prof. dr. sc. Danici Galešić Ljubanović.

Tablica 1. Revidirana Oksfordska klasifikacija IgA nefropatije iz 2016. godine (32, 35).

OKSFORDSKA KLASIFIKACIJA IgA NEFROPATIJE		
HISTOLOŠKI KRITERIJ	**DEFINICIJA**	**BODOVANJE**
Mezangijska hipercelularnost (M)	četiri ili više mezangijskih stanica po mezangijskom području glomerula	M0 (prisutna u ≤50% glomerula) M1 (prisutna u >50% glomerula)
Endokapilarna hipercelularnost (E)	povećan broja stanica unutar glomerularnih kapilara	E0 (odsutna) E1 (prisutna)
Segmentalna glomeruloskleroza (S)	adhezije/skleroza (segmentalna obliteracija kapilarnog lumena ekstracelularnim matriksom)	S0 (odsutna) S1 (prisutna)
Tubularna atrofija i intersticijska fibroza (T)	procjena kortikalnog područja zahvaćenog tubularnom atrofijom/fibrozom	T0 (0-25% kore) T1 (26-50% kore) T2 (>50% kore)
Polumjeseci (engl. *crescents*) (C)	prisutnost polumjeseca u Bowman-ovu prostoru	C0 (odsutni) C1 (1-24% glomerula) C2 (>25% glomerula)

Histološke promjene koje se vrednuju MEST-C zbrojem po revidiranoj Oksfordskoj klasifikaciji prikazane su na slici 3.



Slika 3. *MEST-C score* po Oksfordskoj klasifikaciji A. normocelularni mezangij (M0); B. hiperplastični mezangij (M1); C. endokapilarna proliferacija (E1); D. segmentalna skleroza (S1); E. intersticijska fibroza i tubularna atrofija >20% površine (T1); F. celularni polumjesec u urinarnom prostoru (C1). (PAS, engl. *periodic acid Schiff* - bojenje, povećanje 400x). Autorica zahvaljuje na ustupljenim fotografijama prof. dr. sc. Merici Glavina Durdov.

U krvi bolesnika s IgAN-om povećana je koncentracija aberantno glikoliziranih IgA1 koji se zbog svoje defektne strukture teže pročišćavaju jetrom i stoga duže ostaju u cirkulaciji. Njihova prisutnost u krvi izaziva stvaranje autoprotutijela IgA i IgG razreda. Cirkulirajući imunokompleksi odlažu se u mezangiju, aktiviraju mezangijske stanice i induciraju proliferaciju i sekreciju ekstracelularnog matriksa, citokina, kemokina i angiotenzina II. Aktiviracijom alternativnog i lektinskog puta komplementa započinje kaskada upalnog odgovora, što sve rezultira glomerularnim oštećenjem. IgA1 sintetiziraju plazma stanice u sluznicama, pa je jedno od mogućih objašnjenja poremećenog imunosnog odgovora u bolesnika s IgAN-om promijenjeni B stanični sluznički odgovor i neravnoteža između Th1 i Th2 stanica (43-49).

Sekretorna IgA protutijela nalaze se u sluznici dišnog, probavnog i urogenitalnog sustava i manje u krvi. Njihova glavna uloga je neutralizacija toksina i bakterija te sprječavanje prodora mikroorganizama u sluznicu i nastanak infekcija. U ljudi postoje dva strukturno različita razreda IgA protutijela: IgA1 i IgA2. IgA1 dominira u sekretu nosne sluznice, suzama, slini, tankom crijevu i serumu. U bolesnika s IgAN-om u IgA1 molekuli nalazi se manje O-vezane galaktoze, te se naziva „slabije glikoliziran IgA1“. Nedovoljna glikolizacija, koja je najvećim dijelom genski uvjetovana, nije dovoljna za razvoj bolesti. Da bi započelo glomerularno oštećenje, potrebna je sinteza autoprotutijela na defektni IgA1, stvaranje cirkulirajućih imunokompleksa i njihovo taloženje u mezangiju (48-53).

IgAN je dijelom genski uvjetovana bolest. Do danas je pronađena povezanost s preko dvadeset genskih lokusa, npr. povezanost s tri lokusa iz glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC, engl. *major histocompatibility complex*) na kromosomu 6p21 i povezanost s genskim lokusom na kromosomu 22q12.2 (17).

Sekundarni oblik IgAN-e, asimptomatski ili s kliničkim simptomima bubrežne bolesti, može se javiti u sklopu Henoch-Schönlein-ove purpure (HSP), Crohn-ove bolesti, infekcije HIV-om, ankilozirajućeg spondilitisa, herpetiformnog dermatitisa, idiopatske trombocitopenije, celijakije i drugih bolesti (50).

IgAN se obično javlja između desete i tridesete godine života. Češća je u muškog spola, u omjeru 2:1, osim u azijskim zemljama gdje su oba spola podjednako zastupljena.

IgAN je višestruko učestalija u Azijata i bijelaca, nego u crnoj rasi (44-47). Epidemiološke analize ukazuju na značajne razlike u incidenciji bolesti u raznim regijama svijeta. Različita učestalost je posljedica neujednačenog stava o indikacijama za biopsiju bubrega, pa se kreće od 5% u središnjoj Africi, 10 - 20% u Europi i Sjevernoj Americi, do 40% u Aziji (48, 50).

IgAN se klinički prezentira mikrohematurijom (30 - 40%), makrohematurijom (70 - 80%), simptomima akutnog nefritičkog sindroma, brzoprogredirajućeg nefritičkog sindroma (10%) te može dovesti do nastanka CKD-a i ESRD-a. Vrlo rijetko se IgAN prezentira AZB (9%) ili NS-om (3 - 7%). Makrohematurija je najčešća klinička manifestacija IgAN-e, obično tijekom infekcije probavnog ili mokraćnog sustava. Rekurentna makrohematurija je relativno česta, u 40 - 50% slučajeva, povezana s infekcijama gornjih dišnih putova, obično akutnim tonzilofaringitisom. Povezanost makrohematurije i upale grla nazvana je sinfaringitički nefritis. Vrlo rijetko epizode makrohematurije mogu biti praćene nastankom AZB zbog opstrukcije tubula eritrocitnim cilindrima. U 30 - 40% slučajeva IgAN je asimptomatska i otkrije se slučajno prilikom rutinske analize mokraće, kakve su česte u azijskim zemljama. Laboratorijskom pretragom tipično se nalazi mikroskopska hematurija. U nekih bolesnika IgAN se otkrije kasno, kad su već prisutne uznapredovale kronične bubrežne promjene. Prediktori lošeg ishoda su visoka razina serumskog kreatinina u času otkrivanja bolesti, proteinurija veća od 1 grama/dan, arterijska hipertenzija, trajna mikrohematurija, odsutnost epizoda recidivirajuće makrohematurije, starija životna dob, muški spol, debljina i pušenje (30, 33, 38-45).

U polovice bolesnika se u laboratorijskim nalazima nalazi povišen serumski IgA, najčešće tip IgA1. Proteinurija je obično neselektivna, a C3 i C4 komponente komplementa u serumu uredne (30).

IgAN se liječi neimunosupresinim lijekovima i imunosupresijom. U ne-imunosupresivnu terapiju spadaju inhibitori angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE, engl. *angiotensin-converting-enzyme*) i blokatori angiotenzinskih receptora (ARBs, engl. *angiotensin receptor blockers*). U imunosupresivnu terapiju spadaju glukokortikoidi, ciklofosfamid, azatioprim, ciklosporin, mikofenolat mofetil i rituximab.

Neliječena IgAN može imati različit tijek, od sporo napredujuće bolesti do brzo progresivnog bubrežnog zatajenja, što je povezano s patološkim nalazom. U većine bolesnika

nakon akutne faze bolesti dolazi do remisije i oporavka bubrežne funkcije. Kako je bolest kronična i klinički često podmuklog tijeka, za dvadeset godina približno 20 - 30%, a po nekim autorima 30 - 50% bolesnika razvije ESRD (30, 33, 38, 51). Desetogodišnje bubrežno preživljenje u djece je 90% (52). Mogućnost liječenja u fazi ESRD-a podrazumijeva nadomještanje bubrežne funkcije metodama peritonejske dijalize ili hemodijalize, odnosno transplantaciju bubrega. Nažalost se u 40 - 60% oboljelih nakon transplantacije bubrega javlja povratak IgAN-e u presatku. (38, 53).

1.3. Vitamin D

Blagotvorni učinak Sunčevih zraka na zdravlje ljudi poznavali su još stari Grci. Prvi opisi rahitisa potječu iz XVII. stoljeća. Tri stoljeća kasnije, 1928. godine njemački kemičar Adolf Windaus identificirao je vitamin D, kemijski spoj steroidne strukture, za što je dobio Nobelovu nagradu (54).

Uloga vitamina D utvrđena je u homeostazi kalcija, fosfora te u koštanom metabolizmu. Otkrićem VDR-a i metabolizirajućih enzima vitamina D koji se nalaze u raznim stanicama, dokazana je pleiotropna uloga vitamina D u regulaciji kardiovaskularnog sustava, prevenciji zloćudnih bolesti, otpornosti na infekcije, u imunomodulaciji te općenito u smanjenju smrtnosti (55-57). Time je interes za vitamin D jako porastao, posebice u zadnjem desetljeću.

1.3.1. Metabolizam vitamina D

Dva su osnovna egzogena oblika vitamina D, vitamin D2 (ergokalciferol) i vitamin D3 (kolekalciferol). Iz povijesnih razloga D vitamin svrstava se među vitamine topljive u mastima, iako je po svojoj steroidnoj strukturi i većini obilježja zapravo hormon.

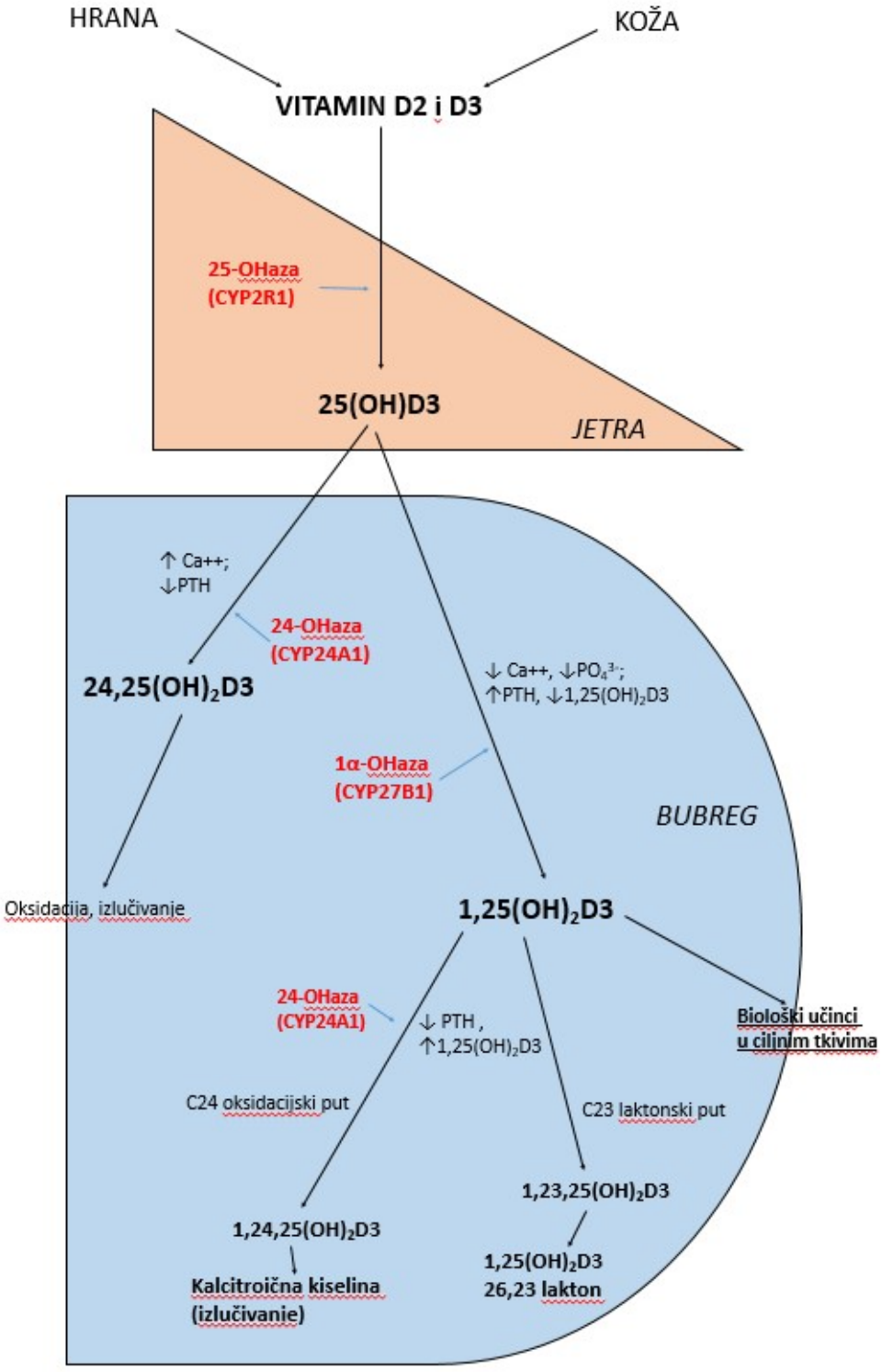
Vitamin D2 nastaje u biljkama izlaganjem sterola ultraljubičastim zrakama, a čovjek ga unosi hranom pa su tako neke jestive gljive bogati izvor D2. Vitamin D2 u hrani je biološki neaktivan, u tankom crijevu prelazi u enterocite, pa u hilomikrone i limfom do jetre. Glavnina

vitamina D3 (80 - 90%) potječe iz kože gdje se sintetizira iz 7-dehidrokolesterola pod utjecajem ultraljubičastog B zračenja (290 - 315 nm), a manji dio (10 - 20%) unosi se hranom (riblje ulje i jetra, meso, mlijeko i mliječni proizvodi, žumanjak). Vitamin D3 nastao u dermisu i D3 unešen hranom biološki su neaktivni. Protein vezan za vitamin D (DBP, engl. *vitamin D binding protein*) prenosi ga krvlju i limfom u jetru.

D2 i D3 se aktiviraju hidroksilacijom u jetri na položaju 25 i nakon toga im je metabolički put isti. Bubreg je ključni organ u metabolizmu vitamina D, primarno za održavanje normokalcemije (Slika 4) (57, 58).

Nakon prve hidroksilacije u jetri, djelovanjem mitohondrijskog enzima 25-OHaze (CYP2R1) nastaje 25(OH)D3 (kalcidiol), glavni cirkulirajući oblik vitamina D. Druga hidroksilacija zbiva se u epitelu proksimalnih bubrežnih kanalića i to na prvom ugljikovom atomu pod djelovanjem mitohondrijskog enzima 1α-OHaze (CYP27B1). Nastali $1,25(OH)_2D3$ (kalcitriol) je biološki aktivni oblik vitamina D koji ima 500 - 1000 puta veću aktivnost od kalcidiola (59). Njegova sinteza je strogo kontrolirana i potiče je paratiroidni hormon (PTH), a koče ioni kalcija, fosfora i kalcitriol povratnom spregom, putem inhibicije sinteze PTH-a i inhibicije aktivnosti 1α-OHaze.

Osim toga, kalcidiol i kalcitriol se inaktiviraju u bubregu. Mitohondrijski enzim 24-OHaza (CYP24A1) katalizira pretvorbu kalcidiola u manje aktivni metabolit $24,25(OH)_2D3$, a kalcitriola u $1,23,25(OH)_3D3$ i $1,24,25(OH)_3D3$, čime dolazi do progresivnog gubitka njegove biološke aktivnosti. 24-OHaza (CYP24A1) se nalazi u ciljnim tkivima vitamina D i izravno je regulirana VDR-om, a njenu aktivnost potiče kalcitriol (59, 60).



Slika 4. Shematski prikaz metabolizma vitamina D2 i D3.

1.3.2. 25-hidroksivitamin D 1α-hidroksilaza; 1α-OHaza; CYP27B1

Mitohondrijski enzim 1α-OHaza kodirana je genom CYP27B1. To je sintetizirajući enzim vitamina D koji regulira razinu biološki aktivne forme, kalcitriola. Iako je primarno bubrežni enzim smješten na unutrašnjoj strani membrane mitohondrija epitela proksimalnih kanalića, ima ga u ostalim dijelovima nefrona, kao i drugdje (pluća, koža, limfni čvor, crijeva, prostata, makrofagi i dendritičke stanice) (57, 61, 62).

1.3.3. Vitamin D3 24-hidroksilaza; 24-OHaza; CYP24A1

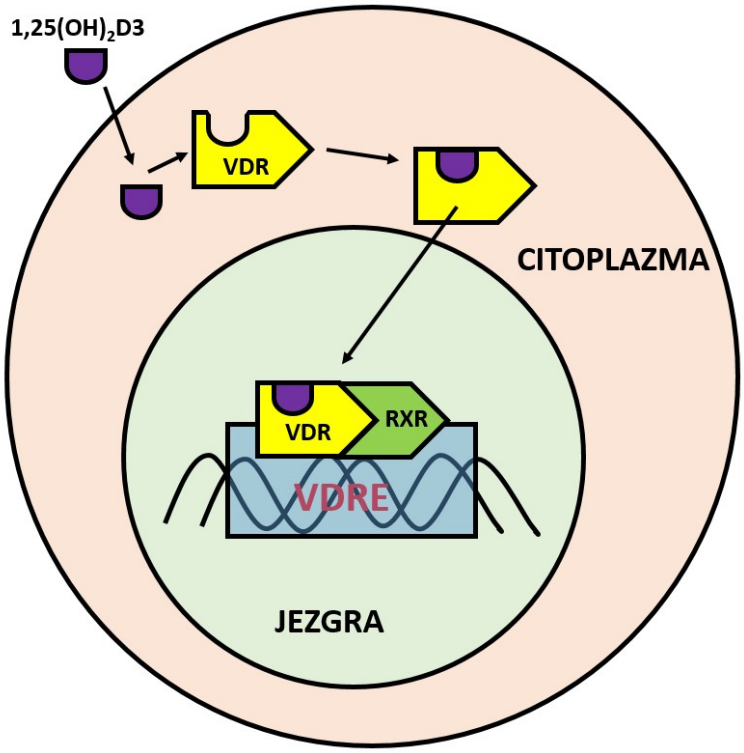
Glavni katabolički enzim vitamina D, CYP24A1 je mitohondrijski enzim koji pokreće razgradnju kalcitriola, što dovodi do gubitka njegove biološke aktivnosti. CYP24A1 se nalazi u stanicama gotovo svih tkiva i izravno je reguliran VDR-om. Njegovu aktivnost potiče kalcitriol. Katabolička uloga CYP24A1 potvrđena je i u eksperimentalnim modelima na *knockout* miševima (63-65).

1.3.4. Receptor vitamina D (VDR)

Receptor vitamina D je iz obitelji receptora za steroidne hormone, kodiran genom za VDR (Slika 5) (66). Kalcitrol ostvaruje učinke vezanjem za VDR koji se nalazi u jezgri, citoplazmi, mitohondrijima ili membrani stanica gotovo svih tkiva. Upravo je otkriće VDR-a doprinijelo saznanju o raznolikim biološkim ulogama vitamina D.

Gen za VDR izražen je u svim stanicama. Smatra se da je oko 3% ljudskoga genoma pod kontrolom vitamina D i time objašnjavaju izvanskeletni učinci vitamina D. Aktivnost vitamina D nakon vezanja za VDR ostvaruje se preko genomskog i negenomskog učinka. Spori genomski učinci slijede vezanjem vitamina D na VDR u jezgri. Kompleks vitamina D i VDR-a potiče heterodimerizaciju s retinoidnim X-receptorom (RXR, engl. *retinoid X receptor*), translokaciju u jezgru, vezanje na DNA (engl. *deoxyribonucleic acid*) i transkripciju ili represiju gena i susljednu sintezu proteina. Brzi negenomski učinci nastaju vezanjem za membranski VDR. To dovodi do aktivacije sustava drugih glasnika ili

fosforilacije intracelularnih proteina, uzrokuje aktivaciju intracelularnih enzima ili ionskih kanala i time modulira staničnu aktivnost (65-67).



Slika 5. Shematski prikaz receptora vitamina D (VDR). RXR - engl. *retinoid X receptor*; VDRE - engl. *vitamin D response elemet.*

1.3.5. Nedostatak vitamina D

Prema novijim spoznajama je prevalencija manjka vitamina D u odrasloj dobi visoka, u nekim sredinama čak 50%. Pretile osobe su pod povećanim rizikom od nedostatka vitamina D jer se razina kalcidiola u serumu smanjuje s porastom udjela masnog tkiva (68). Brojni čimbenici utječu na serumsku razinu vitamina D. U rizične čimbenike hipovitaminoze spadaju dojenačka i starija životna dob, oštećena funkcije jetre i bubrega, malapsorpcija masti, smanjena izloženost Suncu, veći sadržaj melanina u koži, prehrambene navike i drugo. (69, 70).

U krvi je 80 - 90% kalcidiola vezan za DBP, pa se kao indikator statusa vitamina D određuje kalcidiol vezan na DBP. Vrijeme poluživota kalcidiola je dva do tri tjedna, a kalcitriol ima vrijeme poluživota četiri sata i mnogo veću fluktuaciju razine u serumu. Podjeljena su mišljenja koja je dovoljna razina vitamina D u organizmu (Tablica 2). Najniža koncentracija kalcidiola koja omogućuje učinkovitu apsorpciju kalcija u crijevima i inhibiciju porasta PTH-a je 75 nmol/L (30 ng/ml). Koncentracija kalcidiola između 50 i 75 nmol/L (20 - 30 ng/ml) smatra se nedovoljnom jer ima negativni učinak na mineralnu gustoću kostiju i potencijalno negativan učinak na mišićnu snagu. Vrijednosti manje od 50 nmol/L (20 ng/ml) uglavnom su udružene s povišenim vrijednostima PTH-a (70, 71).

Tablica 2. Status vitamina D prema serumskim koncentracijama 25(OH)D3 (70, 71).

25(OH)D3	**nmol/L**	**ng/ml**
suficijencija	≥50 (≥75)	≥20 (≥30)
insuficijencija	30-49,9 (50-74,9)	12-19,9 (20-29,9)
deficijencija	<30 (<50)	<12 (<20)

Preporuka američkog Instituta za medicinu. U zagradama su preporuke Američkog društva za endokrinologiju, Američkog društva za gerijatriju i Međunarodne zaklade za osteoporozu.

Manjak vitamina D uzrokuje smanjenje apsorpcije kalcija i fosfata u crijevima. Nastala hipokalcemija dovodi do sekundarnog hiperparatiroidizma koji uzrokuje demineralizaciju kostiju i fosfaturiju, te konačno rahitis u djece i osteomalaciju u odraslih. Radi se uglavnom o bolesnicima s razinom kalcidiola ispod 25 nmol/L. Danas su te bolesti relativno rijetke. Supklinički deficit vitamina D povezan je s nastankom osteoporoze i visoke učestalosti prijeloma kostiju (72). Razina kalcidiola u serumu iznad 250 nmol/L je hipervitaminoza, a toksična je koncentracija veća od 375 nmol/L (73).

U slučaju eventualnog nedostatka Sunčevog svjetla, prehrana i suplementacija analozima vitamina D postaju jedini izvori vitamina D. Međutim, ograničen broj namirnica prirodno sadrže taj vitamin i to u malim količinama. Stoga se ne može isključivo prehranom

omogućiti unos vitamina D u preporučenoj količini. U sve više zemalja hrana se industrijski obogaćuje dodavanjem ergokalciferola i kolekalciferola (74).

1.3.6. Izvanskeletni učinci vitamina D

Djelovanjem vitamina D na makrofage i monocite očituje se modulacija prirođene imunosti koja je prva obrambena crta protiv mikroorganizama. Preko TLR-liganda (engl. *Toll-like receptor ligand*) kao što su lipopolisaharidi mikroorganizama koji se vežu na Toll receptore makrofaga, dolazi do njihove aktivacije, indukcije 1α-OHaze i sinteze kalcitriola. Autokrino stvoreni kalcitriol veže se preko VDR-a na osjetljivi element na odgovarajućem genu kao dimer s RXR-om i dovodi do transkripcije ciljnog gena. *De novo* sintetizirani proteini, kao što su β2 defenzin i aktivni antimikrobni peptid kathelicidin pojačavaju antimikrobnu učinkovitost. Nedostatak D vitamina povezan je s povećanom sklonošću infekcijama (55, 75, 76). Povezanost niske koncentracije vitamina D s većom osjetljivošću na infekciju dokazana je i u epidemiološkim studijama (77).

Nedostatak vitamina D može pridonijeti nastanku zloćudnih bolesti. Prema Chung i suradnicima, s porastom koncentracije kalcidiola za svakih 10 nmol/L, rizik od karcinoma kolona pada za 6%, što autori objašnjavaju njegovim antiproliferacijskim djelovanjem (78). Vitamin D djeluje na mnoge komponente kardiovaskularnog sustava, uključujući regulaciju krvnog tlaka i RAAS-a. Dvije studije su pronašle značajno nižu razinu kalcitriola u ispitanika s povišenim sistoličkim tlakom (79, 80). Wang i sur. dokazali su povezanost između nedostatka vitamina D i veće incidencije koronarne bolesti srca i moždanog udara (81).

1.3.7. Vitamin D i autoimune bolesti

Iako se intenzivno istražuju učinci vitamina D na imunološki sustav, mehanizmi povoljnih učinaka nisu do kraja razjašnjeni.

Kalcitriol kao steroidni hormon modulira izražaj brojnih gena. Više od 900 gena su pod utjecajem kalcitriola i stanice gotovo svih tkiva imaju VDR. Vežući se za VDR, vitamin D regulira izražaj gena uključenih u diferencijaciju, proliferaciju i imunomodulaciju stanica.

Mitohondrijska 1α-OHaza je izražena u različitim stanicama (makrofagi, dendritičke stanice, keratinociti, glatke mišićne stanice krvnih žila, kardiomiociti, beta-stanice gušterače, stanice debelog crijeva, mozga, dojke i prostate) što omogućava ekstrarenalno i autonomno stvaranje kalcitriola koje je neovisno o PTH-u i ograničeno samo bioraspoloživošću kalcitriola (60, 75). Imunomodulacijska uloga D vitamina u stečenoj imunosti očituje se njegovim inhibitornim djelovanjem na limfocite T i B i antigen prezentirajuće dendritičke stanice. U većini imunosnih stanica nalazi se intracelularni VDR. Naivni limfociti nemaju VDR, ali ga izražavaju prilikom aktivacije. Kalcitriol inhibira sazrijevanje i diferencijaciju dendritičkih stanica, što posredno smanjuje poticaj T limfocita na proliferaciju. Smanjuje se produkcija citokina u dendritičkim stanicama, te broj Th1 i Th17 limfocita skretanjem naivnih T limfocita prema Th2 fenotipu. S druge strane, pojačano se oslobađaju kemokini i protuupalni citokin IL-10, koji su uključeni u diferencijaciju T regulatornih stanica važnih za toleranciju vlastitih antigena. Time se objašnjava povezanost nedostatka vitamina D s autoimunim procesima (55, 76).

Modulacija funkcije dendritičkih stanica posredovana kalcitriolom utječe na regulaciju staničnog i humoralnog imunosnog odgovora. Kalcitriol direktno inhibira B staničnu proliferaciju, diferencijaciju u plazma stanice i sekreciju imunoglobulina IgG i IgM, te inducira njihovu apoptozu (55, 75, 76).

Epidemiološke studije dokazale su povezanost niske razine vitamina D s razvojem autoimunih bolesti (77). Istraživanje na više od 7 milijuna američkih regruta dokazalo je da su regruti sa serumskom razinom kalcidiola nižom od 50 nmol/L imali dva puta veći rizik od razvoja multiple skleroze (82). U brojnim istraživanjima uočena je povezanost nedostatka vitamina D s većom incidencijom šećerne bolesti ovisne o inzulinu. Incidencija bolesti se smanjuje supstitucijom vitamina D u ranom djetinjstvu (83, 84). U bolesnika s upalnim bolestima crijeva i autoimunim hepatitisom također su dokazani blagotvorni učinci vitamina D (85, 86). Vitamin D igra važnu ulogu u patogenezi sistemskog eritemskog lupusa i poboljšava klinički ishod (87). Značajno kliničko poboljšanje u bolesnika s reumatoidnim artritisom liječenih vitaminom D ukazuje na njegov imunomodulacijski potencijal (88).

Autoimune bolesti nastaju kad organizam reagira neadekvatnim imunološkim odgovorom posredovanim T stanicama protiv vlastitih tkiva. Kalcitriol, biološki aktivni oblik

vitamina D modulira odgovor T stanica i regulira sintezu kemokina, citokina i interleukina. Na taj način suzbija autoimunu upalu i potiče diferencijaciju stanica imunološkog sustava. Adekvatan unos vitamina D od intrauterinog razdoblja do adolescencije može smanjiti rizik od nastanka autoimunih bolesti (89, 90).

2. HIPOTEZE ISTRAŽIVANJA

1. U Južnoj Hrvatskoj u zadnjem desetljeću je najčešća indikacija za biopsiju bubrega u djece nefrotski sindrom, a jedna od najčešćih glomerulopatija je IgAN.

2. Izražaj VDR-a i 1α-OHaze je smanjen u bubrežnom tkivu bolesnika s IgAN-om u odnosu na kontrolnu skupinu.

3. Izražaj CYP24A1 je povećan u buburežnom tkivu bolesnika s IgAN-om u odnosu na kontrolnu skupinu.

4. Izražaj VDR-a, 1α-OHaze i CYP24A1 je različit u bubrežnom tkivu odraslih i djece s IgAN-om.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

1. Usporediti kliničku prezentaciju bubrežnih bolesti s patološkim nalazima u djece podvrgnute perkutanoj bubrežnoj biopsiji od 2008 - 2017. godine iz područja Južne Hrvatske i rezultate usporediti s prethodnim desetogodišnjim razdobljem.

2. Usporediti imunohistokemijski izražaj VDR-a, 1α-OHaze i CYP24A1 u glomerulima, proksimalnim i distalnim kanalićima u bioptatu bolesnika s IgAN-om s kontrolom.

3. Utvrditi razliku u izražaju VDR-a, 1α-OHaze i CYP24A1 u bubrežnim bioptatima djece i odraslih bolesnika s IgAN-om.

4. Istražiti raspodjelu i intenzitet VDR-a, 1α-OHaze i CYP24A1 u zdravom tkivu i tkivu bubrega koji je izmjenjen zbog utjecaja bolesti.

5. Utvrditi povezanost izražaja VDR-a, 1α-OHaze i CYP24A1 s procijenjenom glomerularnom filtracijom (eGFR, engl. *estimated glomerular filtration rate*).

4. ISPITANICI I POSTUPCI

4.1. Ispitanici i uzorci

Istraživanje je provedeno sukladno odobrenju Etičkog povjerenstva Kliničkog bolničkog centra Split (KBC) (ur. br. 2181-147-01/06/M.S.-19-2 i 2181-147-01/06/M.S.-31-03). U epidemiološko istraživanje su uključena 54 ispitanika dječje dobi kojima je urađena perkutana bubrežna biopsija u Klinici za dječje bolesti KBC Split od 2008 - 2017. godine. Isključeni su slučajevi s rebiopsijom bubrega, biopsijom bubrežnog transplantata, oboljeli od trombotične trombocitopenične purpure (TTP) i hemolitičko-uremijskog sindroma (HUS). Indikacije za biopsiju bubrega bile su: NS, nefrotska proteinurija s hematurijom, nefritički sindrom s proteinurijom nefrotskog ranga, IH, AZB, CKD i akutni nefritički sindrom s perzistentnom proteinurijom koja nije nefrotskog ranga. Bioptički uzorci su analizirani SM-om, IF-om i EM-om. U imunofluorescenciji rabljeni su poliklonski antiserumi na IgA, IgG, IgM, C1q, C3, C4, kappa lake lance, lambda lake lance, albumin i fibrinogen. EM analza bila je urađena u KB Dubrava ili na Medicinskom fakultetu u Zagrebu. Dva patologa neovisno su pregledali histološke preparate. U ispitanika s IgAN-om određen je MEST-C skor prema revidiranoj Oksfordskoj klasifikaciji. Nalazi perkutanih bubrežnih biopsija iz razdoblja 2008 – 2017. godine uspoređeni su s nalazima iz 1995 - 2005. godine iz iste ustanove (91).

Iz arhive Kliničkog zavoda za patologiju, sudsku medicinu i citologiju prikupljeni su parafinski blokovi perkutane bubrežne biopsije 12 bolesnika s IgAN-om, bioptiranih u Klinici za dječje bolesti (šestero djece) i Zavodu za nefrologiju i hemodijalizu (šestero odraslih) od 1996 - 2016. godine. Iz povijesti bolesti prikupljeni su laboratorijski podaci u vrijeme biopsije. U kontrolnoj skupini je pet ispitanika koji su 2018. godine podvrgnuti nefrektomiji zbog svijetlostaničnog karcinoma bubrega, pri čemu je analizirano zdravo bubrežno tkivo periferno od tumora. Kriterij isključenja bila je pozitivna anamneza na parenhimne bolesti bubrega. U svim slučajevima perkutana bubrežna biopsija izvedena je bioptičkom iglom, pod ultrazvučnim nadzorom s pomoću automatskog uređaja na okidanje. Dobiveni cilindri tkiva su podijeljeni za SM-u, IF-u i EM-u, obrađeni na standardni način i analizirani te postavljena zaključna patološka dijagnoza. Kriterij isključenja bio je manjak tkiva za imunohistokemijsku

analizu. U kontrolnoj skupini, od početnih osam uzoraka, tri su naknadno isključena zbog uočenih patoloških promjena i naknadno dobivenog podatka o hiperglikemiji (92).

4.1.1. Obrada prikupljenih uzoraka

Preparati za imunohistokemijsko bojenje debljine 5 μm su izrezani iz parafinskog bloka standardnim postupkom. Nakon deparafinizacije i rehidracije kratko su isprani destiliranom vodom. Demaskiranje antigena urađeno je u citratnom puferu (pH 6,0) pri 95°C kroz 12 minuta u mikrovalnoj pećnici. Nakon hlađenja do sobne temperature, priređena stakalca su podvrgnuta imunohistokemijskim bojenjima.

U istraživanju su korištena sljedeća primarna protutijela: mišje monoklonalno protu-VDR (D-6) (sc13133, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, SAD; razrjeđenje 1:50); ovčje poliklonsko protu-1α-OHaze (PC 290, The Binding Site Group Ltd., Birmingham, Velika Britanija; 1:100) i kozje poliklonalno protu-CYP24A1 (sc-32165, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, SAD; razrjeđenje 1:100), te odgovarajuća sekundarna protutijela: magareće protu-kozje IgG (H+L) Alexa Fluor 488 konjugirano protutijelo (razrjeđenje 1:400, 705-545-003; Jackson Immuno Research Laboratories, SAD), magareće protu-ovčje IgG H+L Alexa Fluor® 488 (ab150177, Abcam, Cambridge, Velika Britanija; razrjeđenje 1:400) ili Alexa Fluor® 488 konjugirano magareće protu-mišje lgG (H+L) (715-545-150; Jackson Immuno Research Laboratories, SAD; razrjeđenje 1:400) (Tablica 3).

Primarnim protutijelima razrijeđenim u fosfatnom puferu (PBS, engl. *phosphate buffered saline*) prekriveni su pripremljeni rezovi tkiva, inkubirani preko noći u vlažnoj komori na sobnoj temperaturi i isprani PBS-om. Isprani rezovi su prekriveni razrijeđenim sekundarnim protutijelom, inkubirani u vlažnoj komori jedan sat i isprani PBS-om. Potom je pozadina obojena s 4′,6-diamidino-2-phenylindol-om (DAPI).

Tablica 3. Primarna i sekundarna protutijela

	Protutijelo	Kataloški broj	Domaćin	Razrjeđenje	Proizvođač
Primarna	protu-VDR (D-6)	sc13133	mišje monoklonalno	1:50	Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, SAD
	protu-1α-OHaze	PC 290	ovčje poliklonsko	1:100	The Binding Site Group Ltd, Birmingham, Velika Britanija
	protu-CYP24A1	sc-32165	kozje poliklonalno	1:100	Santa Cruz Biotechnology Inc, CA, SAD
Sekundarna	Alexa Fluor®488 - konjugirano protu-mišje lgG (H+L)	715-545-150	magareće	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories
	Alexa Fluor®488 - konjugirano protu-kozje lgG (H+L)	705-545-003	magareće	1:400	Jackson Immuno Research Laboratories
	Alexa Fluor® 488 - konjugirano protu-ovčje IgG (H+L)	ab150177	magareće	1:400	Abcam, Cambridge, Velika Britanija

4.1.2. Mikroskopska analiza obojenih preparata

Preparati su pregledani fluorescencijskim mikroskopom (BX51, Olympus, Tokio, Japan), fotografirani na povećanju ×400 DP71 hlađenom digitalnom kamerom (Olympus) i obrađeni pomoću CellA Imaging Software (Olympus Life Sciences Microscopy, Tokio, Japan). Mikrofotografije su obrađene pomoću softvera Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Pozadinski signal za crvenu fluorescenciju oduzet je od originalne mikrofotografije, a zatim je primijenjen filtar medijana radijusa 5,0 piksela. Pragovi su naknadno određeni algoritmom "Triangle" (za CYP24A1) ili "Default" algoritam (za 1α-OHazu i VDR).

Na obrađenim slikama izmjereno je područje postotka fluorescencije. Glede jake nuklearne imunoreaktivnosti CYP24A1, analiziran je postotak imunoreaktivnih jezgara. Prebrojan je broj ukupnih DAPI pozitivnih i CYP24A1 imunoreaktivnih jezgara, te je izražen postotak imunoreaktivnih jezgara CYP24A1 u glomerulima, proksimalnim i distalnim kanalićima.

4.2. Statistički postupci

Hi-kvadrat test korišten je za određivanje statističkih razlika između analiziranih razdoblja, 1995 - 2005. i 2008 - 2017. godine. Meadova jednadžba resursa korištena je za procjenu veličine uzorka i prema njoj tri skupine (odrasli, djeca i kontrolna skupina), optimalno trebaju imati između 13 i 23 uzorka. Sa 17 uzoraka studija ima dovoljnu snagu. Za statističke analize korišten je softver Past4 (93). Nije uočena značajna razlika u izražaju izmjerenih varijabli između uzoraka bubrega odraslih i djece s IgAN-om. Stoga su testirani kao jedna skupina. Za analizu razlike između kontrolne skupine i skupine bolesnika s IgAN-om, korišten je T-test za nejednake varijance. Pearsonov koeficijent korelacije izračunat je između izražaja VDR-a, 1α-OHaze, CYP24A1 i eGFR-a. Statistička značajnost bila je na razini razlike pri $P < 0,05$.

5. REZULTATI

5.1. Kliničke indikacije za biopsiju bubrega u djece s raspodjelom patoloških dijagnoza od 2008 - 2017. godine

Od 231 hospitaliziranih bolesnika s bolestima glomerula i tubuloinersticija u Klinici za dječje bolesti KBC Split od 2008 - 2017. godine, u 54 (23,38%) je učinjena biopsija bubrega. Prosječna dob bioptirane djece bila je 9,84 godine (raspon 1 - 18 godina). Među bioptiranima je 29 muškog spola (54%) i 25 ženskog spola (46%).

Nefrotski sindrom bio je najčešći razlog za biopsiju bubrega, u 25,93% slučajeva. Ne-nefrotska proteinurija s hematurijom bila je zastupljena u 22,22% biopsija. Nefritički sindrom s nefrotskom proteinurijom bio je indikacija u 18,52% slučajeva, a IH u 16,67% bioptiranih (Slika 6 A-D). AZB utvrđeno je u 7,41%, dok je CKD u 5,56% slučajeva. Akutni nefritički sindrom i ne-nefrotska proteinurija bile su relativno rijetke indikacije za biopsiju bubrega, s udjelom od 1,85% svaki.

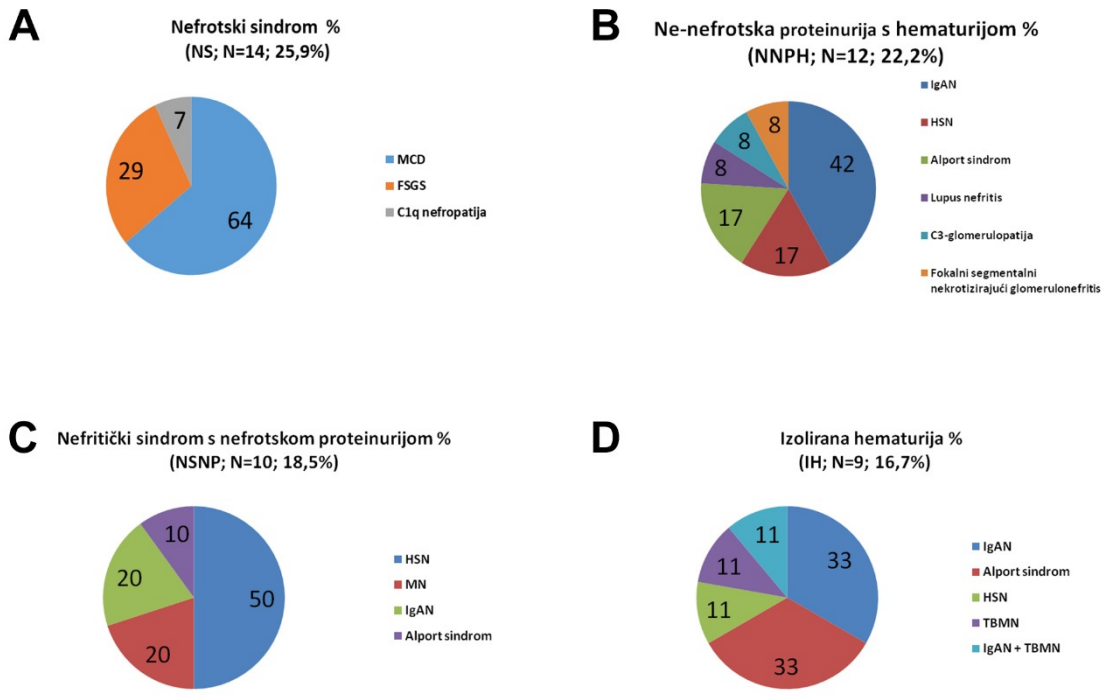
Od 14 bolesnika s NS-om, devet (64,28%) je imalo MCD, četiri (28,57%) fokalnu segmentalnu glomerulosklerozu (FSGS, engl. *focal and segmental glomerulosclerosis*), dok je C1qN bila prisutna u jednog (7,14%) bolesnika (Slika 6A).

Od 12 bolesnika s ne-nefrotskom proteinurijom i hematurijom, pet (41,66%) je imalo IgAN-u, dvoje (16,66%) HSPN, dvoje (16,66%) AS, jedan (8,33%) LN, jedan (8,33%) C3GN i jedan (8,33%) fokalni segmentalni nekrotizirajući glomerulonefritis (FSNGN, engl. *focal segmental necrotizing glomerulonephritis*) (Slika 6B).

Od 10 bolesnika s nefritičkim sindromom i nefrotskom proteinurijom, pet (50%) je imalo HSPN, dvoje (20%) MGN, dvoje (20%) IgAN-u, dok je AS bio prisutan u jednom (10%) slučaju (Slika 6C).

Od devetero ispitanika s IH-om, IgAN-u je imalo troje (33,33%), AS je dijagnosticiran u tri (33,33%), dok je jedan (11,11%) ispitanik imao HSPN, jedan (11,11%) TBMN, i jedan (11,11%) IgAN-u i TBMN (Slika 6D).

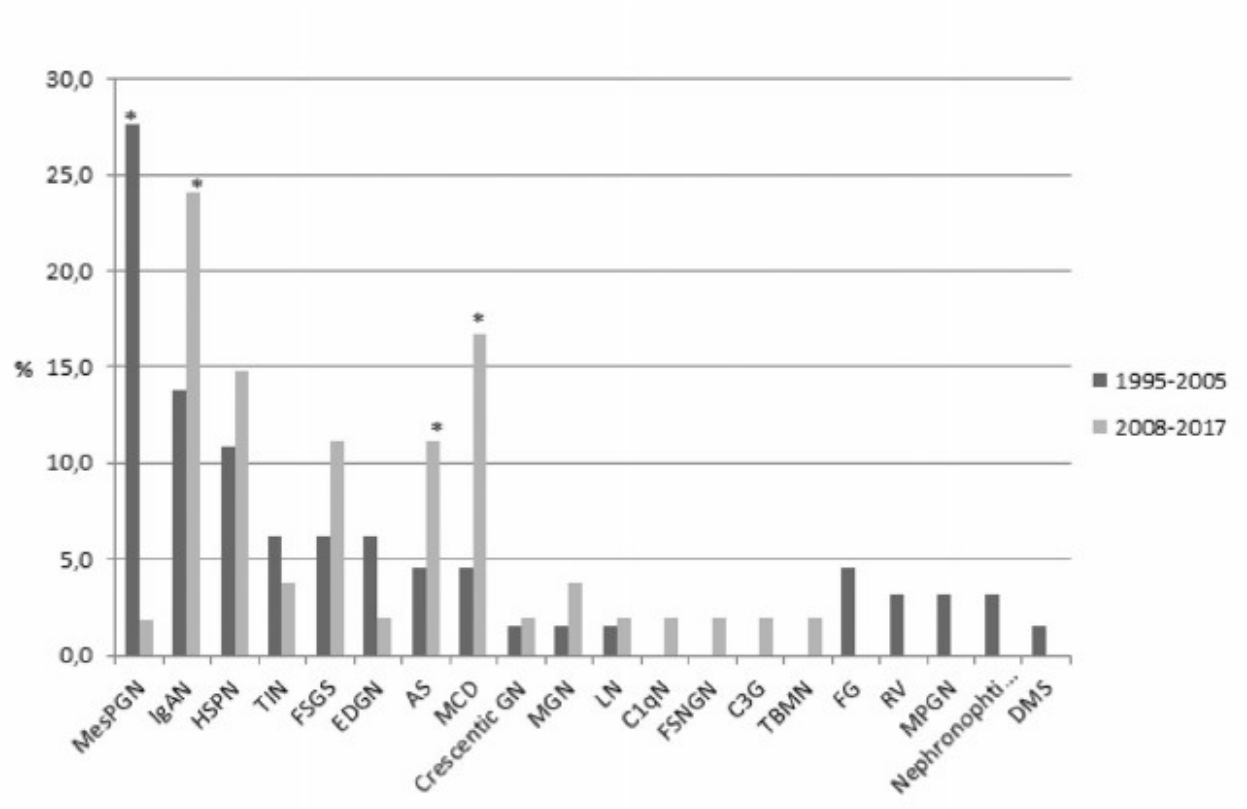
Četvero ispitanika imali su AZB. Tubulointersticijski nefritis (TIN) je dijagnosticiran u dva sličaja, brzo progresivni glomerulonefritis (RPGN; glomerulonefritis s polumjesecima) i postinfekcijski glomerulonefritis (PIGN) u po jednom slučaju. Tri ispitanika s CKD-om imala su: IgAN-u, FSGS, te FSGS i TIN. Jedan ispitanik s ne-nefrotskom proteinurijom imao je MesPGN. Jedan ispitanik s akutnim nefritičkim sindromom imao je IgAN-u.



Slika 6. Najčešće kliničke indikacije za biopsiju bubrega u djece i patološki nalazi od 2008 - 2017. godine u KBC-u Split. MCD - bolest minimalnih promjena; FSGS - fokalna segmentalna glomeruloskleroza, IgAN - IgA nefropatija; HSN - Henoch-Schönlein nefritis; MN -membranski glomerulonefritis; TBMN - nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana.

5.2. Usporedba patoloških nalaza perkutane bubrežne biopsije u djece u analiziranom i prethodnom razdoblju

Urađena je usporedba raspodjele patoloških dijagnoza u analiziranom razdoblju 2008 – 2017. u odnosu na prethodno razdoblje 1995 – 2005. Utvrđen je značajan porast učestalosti IgAN-e, MCD-a i AS-a od 2008 - 2017. godine u odnosu na prethodno analizirano razdoblje od 1995 - 2005. ($P < 0,05$). Nije bilo značajnih razlika u pojavnosti HSPN-a i FSGS-e. MesPGN je značajno niži ($P < 0,05$), dok je PIGN imao trend smanjenja koji nije statistički značajan (Slika 7).



Slika 7. Usporedba patohistoloških dijagnoza u dva vremenska razobla, 1995 - 2005. i 2008 - 2017. MesPGN - mezangijski proliferativni glomerulonefritis; IgAN - IgA nefropatija; HSPN - Henoch-Schönlein purpura nefritis, TIN - tubulointersticijski nefritis; FSGS - fokalna segmentalna glomeruloskleroza; EDGN (PIGN) - postinfekcijski glomerulonefritis; AS - Alportov sindrom; MCD - bolest minimalnih promjena; Crescentic GN - glomerulonefritis s polumjesecima; MGN - membranski glomerulonefritis; LN - lupusni nefritis; C1qN - C1q nefropatija; FSNGN - fokalni segmentalni nekrotizirajući glomerulonefritis; C3G - C3 glomerulonefritis; TBMN - nefropatija tankih glomerularnih bazalnih membrana; FG - fibrilarni glomerulonefritis; RV – engl. *renal vasculitis*; MPGN - membranoproliferativni glomerulonefritis; Nephronophtisis - nefronoftiza; DMS - difuzna mezangijska skleroza.

5.3. Imunohistokemijska analiza VDR-a, 1α-OHaze i CYP24A1 u bolesnika s IgAN-om

Imunohistokemijski je analizirano 12 bioptičkih uzoraka bubrega bolesnika s IgAN-om (šestero djece i šestero odraslih) u kojih je urađena biopsija bubrega u Klinici za dječje bolesti i Zavodu za nefrologiju i hemodijalizu KBC Split od 1996 - 2016. godine. Prosječna dob bolesnika je 28,83 godine (raspon 5 - 57 godina). 10 (83%) bolesnika je muškog, a dva (17%) ženskog spola. Prosječni eGFR u vrijeme biopsije bio je 77,67 ml/min/1,73m2, (raspon 10 - 118 ml/min/1,73m2) i nije se značajno razlikovao u djece u odnosu na odrasle bolesnike (P = 0,214) (Tablica 4). U kontrolnoj skupini je pet ispitanika, dva (40%) muškog i tri (60%) ženskog spola. Prosječna dob je bila 62,60 godina (raspon 52 - 75 godina). Bolesnici s IgAN-om imali su određen MEST-C zbroj po Okfordskoj klasifikaciji (Tablica 5).

Tablica 4. Dob, spol, serumski kreatinin, procijenjena glomerularna filtracija (eGFR) i proteinurija u času biopsije.

DOB **godine**	**Spol** **m/ž**	**Serumski kreatinin** **µmol/L**	**eGFR** **ml/min/1.73m^2**	**Proteinurija** **g/24h**
<18 (N = 6)	5/1	141,67 ± 210,76 (37-571)	92,67 ± 43,51 (10-129)	2,90 ± 3,50 (0,06-8,48)
>18 (N = 6)	5/1	141,50 ± 70,80 (71-235)	62,67 ± 33,58 (27-106)	3,30 ± 3,42 (0,06-9,00)

Tablica 5. Pregled MEST-C zbroja u 12 bolesnika s IgAN-om.

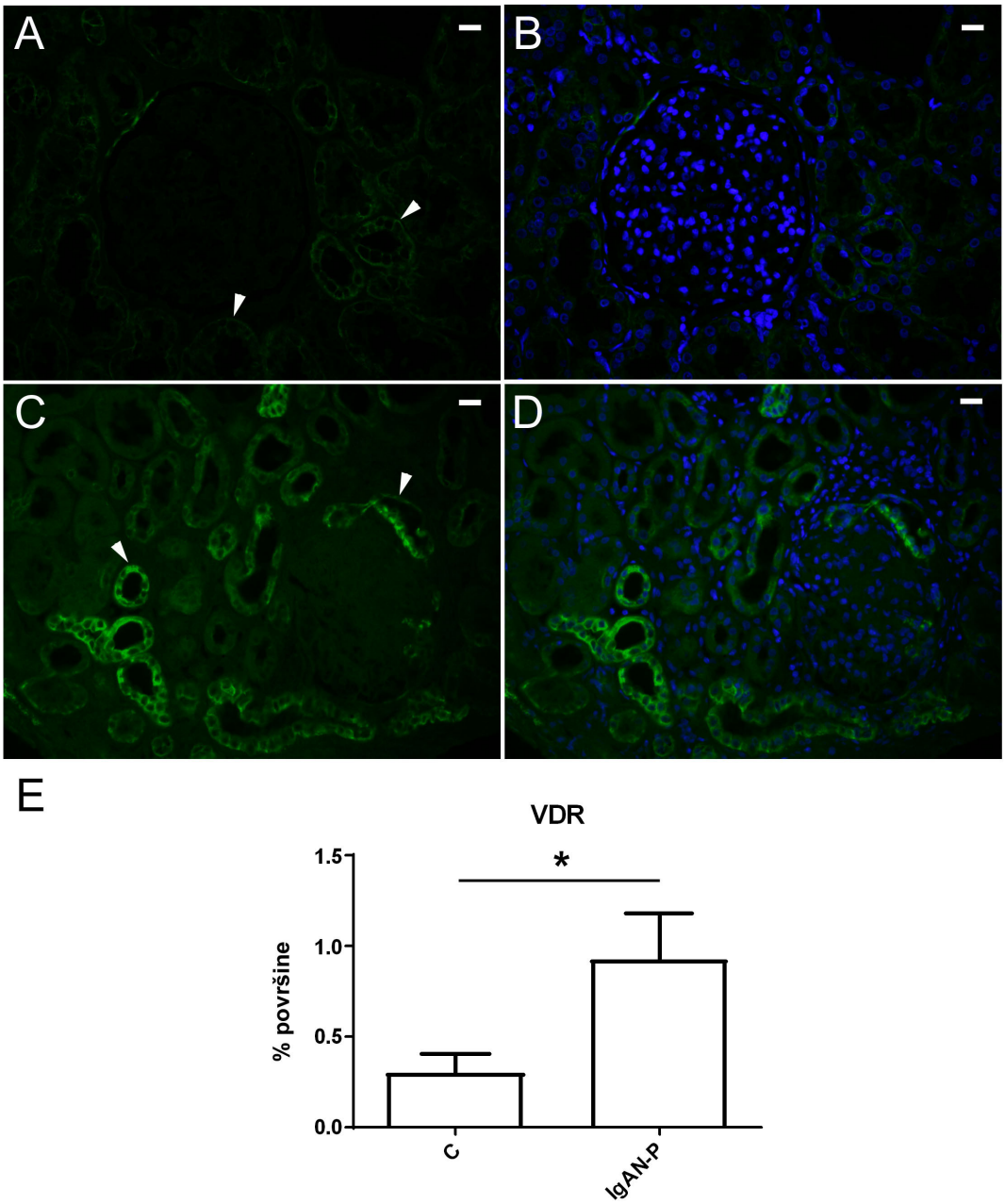
dob (godina)	**spol**	**M**	**E**	**S**	**T**	**C**
5	m	1	0	0	0	0
17	m	1	1	0	0	0
18	m	1	0	0	0	0
10	ž	1	1	0	0	1
16	m	1	0	1	0	1
10	m	1	1	0	0	1
52	m	1	0	1	0	0
57	ž	1	1	0	0	0
50	m	1	0	1	1	0
41	m	0	0	0	0	0
51	m	1	1	1	0	1
19	m	1	0	1	0	0

M - mezangijska hipercelularnost; M0 - prisutna u ≤50% glomerula; M1 - prisutna u >50% glomerula; E - endokapilarna hipercelularnost; E0 - odsutna; E1 - prisutna; S - segmentalna glomeruloskleroza; S0 - odsutna; S1 - prisutna; T - tubularna atrofija i intersticijska fibroza; T0 - 0-25% kore; T1 - 26-50% kore; T2 - >50% kore; C – polumjeseci (engl. *crescents*); C0 - odsutni; C1 - 1-24% glomerula; C2 - >25% glomerula; m – muški spol; ž – ženski spol

U većine (11/12) ispitanika nađena je difuzna mezangijska hiperplazija (M1). Endokapilarna proliferacija (E1) je bila podjednako zastupljena u djece i odraslih ispitanika s IgAN-om. Celularne polumjesece (C1), kao znak akutne glomerularne lezije - rupture glomerularne bazalne membrane, imalo je više ispitanika dječje nego odrasle dobi. Kronične promjene poput segmentalne skleroze (S1) imalo je više odraslih nego djece s IgAN-om. Jedan odrasli ispitanik imao je kronične tubulointersticijske promjene u ≥20% površine kore (T1).

5.4. Izražaj VDR-a u bubrežnom tkivu

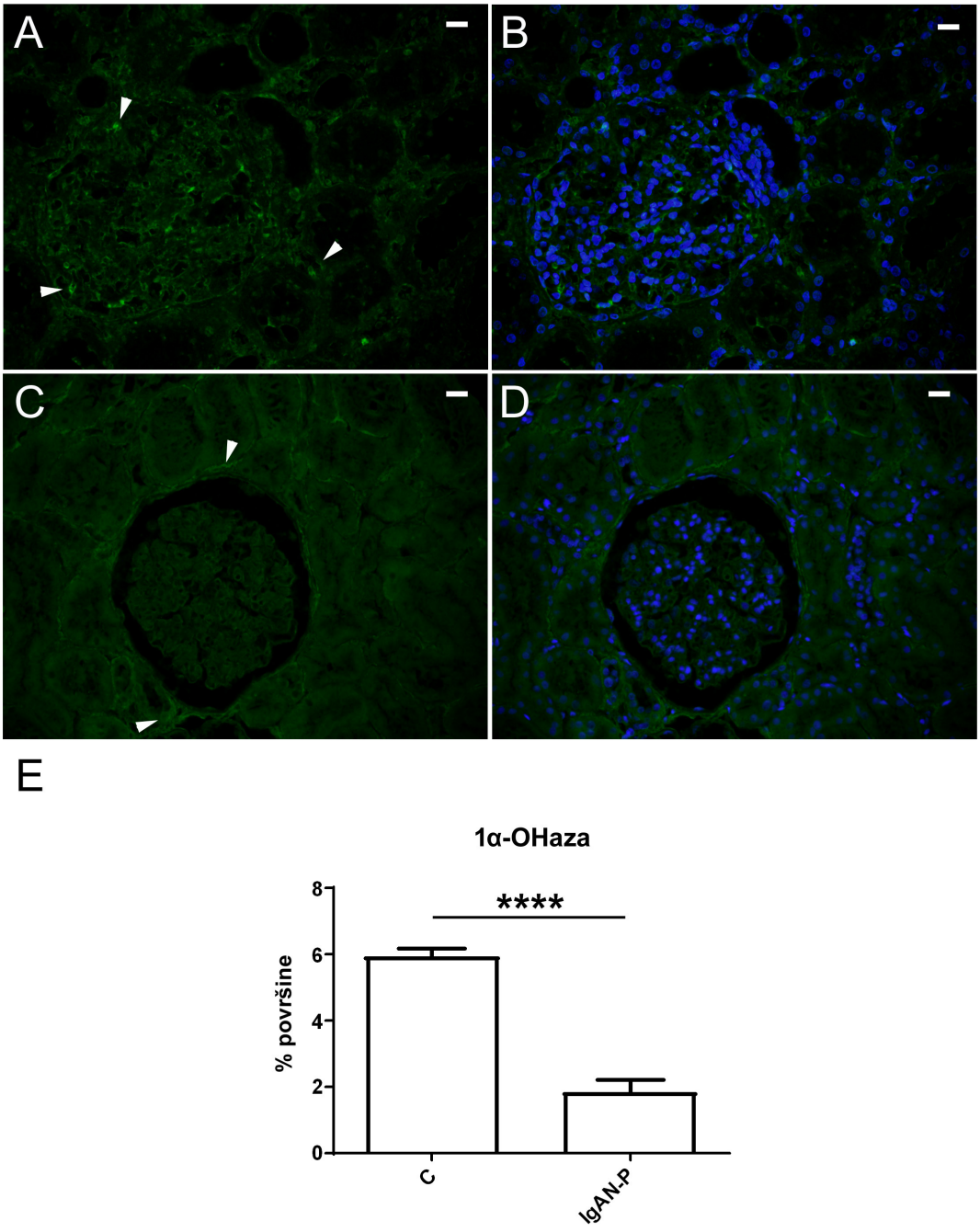
Koristili smo imunohistokemiju za analizu izražaja VDR-a u bubrežnom tkivu bolesnika s IgAN-om i usporedili s tkivom kontrolne skupine. Jaki izražaj VDR-a utvrđen je u epitelnim stanicama distalnih kanalića, dok je imunoreaktivnost VDR-a u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića bila slaba. Nije nađena statistički značajna razlika u izražaju VDR-a između odraslog i dječjeg bioptiranog uzorka (P = 0,354). Stoga smo ih smatrali jednom skupinom. Utvrđen je značajan porast izražaja VDR-a u tkivima bolesnika s IgAN-om u usporedbi s kontrolnom skupinom bubrežnog tkiva (P = 0,037) (Slika 8).



Slika 8. Izražaj VDR-a u bubrežnom tkivu. A, B) uzorci bubrežnog tkiva kontrolne skupine (C); C, D) bioptati bubrega bolesnika s IgA-nefropatijom (IgAN-P) obojeni su imunofluorescencijom korištenjem protutijela protiv receptora za vitamin D (VDR). Izražaj VDR-a istaknut je u epitelnim stanicama distalnih kanalića, dok je u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića uočena samo slaba imunoreaktivnost. Nema razlike u bioptiranim uzorcima između odraslih bolesnika i djece s IgAN-om. Zvjezdica označava statistički značajnu razliku $P < 0,05$.

5.5. Izražaj 1α-OHaze u bubrežnom tkivu

Koristili smo imunohistokemiju za analizu izražaja 1α-OHaze u bubrežnom tkivu bolesnika s IgAN-om i usporedili s tkivom kontrolne skupine. Jaka imunoreaktivnost 1α-OHaze pronađena je u glomerularnim stanicama, parijetalnim epitelnim stanicama Bowman-ove čahure, epitelnim stanicama proksimalnih i distalnih kanalića, kao i u endotelnim stanicama krvnih žila. Nije uočena značajna razlika u izražaju 1α-OHaze između bioptiranih uzoraka odraslih bolesnika i djece s IgAN-om ($P = 0,462$). Stoga smo ih smatrali jednom skupinom. Izražaj 1α-OHaze, enzima koji sintetizira kalcitriol, bio je statistički značajno niži u uzorcima bolesnika s IgAN-om u usporedbi s bubrežnim tkivom kontrolne skupine ($P < 0,001$) (Slika 9).



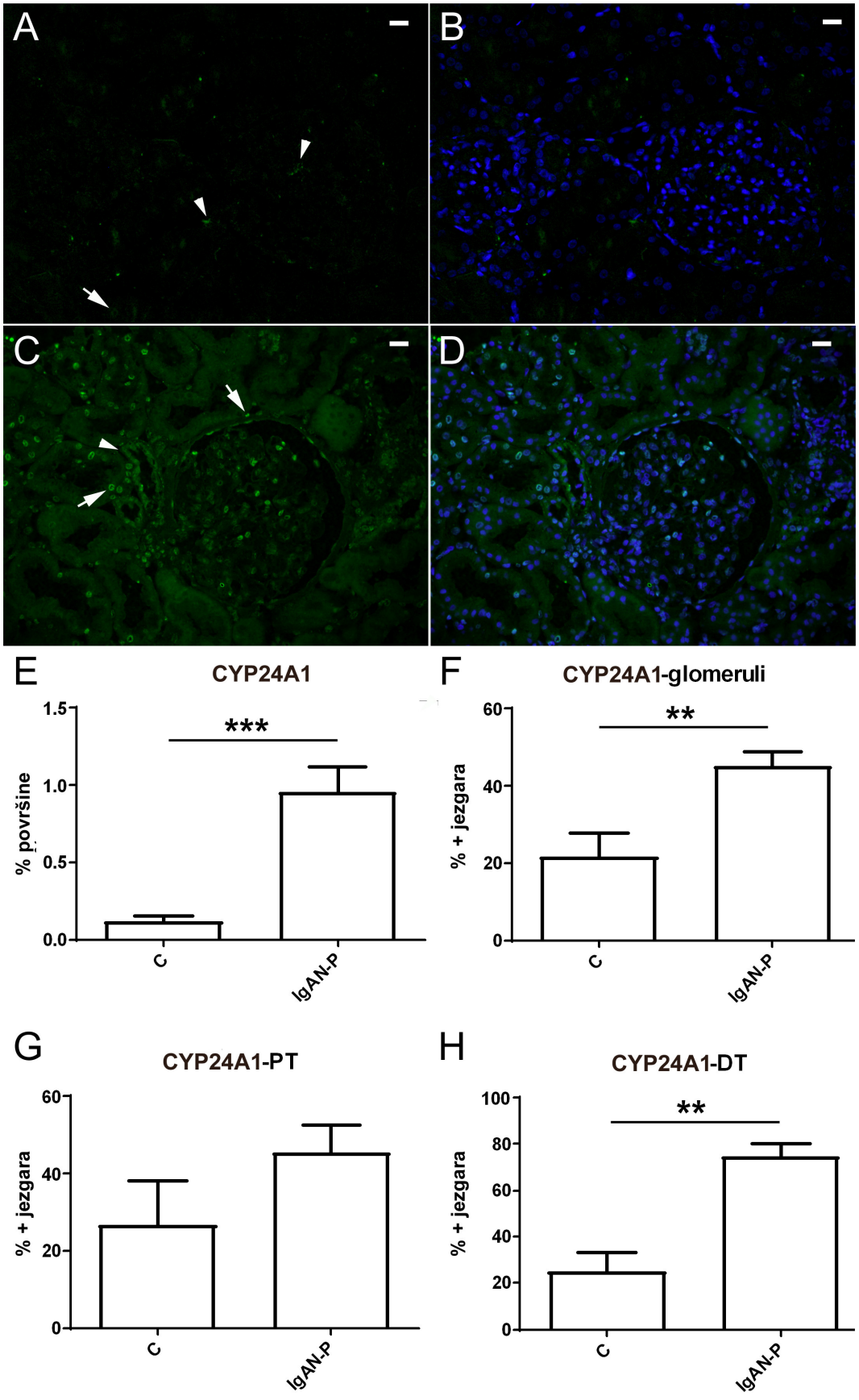
Slika 9. Izražaj 1α-OHaze u bubrežnom tkivu. A, B) uzorci bubrežnog tkiva kontrolne skupine (C); C, D) bioptati bubrega bolesnika s IgA nefropatijom (IgAN-P) obojeni imunofluorescencijom korištenjem protutijela protiv 1α-OHaze (zeleno). Izražaj 1α-OHaze je jak u korteksu bubrega kontrolne skupine. Znatno niži intenzitet imunofluorescencije je izražen u bioptatima bolesnikaa s IgAN-om (IgAN-P). Nije uočena razlika između bioptata odraslih bolesnika i djce s IgAN-om. **** - $P < 0{,}001$.

5.6. Izražaj CYP24A1 u bubrežnom tkivu

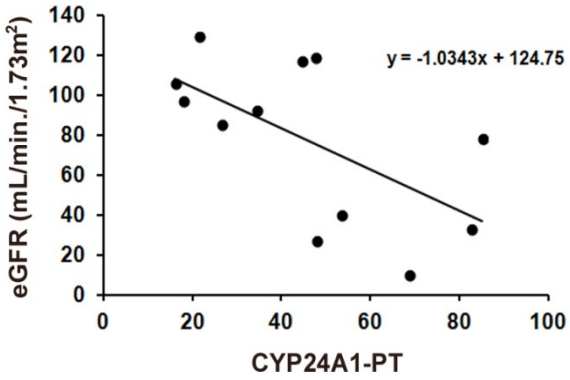
Koristili smo imunohistokemiju za analizu izražaja CYP24A1 u bubrežnom tkivu bolesnika s IgAN-om i usporedili s tkivom kontrolne skupine. Jaka imunoreaktivnost CYP24A1 pronađena je u jezgrama glomerularnih stanica, parijetalnim epitelnim stanicama Bowman-ove čahure, epitelnim stanicama proksimalnih i distalnih kanalića, dok je slaba imunoreaktivnost izražena u citoplazmi tubularnih stanica (Slika 10). Nije uočena značajna razlika u izražaju CYP24A1, enzima koji razgrađuje vitamin D, između bioptiranih uzoraka odraslih bolesnika i djece s IgAN-om ($P = 0,962$). Stoga su smatrani jednom skupinom. Izražaj CYP24A1 bio je značajno veći u uzorcima bolesnika s IgAN-om, u usporedbi s bubrežnim tkivom kontrolne skupine ($P < 0,001$).

Što se tiče jake nuklearne imunoreaktivnosti CYP24A1, analiziran je postotak imunoreaktivnih jezgara u različitim kortikalnim strukturama. Pronašli smo značajno veći postotak jezgara imunoreaktivnih na CYP24A1 u epitelnim stanicama distalnih kanalića ($P = 0,001$) i u glomerulima ($P = 0,005$) u bioptiranim uzorcima bolesnika s IgAN-om, u usporedbi s uzorcima kontrolne skupine. Međutim, nije bilo značajne razlike između kontrolne skupine i bolesnika s IgAN-om u postotku CYP24A1-imunoreaktivnih jezgara u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića ($P = 0,200$).

Uz to, pronašli smo značajnu negativnu korelaciju između postotka CYP24A1-imunoreaktivnih jezgara u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića i eGFR-a bolesnika s IgAN-om ($r = -0,614$; $P = 0,034$; Slika 11).


A
B
C
D
E
CYP24A1
% površine
1.5
1.0
0.5
0.0
***
C
IgAN-P
F
CYP24A1-glomeruli
% + jezgara
60
40
20
0
**
C
IgAN-P
G
CYP24A1-PT
% + jezgara
60
40
20
0
C
IgAN-P
H
CYP24A1-DT
% + jezgara
100
80
60
40
20
0
**
C
IgAN-P

Slika 10. Izražaj CYP24A1 u bubrežnom tkivu. A, B) uzorci bubrežnog tkiva kontrolne skupine (C); C, D), bioptati bubrega bolesnika s IgAN-om (IgAN-P), obojeni su imunofluorescencijom (zeleno) korištenjem protutijela protiv CYP24A1. Izražaj CYP24A1 je slab u korteksu bubrega kontrolne skupine. Znatno veći intenzitet imunofluorescencije izražen je u bioptatima IgAN-P. Nije uočena razlika između bioptata odraslih bolesnika i djece s IgAN-om. ** - P < 0,01; *** - P < 0,001.



Slika 11. Korelacija između nuklearnog izražaja CYP24A1 u bubrežnom tkivu i procijenjene glomerularne filtracije (eGFR). Statistički značajna negativna korelacija između postotka imunoreaktivnih jezgara CYP24A1 u epitelu proksimalnih kanalića (CYP24A1-PT) i eGFR-a u bolesnika s IgA-nefropatijom (IgAN-P) (Pearsonsov koeficijent korelacije; r = -0,614; P = 0,034).

6. RASPRAVA

Perkutana biopsija bubrega djece i odraslih izvodi se u KBC Split kontinuirano od 1994. godine. U dijagnostici glomerularnih bolesti predstavlja dio kliničke obrade, jer se iz bioptičkih uzoraka dijagnosticira tip glomerulonefritisa ili druga bolest bubrežnog parenhima. Patološki nalazi svih bioptiranih bolesnika, prikupljeni sustavno s kliničkim i laboratorijskim podacima, predstavljaju dragocjenu bazu podataka. Analizom takve baze moguće je dobiti epidemiološke pokazatelje usporedive s drugim sredinama i pratiti morbiditet u svojoj sredini kroz vremenska razdoblja. Osim toga, arhivirane parafinske blokove bubrežnog tkiva moguće je naknadno prikupiti u svrhu ispitivanja novih prediktivnih i drugih biljega važnih u patogenezi dijagnosticiranih bubrežnih bolesti.

U disertaciji analizirana je kohorta od 54 ispitanika bioptiranih od 2008 - 2017. na Klinici za dječje bolesti i rezultati uspoređeni s drugim sličnim studijama i prethodnim razdobljem u istoj ustanovi. U novije vrijeme istaknut je pleiotropni korisni učinak vitamina D u ekstraskeletnim tkivima i istraženi mehanizmi njegove regulacije u stanicama, što nas je potaklo da ispitamo izražaj VDR-a i metabolizirajućih enzima aktivacije i deaktivacije vitamina D u ispitanika s IgAN-om, koji je najčešći primarni glomerulonefritis. Iz kohorte 54 bioptirane djece izuzeli smo šest ispitanika s IgAN-om i zajedno sa šest odraslih ispitanika s IgAN-om bioptiranih na Klinici za nefrologiju naše bolnice analizirali imunohistokemijskom metodom VDR, 1α-OHazu i CYP24A1 te usporedili njihov izražaj s izražajem u kontrolnoj skupini.

6.1. Epidemiološka analiza perkutanih bubrežnih biopsija izvedenih u desetogodišnjem razdoblju u Klinici za dječje bolesti KBC Split

Od 231 bolesnika s glomerularnim i tubulointersticijskim bolestima koji su bili hospitalizirani u Klinici za dječje bolesti KBC-a Split od 2008 - 2017. godine, 54 (23,38%) je bilo podvrgnuto perkutanoj bubrežnoj biopsiji (91). Urađena je kompletna patološka analiza svih uzoraka (SM, IF i EM). U svojoj studiji Fidan i sur. navode 10% bioptiranih među bubrežnim bolesnicima (94). Razlika se može pripisati različitim kriterijima uključivanja u uzorak. Od ukupno 23 dostupna rada u kojima su bili analizirani epidemiološki podaci,

cjelovita patološka analiza zastupljena je u devet studija (1-3, 6, 8, 10, 95-97). U osam radova u potpunosti je izostala EM analiza (9, 10, 12-15, 98, 99), a u pet studija urađena je samo u nekim slučajevima (4, 11, 95, 100, 101). U studiji Bakr-a i sur. IF i EM analiza su rađene samo ponekad (7). Za pretpostaviti je da tehnička heterogenost može koji put rezultirati značajnim razlikama u patološkom nalazu.

U našem uzorku najčešća indikacija za biopsiju bila je NS, u oko četvrtine bioptirane djece, a slijedi ne-nefrotska proteinurija s hematurijom, s 22,22 % slučajeva (91), slično većini studija (2-4, 6-15, 102). S druge strane, u Češkoj je glavna indikacija za biopsiju IH (100), u Maroku nefrotska proteinurija s hematurijom (14), a u Velikoj Britaniji predominira ne-nefrotska proteinurija s 36 % slučajeva (102). U 18,52% ispitanika je indikacija za biopsiju bila nefritički sindrom s nefrotskom proteinurijom, slično studiji Coppo i suradnika, s 20,8% slučajeva (4). U našem uzorku, od svih indikacija na IH-u otpada 16,67% (91). Coppo i suradnici te Rychlík i suradnici naglašavaju da je IH ključna indikacija za brzu biopsiju bubrega u djece (4, 100). Za razliku od njuh, Zhai i sur. (103) u asimptomatskih bolesnika s mikroskopskom hematurijom savjetuju tek dugotrajno kliničko praćenje, smatrajući da je mali rizik od teške lezije bubrega. AZB je u našem uzorku bio indikacija za biopsiju u 7,41% slučajeva, slično drugim studijama (6, 8, 9, 104). U nekim radovima je zastupljenost AZB u bioptiranih veća, 10,7 - 17,5% (4, 13, 14, 103), a nekima manja, 1,4 - 4,4% (7, 11). CKD je bila rijetka indikacija za biopsiju, u 5,56% slučajeva (91). Ukupno, polovica indikacija za biopsiju bubrega odnosi se na udruženu skupinu NS-a i nefritičkog sindroma s nefrotskom proteinurijom (91), što je slično drugim studijama (1, 3, 8).

Usporedba različitih studija pokazuje da su se indikacije za bubrežnu biopsiju tijekom vremena mijenjale. Yin i sur. opisali su trend rasta NS-a kao indikacije, a trend pada indikacije poput akutnog nefritičkog sindroma, RPGN-a i IH-e (2). Češka studija ukazala je porast indikacija zbog IH-e, a smanjenje zbog NS-a (105). U usporedbi s prethodnim razdobljem, u našem uzorku je učestalost NS-a i nefritičkog sindroma s hematurijom ostala ista, umjereno je porastao udio indikacija zbog IH-e, a smanjio se udio ne-nefrotske proteinurije.

U našem uzorku najčešći patološki nalaz je IgAN, dijagnosticirana u 24,07% slučajeva (91), što je slično rezultatu Coppo i sur. (4) i drugim studijama (5, 95, 100, 106). U

Engleskoj je najčešća dijagnoza u bioptiranih HSPN, u 15,9% slučajeva (102). U nekim radovima navedena je manja učestalost IgAN-e (3, 7, 8, 10-14, 94, 99, 101, 102). Razlog može biti nekompletna patološka analiza, jer se u nekim studijama IF koristila samo "kada je zatraženo" (7) ili kad se očekivala IgAN (15). Drugi po učestalosti je MCD (16,67%), kojeg mnogi autori ističu kao najčešći patološki nalaz (5, 7, 9, 14, 99, 101). Pretpostavljamo da je u njihovim sredinama NS bila češća indikacija za biopsiju bubrega u djece nego kod nas.

U našem uzorku je bilo 14 bioptiranih s NS-om, najčešći patološki nalaz je MCD, u 64,28% slučajeva i potom FSGS s 28,57 % slučajeva (91), što je sukladno nekim nacionalnim studijama (4, 6, 97, 100, 105). U Turskoj, Grčkoj i Srbiji je FSGS najčešći tip glomerulonefritisa u bioptiranih s NS-om, moguće zbog toga što se u djece s NS-om bubrežna biopsija ne izvodi ako postoji odgovor na kortikosteroidnu terapiju (12, 13, 94). U skupini od 12 ispitanika s ne-nefrotskom proteinurijom s hematurijom, najčešći patološki nalaz je IgAN (91). Takav rezultat imaju japanski autori (4, 107). U skupini deset ispitanika s nefritičkim sindromom s nefrotskom proteinurijom, polovina ispitanika je imala HSPN (91). Moorani i sur. (15) i Zhou i sur. utvrdili su manju zastupljenost HSPN-a u ispitanika s tom indikacijom za biopsiju (108). Među bioptiranima s IH-om, najviše ispitanika imali su IgAN-u, 44,44% (91), što je u skladu s izvješćima Yin i sur. te Coppo i sur. (2, 4). U radu Zhai i sur. je IgAN na trećem mjestu po učestalosti među bioptiranim s IH-om (103), ali nije naznačeno je li IF urađena u svim slučajevima. Od četiri ispitanika s AZB, dvoje je imalo TIN, jedan ispitanik RPGN i jedan PIGN (91). Lopez-Gomez i sur. navode trombotičku mikroangiopatiju kao najčešći patološki nalaz u bioptiranih s AZB. U Južnoj Aziji su HUS i TIN važni uzrok AZB u djece (11, 104). Prema izvještaju talijanskog Nacionalnog registra bubrežnih biopsija u djece, RPGN je najčešći nalaz u bioptiranih s AZB, pa slijedi TIN (4). Od tri ispitanika s CKD-om u našem uzorku, jedan je imao IgAN-u, jedan FSGS udružen s TIN-om, i jedan FSGS (91). Mohapatra i sur. navode da je u bioptiranih ispitanika s CKD-om IgAN bila dominantna dijagnoza i na drugom mjestu FSGS (11). U djece je CKD rijetka indikacija za biopsiju jer nije nužna za početak liječenja.

Najčešći patološki nalazi u našem uzorku su IgAN, MCD, HSPN, FSGS i AS (91). Zhou i sur. u svom radu kao najčešće navode MesPGN, FSGS-u i IgAN-u (108), ali kako autori ne navode metode analize tkiva, studije nisu posve usporedive.

Usporedba podataka ove i prethodne studije iz naše Klinike ukazuje na značajan porast udjela IgAN-e, MCD-a i AS-a, te pad udjela HSPN-a i FSGS-a među patološkim nalazima (8, 91). Neke od bolesti (membranoproliferativni glomerulonefritis, nefronoftiza) ne pojavljuju se u našem uzorku, ali se zato javljaju prvi put C1qN, C3GN i TBMN. U našem uzorku povećani linearni trend može se pratiti za IgAN-u i MCD i povećani oštri trend za TBMN-u od 2011. povezan sa suradnjom na projektu Nacionalne zaklade za znanost (8, 91). Slične rezultate imaju autori drugih usporednih studija (94, 95). Vjerojatni razlog su promjene u kliničkom stavu prema IH-i, nova klasifikacija IgAN-e koja je izlučila nezavisne histološke pokazatelje važne za terapiju i prognozu, a time istakla potrebu za biopsijom. Jedan od MEST-C pokazatelja je mezangijska hipercelularnost koja ukazuje na aktivnu bolest ako zahvaća više od polovine prikazanih glomerula (32, 33, 109). Češki registri bubrežnih biopsija između 1994. i 2011. pokazuju da su MCD i minimalne abnormalnosti glomerula najčešći patološki nalazi i da im učestalost u biopsijama raste (100, 105). U našim uspoređenim studijama vidi se da je učestalost MCD-a povećana s 4,6% na 16,67% (8, 91). Trend može biti slučajan jer su brojevi maleni, ali treba napomenuti da su indikacije za biopsiju bubrega u našoj bolnici za djecu s NS-om strože nego u navedenim studijama. U literaturi se promjenila klasifikacija glomerularnih bolesti u kojoj je nekoć MCD s hiperplazijom mezangija i bez imunih depozita nazivana MesPGN, a danas je to MCD. Patološka dijagnoza MesPGN se nlazi u studijama iz Pakistana (15), Indije (10) i Jordana (110). Udio MesPGN-a u našem uzorku je sad značajno manji nego u prethodnom istraživanju, gdje je to bila jedna od najčešćih dijagnoza (8,91). Smanjenje učestalosti MesPGN-a u nas može se objasniti primjenom nove klasifikacije glomerularnih bolesti i kompletne analize, što u prethodnom razdoblju nije uvijek bilo. Bez IF-e i EM-e koji put nije mouće razlikovati IgAN-u, MCD i bolesti GBM-e (TBMN i AS) (32, 100, 105, 109-112). U ovom uzorku je učestalost patološkog nalaza AS-a značajno porasla u odnosu na prethodno razdoblje (8, 91). Razlog tome je više pozornosti upućene djeci s IH-om u svjetlu novih saznanja o nasljednim glomerulopatijama. Danas se smatra da AS i TBMN trebaju biti potvrđene i genskom analizom iz krvi, tako da u budućnosti neće biti potrebe za bubrežnom biopsijom, osim u odabranim slučajevima (113). U našoj studiji, FSGS ima blago rastući trend u usporedbi s prethodnim razdobljem (8, 91). Slični rezultati zabilježeni su u studiji iz Kine (2). U usporednoj analizi primijetili smo porast učestalosti HSPN-a, slično turskoj i kineskoj studiji (94, 95). Vjerojatno je to zbog povećane svijesti o mogućem zahvaćanju bubrega u djece s vaskulitisom Henoch Schönlein (112, 114). Broj slučajeva s LN-om je nizak kao u

prethodnom razdoblju, slično istraživanju Fidan-a i sur. LN je češći u Hispanoamerikanaca, crnaca i Azijata nego u bijelaca (11, 14, 91, 94). Prevalencija C1qN-e u biopsiji bubrega u svijetu varira između 0,2 i 16% (115-118). Razlozi za ovo odstupanje bi se mogli pripisati nedosljednoj upotrebi imunofluorescencijskog bojenja C1q i različitim kriterijima za biopsiju bubrega. U našoj studiji C1qN je pronađena u 2% svih bioptiranih ispitanika, a ni jednom u prethodnoj studiji (8, 91).

U našem istraživanju utvrdili smo značajan porast učestalosti IgAN-e, AS-a i MCD-a, blagi porast HSPN-a i FSGS-a i značajan pad MesPGN-a u usporedbi s prethodnim razdobljem (8, 91). Za klasifikaciju MesPGN-a u prehodnom razdoblju korišteni su povijesni Churgovi kriteriji (119), a od 2006. novi kriteriji (120). Mezangijska proliferacija povezana s nalazom gubitka podocita na EM-i klasificira se kao MCD s minimalnom proliferacijom mezangijskih stanica, ili kao IgM nefropatija, ako je obilan depozit IgM-a u mezangiju. U našoj studiji IgAN pokazuje trend povećanja učestalosti u usporedbi s razdobljem 1995 - 2005 (8, 32, 33, 91, 109). Razlog tome je odabir za biopsiju većeg broja bolesnika s trajnom mikroskopskom hematurijom, s pridruženom proteinurijom ili bez nje. Ako su klinički nalazi upućivali na HSPN, biopsija je bila brzo napravljena kako bi započelo odgovarajuće liječenje. Učestalost MesPGN-a, IgAN-e, AS-a i MCD-a u djece u Južnoj Hrvatskoj promijenila se tijekom uspoređenih razdoblja 1995 - 2005. i 2008 - 2017. godine u našoj Klinici kojoj gravitiraju bolesna djeca iz cijele Dalmacije. Na razlike u učestalosti tipova glomerulonefritisa u pojedinim sredinama utječu kriteriji za indikaciju, dostupnost analitičkih metoda i primjenjene patološke klasifikacije s pojavom novih entiteta. Svi navedeni čimbenici mogu utjecati na prevalenciju patoloških nalaza u pojedinim razdobljima u istoj sredini. Stoga je potrebno nastaviti s radom na popunjavanju i analizi naše baze podataka o djeci kojima je urađena perkutana biopsija bubrega. Tako možemo sagledati epidemiološke pokazatelje koji nam, uz kliničko znanje i iskustvo, mogu dati korisne smjernice u svakodnevnom radu.

6.2. Izražaj receptora za vitamin D i metabolizirajućih enzima D vitamina u bubrežnom tkivu bolesnika s IgA nefropatijom

Aktivacija imunološkog sustava u upali pridonosi oštećenju bubrežnog parenhima. Sprečavanje nastanka oštećenja bubrega i usporavanje gubitka bubrežne funkcije je važan

klinički izazov, a počiva na razumijevanju uključenih patoloških i patofizioloških mehanizama. Aktivacija RAAS-a i stimulacija upalnih i fibrotičnih procesa su putovi progresije IgAN-e koji mogu dovesti do nastanka ESRD-a. (19). Brojna istraživanja su pokazala da je vitamin D jedan od glavnih čimbenika koji regulira RAAS. Renoprotektivni učinci vitamina D uključuju smanjenje proteinurije, smanjenje upalnog odgovora, suzbijanje aktivacije RAAS-a, usporavanje intersticijske fibroze, oštećenja podocita i glomeruloskleroze te poboljšanje bubrežne funkcije (121-126). Važan posrednik za učinke vitamina D u tkivu je njegov receptor, VDR. Gen VDR pokazuje veliki polimorfizam, što posredno utječe na učinkovitost vitamina D. Prema nekim radovima, to je moguće povezati s progresijom glomerulonefritisa i većim rizikom od CKD-a i ESRD-a (127, 128). U dostupnoj literaturi nismo pronašli studije o izražaju VDR-a u bubrezima bolesnika s IgAN-om. Zato smo istražili izražaj VDR-a i metabolizirajućih enzima vitamina D u uzorku bubrežnog tkiva dobivenom perkutanom biopsijom u 12 bolesnika s IgAN-om i rezultate usporedili s kontrolom.

U uzorcima bioptata djece i odraslih bolesnika s IgAN-om utvrđen je jaki izražaj VDR-a u distalnim kanalićima i slabi izražaj u proksimalnim kanalićima. Izražaj VDR-a u bioptatima bolesnika s IgAN-om bio je značajno veći nego u kontroli. Izražaj VDR-a pretežno u epitelu kanalića u skladu je s rezultatima Wang-a i sur. (129). Vitamin D i njegov najaktivniji metabolit $1,25(OH)_2D3$ imaju jaki antiproliferativni i imunomodulacijski učinak (130-132). U mnogim studijama dokazano je da su u imunosnim stanicama izraženi VDR te ključni enzimi koji metaboliziraju vitamin D, 1α-OHaza i CYP24A1, što omogućuje da autokrino i parakrino upravljaju djelovanjem D vitamina (23, 132-134). Ye i sur. izvijestili su o sniženoj razini VDR-a u serumu bolesnika s ESRD-om (126). Za razliku od njih, u uzorku nismo imali bolesnika s ESRD-om. Bubrežna funkcija je u nekih naših bolesnika bila smanjena, ali očuvana. Pretpostavljamo da je malo povećanje izražaja VDR-a u uzorcima bolesnika s IgAN-om kompenzacijski odgovor na poremećnu bubrežnu funkciju. Nedostatak vitamina D je vrlo čest među bolesnicima s CKD-om, rano se javlja i povezan je s progresijom u ESRD (130, 131). Proteinurija je prognostički biljeg za napredovanje CKD-a, a smanjenje proteinurije štiti od daljnjeg pada bubrežne funkcije (135, 136). Li i sur. su pokazali da je nedostatak vitamina D povezan s nepovoljnim patološkim pokazateljima i lošijim kliničkim ishodom u bolesnika s IgAN-om (137). Szeto i suradnici proučavali su ispitanike s IgAN-om u kojih je proteinurija trajala unatoč liječenju s RAAS-blokatorima. U bolesnika koji su primali aktivatore receptora vitamina D (VDRA, engl. *vitamin D receptor*

activator), došlo je do značajnog smanjenja proteinurije (138), što se podudara i s rezultatima studije drugih autora (139). Pretpostavlja se da aktivacija VDR-a utječe na ravnotežu imunosnih stanica u IgAN-i, što dovodi do smanjenja proteinurije i hematurije (22). Tan i suradnici dokazali su na eksperimentalnom modelu miša s obstruktivnom uropatijom da sintetički analog vitamina D ima snažno protuupalno djelovanje jer inhibira infiltraciju makrofaga i T limfocita i djelovanje proupalnog citokina RANTES (engl. *Regulated on Activation Normal T cell Expressed and Secreted*). Inače je, nakon bubrežnog oštećenja, RANTES gotovo u cijelosti lokaliziran u epitelu bubrežnih kanalića, što ukazuje da su te stanice ciljno mjesto za vitamin D, s posljedičnim protuupalnim učinkom (140).

Enzim koji sintetizira kalcitriol je 1α-OHaza. U bubrežnom bioptatu bolesnika s IgAN-om utvrdili smo značajno manji izražaj 1α-OHaze nego u kontrolnim uzorcima. Imunoreaktivnost 1α-OHaze je utvrđena u stanicama glomerula i parijetalnom epitelu, epitelu proksimalnih i distalnih kanalića te endotelu krvnih žila. Suprotno našem nalazu Zehnder i sur. izvijestili su o povećanom izražaju mRNA 1α-OHaze u bioptatima bubrežnih bolesnika koji su imali nisku razinu $1,25(OH)_2D3$. Taj nalaz upućuje da 1α-OHaza može biti adekvatno izražena u bubrezima bolesnika s CKD-om, ali je oslabljena njena učinkovitost u proizvodnji $1,25(OH)_2D3$ (141). Izražaj i aktivnost 1α-OHaze je kompleksno regulirana s PTH-om, čimbenikom rasta fibroblasta-23 (FGF-23, engl. *fibroblast growth factor*) i aktiviranim vitaminom D, $1,25(OH)_2D3$. Dok PTH stimulira 1α-OHazu, FGF-23 i $1,25(OH)_2D3$ je inhibiraju (65, 142). Povišena razina kalcijevih iona u plazmi inhibira 1α-OHazu smanjenjem lučenja PTH-a, a povišeni fosfati inhibiraju 1α-OHazu stimuliranjem FGF-23. Uz to, kalcij i fosfati mogu imati izravne učinke na 1α-OHazu. $1,25(OH)_2D3$ ograničava aktivnost 1α-OHaze povećanjem proizvodnje FGF-23 i smanjenjem lučenja PTH-a, te smanjenjm svoje vlastite razine (65, 142). Niska razina $1,25(OH)_2D3$ u bolesnika s CKD-om objašnjava se smanjenom aktivnošću 1α-OHaze zbog slabe dostupnosti 25(OH)D3 (143), nereguliranim i/ili inhibiranim izražajem 1α-OHaze (144) ili smanjenom masom nefrona i disfunkcijom kanalića (130, 145). Viaene i suradnici izvijestili su da uremija smanjuje izražaj 1α-OHaze u ljudskim monocitima (146), što je vjerojatno primjenjivo i na druge stanice koje izražavaju 1-αOHazu.

Enzim koji degradira vitamin D je CYP24A1. Rezultati naše studije pokazali su značajno veći izražaj CYP24A1 u bioptatima bolesnika s IgAN-om, u usporedbi s kontrolnim bubrežnim tkivima. U skladu s našim rezultatima, Ye i sur. izvijestili su da je izražaj

CYP24A1 povećan u bolesnika s ESRD-om (126). Međutim, do sada nije istraživan izražaj CYP24A1 u bolesnika s IgAN-om. Pronašli smo snažnu imunoreaktivnost CYP24A1 u jezgrama stanica glomerula, parijetalnih epitelnih stanica, proksimalnih i distalnih kanalića i slabi citoplazmatski izražaj u epitelu kanalića. Značajno je veći postotak CYP24A1 imunoreaktivnih jezgara u epitelnim stanicama distalnih kanalića i glomerulima u bioptatima bolesnika s IgAN-om, u usporedbi s kontrolnim uzorcima. Zanimljivo je da iako nije bilo značajne razlike između kontrolne skupine i bolesnika s IgAN-om u postotku CYP24A1-imunoreaktivnih jezgara u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića, pronašli smo značajno negativnu korelaciju između postotka jezgara imunoreaktivnih na CYP24A1 u epitelnim stanicama proksimalnih kanalića i eGFR-a u bolesnika s IgAN-om. Taj rezultat upućuje na mogućnost da je postotak CYP24A1-imunoreaktivnih jezgara u epitelu proksimalnih kanalića osjetljivi biljeg promjena u bubrežnoj funkciji, proporcionalnih stupnju bubrežnog oštećenja. U ranijim studijama, u bolesnika s IgAN-om utvrđena je niža razina 25(OH)D3 u plazmi, što je povezano s većim postotkom intersticijske fibroze/tubularne atrofije (137). Štoviše, utvrđeno je da su pogoršanje proteinurije i smanjena razina cirkulirajućeg 25(OH)D3 proporcionalni smanjenju eGFR-a (137). Uz već navedene mehanizme, može se pretpostaviti da je smanjenje cirkulirajućeg $1,25(OH)_2D3$ i 25(OH)D3 povezano s povećanim izražajem/aktivnosti CYP24A1 u oštećenom bubrežnom tkivu.

U zaključku, raspodjela indikacija za perkutanu bubrežnu biopsiju u djece u našem uzorku slična je podatcima iz literature. U polovini svih slučajeva to su bili NS i ne-nefrotska proteinurija s hematurijom. Najčešći patološki nalazi su bili IgAN, MCD, HSPN i FSGS. Promjena raspodjele patoloških nalaza u odnosu na prethodno razdoblje u našoj ustanovi uzrokovana je uporabom nove klasifikacije glomerulonefritisa i češćim bioptiranjem IH-e u svrhu dijagnostike bolesti GBM-e. Imunohistokemijskom analizom bubrežnog tkiva bolesnika s IgAN-om, ustanovili smo značajno veći izražaj VDR-a nego u kontrolnim uzorcima te značajno manji izražaj 1α-OHaze, enzima koji sintetizira kalcitriol. Nasuprot tome, izražaj CYP24A1, enzima koji razgrađuje D vitamin, bio je značajno veći u bubrežnom tkivu bolesnika s IgAN-om nego u kontrolnim uzorcima. Tako naši rezultati indirektno ukazuju na značajno smanjenu proizvodnju kalcitriola i povećanu razgradnju vitamina D u bubrezima bolesnika s IgAN-om. S obzirom na sve navedeno, poremećaj lokalne proizvodnje kalcitriola u bubrezima je jedan od mogućih mehanizama pogoršanja bubrežnog oštećenja u IgAN-i. Uz to, može također utjecati na sistemski metabolizam vitamina D i koncentraciju kalcitriola, što

se nepovoljno odražava na negativnu petlju regulacije paratireoidne žlijezde (65). Posljedično aktivira se začarani krug povećane sekrecije PTH-a, bez odgovarajućeg bubrežnog odgovora, tj. povećane sinteze kalcitriola. U bolesnika s IgAN-om povećan izražaj CYP24A1 u bubrežnom tkivu može rezultirati prekomjernom razgradnjom vitamina D, dodatnim smanjenjem razine kalcitriola i pojačanim lučenjem PTH-a (92). Veći postotak jezgara s pozitivnim izražajem CYP24A1 u proksimalnim kanalićima povezan je s nižim vrijednostima eGFR, što može biti eventualni rani biljeg nepovoljne prognoze. Vrijednost ove studije je u osvjetljavanju promjena metabolizma D vitamina u IgAN-i, a nedostaci studije maleni uzorak heterogen po dobi i nedostatak kliničkog praćenja. U daljnjem istraživačkom radu, trebalo bi sličnim istraživanjem obuhvatiti veću kohortu ispitanika s IgAN-om i pratiti ih u dužem vremenskom razdoblju.

7. ZAKLJUČCI

1. Nefrotski sindrom je bio najčešća indikacija za biopsiju bubrega u djece, a IgAN-a najčešći nalaz u razdoblju 2008 - 2017. godine u KBC Split. Zbog promjena u klasifikacijama i dijagnostičkog postupka značajno je smanjen udio mezangioproliferativnog glomerulonefritisa.

2. Izražaj VDR-a, 1α-OHaze i CYP24A1 u bubrežnom tkivu se značajno ne razlikuje u djece i odraslih bolesnika s IgAN-om.

3. Izražaj VDR-a je značajno veći u tkivu bioptata bolesnika s IgAN-om, u usporedbi s kontrolnim tkivima.

4. Izražaj 1α-OHaze je značajno manji u bubrežnom tkivu bolesnika s IgAN-om nego u kontrolnim tkivima.

5. Izražaj CYP24A1 je značajno veći u bubrežnom tkivu bolesnika s IgAN-om nego u kontroli.

6. Postotak nuklearnog izražaja CYP24A1 u epitelu proksimalnih kanalića pokazuje negativnu korelaciju s eGFR-om.

8. LITERATURA

1. Prada Rico M, Rodriguez Cuellar CI, Fernandez Hernandez M, Gonzalez Chaparro LS, Prado Agredo OL, Gastelbondo AR. Characterization and etiopathogenic approach of pediatric renal biopsy patients in a Colombian medical center from 2007-2017. Int J Nephrol. 2018;2018:9603453.

2. Yin XL, Zou MS, Zhang Y, Wang J, Liu TL, Tang JH i sur. Twenty-three-year review of disease patterns from renal biopsies: an experience from a pediatric renal center. J Nephrol. 2013;26:699-707.

3. Batinic D, Scukanec-Spoljar M, Milosevic D, Subat-Dezulovic M, Saraga M, Delmis J i sur. Clinical and histopathological characteristics of biopsy proven renal diseases in Croatia. Acta Med Croatica. 2007;61:361-4.

4. Coppo R, Gianoglio B, Porcellini MG, Maringhini S. Frequency of renal diseases and clinical indications for renal biopsy in children (report of the Italian National Registry of renal biopsies in children). Group of Renal Immunopathology of the Italian Society of Pediatric Nephrology and Groupof renal immunopathology of the Italian Society of Nephrology. Nephrol Dial Transplant. 1998;13:293-7.

5. Rivera F, Lopez-Gomez JM, Perez-Garcia R. Frequency of renal pathology in Spain 1994-1999. Nephrol Dial Transplant. 2002;17:1594-602.

6. Al Menawy L, Amuosi J, Ramprasad KS, Shaheen FA. Percutaneous renal biopsy and its findings in children and adolescents in Saudi Arabia: a single center experience. Saudi J Kidney Dis Transpl. 1997;8:289-93.

7. Bakr A, Eid R, Sarhan A, Hammad A, El-Refaey AM, El-Mougy A i sur. Fifteen years of kidney biopsies in children: a single center in Egypt. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2014;25:1321-7.

8. Bazina M, Glavina-Durdov M, Scukanec-Spoljar M, Bazina A, Vukojevic K, Ljutic D i sur. Epidemiology of renal disease in children in the region of southern Croatia: a 10-year review of regional renal biopsy databases. Med Sci Monit. 2007;13:CR172-6.

9. Imtiaz S, Nasir K, Drohlia MF, Salman B, Ahmad A. Frequency of kidney diseases and clinical indications of pediatric renal biopsy: a single center experience. Indian J Nephrol. 2016;26:199-205.

10. Kanodia KV, Vanikar AV, Nigam LK, Patel RD, Suthar KS, Gera DN i sur. Pediatric renal biopsies in India: a single-centre experience of six years. Nephrourol Mon. 2015;7:e25473.

11. Mohapatra A, Kakde S, Annapandian VM, Valson AT, Duhli N, Korula A i sur. Spectrum of biopsy proven renal disease in south Asian children: two decades at a tropical tertiary care centre. Nephrology (Carlton). 2018;23:1013-22.

12. Paripovic D, Kostic M, Kruscic D, Spasojevic B, Lomic G, Markovic-Lipkovski J i sur. Indications and results of renal biopsy in children: a 10-year review from a single center in Serbia. J Nephrol. 2012;25:1054-9.

13. Printza N, Bosdou J, Pantzaki A, Badouraki M, Kollios K, Ghogha C i sur. Percutaneous ultrasound-guided renal biopsy in children: a single centre experience. Hippokratia. 2011;15:258-61.

14. Souilmi FZ, Houssaini TS, Alaoui H, Harmouch T, Atmani S, Hida M. Indications and results of renal biopsy in children: a single-center experience from Morocco. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2015;26:810-5.

15. Moorani KN, Sherali AR. Histopathological pattern in childhood glomerulonephritis. J Pak Med Assoc. 2010;60:1006-9.

16. Schmidt S, Ritz E. Genetic factors in IgA nephropathy. Ann Med Interne (Paris). 1999;150:86-90.

17. Gharavi AG, Kiryluk K, Choi M, Li Y, Hou P, Xie J i sur. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for IgA nephropathy. Nat Genet. 2011;43:321-7.

18. Chang S, Li XK. The role of immune modulation in pathogenesis of IgA nephropathy. Front Med (Lausanne). 2020;24:92.

19. Imig JD, Ryan MJ. Immune and inflammatory role in renal disease. Compr. Physiol. 2013;3:957-76.

20. Rodrigues JC, Haas M, Reich HN. IgA nephropathy. Clin J Am Soc Nephrol. 2017;12:677-86.

21. Yuzawa Y, Yamamoto R, Takahashi K, Katafuchi R, Tomita M, Fujigaki Y i sur. Evidence-based clinical practice guidelines for IgA nephropathy 2014. Clin Exp Nephrol. 2016;20:511-35.

22. Yang S, Li A, Wang J, Liu J, Han Y, Zhang W i sur. Vitamin D receptor: A novel therapeutic target for kidney diseases. Curr Med Chem. 2018;25:3256-71.

23. Provvedini DM, Tsoukas CD, Deftos LJ, Manolagas SC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes. Science. 1983;221:1181-3.

24. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC i sur. Molecular mechanisms of vitamin D action. Calcif Tissue Int. 2013;92:77-98.

25. Hewison M, Zehnder D, Bland R, Stewart PM. 1alpha-hydroxylase and the action of vitamin D. J Mol Endocrinol. 2000;25:141-8.

26. Krmpotić-Nemanić J, Marušić A. Anatomija čovjeka. 2. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2007. 353-9 str.

27. Fanghanel J, Anderhuber F, Pera F, Nitsch R. Waldeyerova anatomija čovjeka. 17. izdanje. Zagreb: Golden marketing-tehnička knjiga; 2009. 486-9 str.

28. Junqueira L, Carneiro J. Osnove histologije. Zagreb: Školska knjiga; 2005. 383-401 str.

29. Agarwal SK, Sethi S, Dinda AK. Basics of kidney biopsy: a nephrologist's perspective. Indian J Nephrol. 2013;23:243-52.

30. Galešić K, Galešić Ljubanović D, Horvatić I, Božić B. Bolesti glomerula - primarne i sekundarne. 1. izdanje. Zagreb: Medicinska naklada; 2014. 31-148 str.

31. Berthoux FC, Mohey H, Afiani A. Natural history of primary iga nephropathy. Semin Nephrolog. 2008;28:4-9.

32. Roberts IS, Cook HT, Troyanov S, Alpers CE, Amore A, Barratt J i sur. The Oxford classification of IgA nephropathy: pathology definitions, correlations, and reproducibility. Kidney Int. 2009;76:546-56.

33. Cattran DC, Coppo R, Cook HT, Feehally J, Roberts IS, Troyanov S i sur. The Oxford classification of IgA nephropathy: rationale, clinicopathological correlations, and classification. Kidney Int. 2009;76:534-45.

34. Lee SM, Rao VM, Franklin WA, Schiffer MS, Aronson AJ, Spargo BH i sur. IgA nephropathy: morphologic predictors of progressive renal disease. Hum Pathol. 1982;13:314-22.

35. Roberts IS. Pathology of IgA nephropathy. Nat Rev Nephrol. 2014;10:445-54.

36. D'Amico G. Natural history of idiopathic IgA nephropathy and factors predictive of disease outcome. Semin Nephrol. 2004;24:179-86.

37. Walshe JJ, Brentjens JR, Costa GG, Andres GA, Venuto RC. Abdominal pain associated with IgA nephropathy. Possible mechanism. Am J Med. 1984;77:765-7.

38. MacDonald IM, Fairley KF, Hobbs JB, Kincaid-Smith P. Loin pain as a presenting symptom in idiopathic glomerulonephritis. Clin Nephrol. 1975;3:129-33.

39. Haas M. Histological subclassification of IgA nephropathy: a clinicopathologic study of 244 cases. Am J Kidney Dis. 1997;29:829-42.

40. Lee HS, Pyo HJ, Koh HI. Acute renal failure associated with hematuria in IgA nephropathy. Am J Kidney Dis. 1988;12:236-9.

41. Delclaux C, Jacquot C, Callard P, Kleinknecht D. Acute reversible renal failure with macroscopic haematuria in IgA nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 1993;8:195-9.

42. Haas M, Verhave JC, Liu ZH, Alpers CE, Barratt J, Becker JU i sur. A multicenter study of the predictive value of crescents in IgA Nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2017;28:691-701.

43. Le W, Liang S, Hu Y, Deng K, Bao H, Zeng C i sur. Long-term renal survival and related risk factors in patients with IgA nephropathy: results from a cohort of 1155 cases in a Chinese adult population. Nephrol Dial Transplant. 2012;27:1479-85.

44. Schena FP, Nistor I. Epidemiology of IgA nephropathy: a global perspective. Semin Nephrol. 2018;38:435-42.

45. Pontier PJ, Patel TG. Racial differences in the prevalence and presentation of glomerular disease in adults. Clin Nephrol. 1994;42:79-84.

46. Glassock RJ. Mortality risk in IgA nephropathy. J Am Soc Nephrol. 2019;30:720-2.

47. KDIGO. Clinical practice guideline for glomerulonephritis. Kidney Int. 2012;2:209–17.

48. Bumgardner GL, Amend WC, Ascher NL, Vincenti FG. Single-center long-term results of renal transplantation for IgA nephropathy. Transplantation.1998;65:1053-60.

49. Suzuki H, Kiryluk K, Novak J, Moldoveanu Z, Herr AB, Renfrow MB i sur. The pathophysiology of IgA nephropathy. J Am Soc of Nephrol. 2011;22:1795-803.

50. McGrogan A, Franssen CFM, de Vries CS. The incidence of primary glomerulonephritis worldwide: a systematic review of the literature. Nephrol Dial Transplant. 2011;26:414-30.

51. Schena FP. A retrospective analysis of the natural history of primary IgA nephropathy worldwide. Am J Med. 1990;89:209-15.

52. Ronkainen J, Ala-Houhala M, Autio-Harmainen H, Jahnukainen T, Koskimies O, Merenmies J i sur. Long-term outcome 19 years after childhood IgA nephritis: a retrospective cohort study. Pediatr Nephrol. 2006;21:1266-73.

53. Gutiérrez E, Carvaca-Fontán F, Luzardo L, Morales E, Alonso M, Praga M. A personalized update on IgA nephropathy: a new vision and new future challenges. Nephron. 2020;144:555-71.

54. Lin R, White JH. The pleiotropic actions of vitamin D. Bioessays. 2004;26:21-8.

55. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. J Clin Endocrinol Metab. 2009:94:26-34.

56. Baeke F, Takiishi T, Korf H, Gysemans C, Mathieu. Vitamin D: modulator of the immune system. Curr Opin Pharmacol. 2010;10:482-96.

57. Hewison, M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. Endocrinol Metab Clin North Am. 2010;39:365-79.

58. DeLuca HF. Evolution of our understanding of vitamin D. Nutr Rev. 2008;66:73-87.

59. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. Trends Biochem Sci. 2004;29:664-73.

60. Omdahl JL, Morris HA, May BK. Hydroxylase enzymes of the vitamin D pathway: expression, function, and regulation. Annu Rev Nutr. 2002;22:139-66.

61. Townsend K, Evans KN, Campbell MJ, Colston KW, Adams JS, Hewison M. Biological actions of extra-renal 25-hydroxyvitamin D-1alpha-hydroxylase and implications for chemoprevention and treatment. J Steroid Biochem Mol Biol. 2005;97:103-9.

62. Cross HS, Bareis P, Hofer H, Bischof MG, Bajna E, Kriwanek S i sur. 25-hydroxyvitamin D(3)-1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor gene expression in human colonic mucosa is elevated during early cancerogenesis. Steroids. 2001;66:287-92.

63. Armbrecht HJ, Hodam TL, Boltz MA. Hormonal regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase and 24-hydroxylase gene transcription in opossum kidney cells. Arch Biochem Biophys. 2003;409:298-304.

64. Jones G, Prosser DE, Kaufmann M. 25-hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D. Arch Biochem Biophys. 2012;523(1):9-18.

65. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. Physiol Rev. 2016;96:365–408.

66. Clemens TL, Garrett KP, Zhou XY, Pike JW, Haussler MR, Dempster DW. Immunocytochemical localization of the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in target cells. Endocrinology. 1988;122:1224-30.

67. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF i sur. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. Endocr Rev. 2008;29:726-76.

68. Palacios C, Gil K, Perez CM, Joshipura K. Determinants of vitamin D status among overweight and obese Puerto Rican adults. Ann Nutr Metab. 2012;60:35-43.

69. Looker AC, Pfeiffer CM, Lacher DA, Schleicher RL, Picciano MF, Yetley EA. Serum 25-hydroxyvitamin D status of the US population: 1988–1994 compared with 2000–2004. Am J Clin Nutr. 2008;88:1519-27.

70. Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status. Am J Clin Nutr. 2008;87:1087-91.

71. Holick MF. The vitamin D deficiency pandemic and consequences for nonskleletal health: mechanisms of action. Mol Aspects Med. 2008;29:361-8.

72. Laktasic-Zerjavic N, Korsic M, Crncevic-Orlic Z, Kovac Z, Polasek O, Soldo-Juresa D. Vitamin D status, dependence on age, and seasonal variations in the concentration of vitamin D in Croatian postmenopausal women initially screened for osteoporosis. Clin Rheumatol. 2010;29:861-7.

73. Vranešić Bender D, Giljević Z, Kušec V, Laktašić Žerjavić N, Bošnjak Pašić M, Vrdoljak E i sur. Smjernice za prevenciju, prepoznavanje i liječenje nedostatka vitamina D u odraslih. Lijec Vjesn. 2016;138:121-32.

74. Spiro A, Buttriss JL. Vitamin D: an overview of vitamin D status and intake in Europe. Nutr Bull. 2014;39:322-50.

75. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1alpha,25(OH)(2)vitamin D(3): genomic and non-genomic mechanisms. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2011;25:543-59.

76. Sun J. Vitamin D and mucosal immune function. Curr Opin Gastroenterol. 2010;26:591-5.

77. Holick MF, Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. Ann Epidemiol. 2009.19:73-8.

78. Chung M, Lee J, Terasawa T, Lau J, Trikalinos TA. Vitamin D with or without calcium supplementation for prevention of cancer and fractures: an updated meta-analysis for the U.S. Preventive services task force. Ann Intern Med. 2011;155:827-38.

79. Strawn WB, Chappell MC, Dean RH, Kivlighn S, Ferrario CM. Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia. Circulation. 2000;101:1586-93.

80. Kristal-Bonch E, Froom P, Harari G, Ribak J. Association of calcitriol and blood pressure in normotensive men. Hypertension. 1997;30:1289-94.

81. Wang L, Song Y, Manson JE, Pilz S, März W, Karl Michaëlsson K i sur. Circulating 25-hydroxy-vitamin D and risk of cardiovascular disease: a meta-analysis of prospective studies. Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2012;5:819-29.

82. Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. JAMA. 2006;296:2832-8.

83. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. Diabetologia. 2005;48:1247-57.

84. Dong JY, Zhang WG, Chen JJ, Zhang ZL, Han SF, Qin LQ. Vitamin D intake and risk of type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies. Nutrients. 2013;5:3551-62.

85. Luong KVQ, Nguyen LTH. The role of vitamin D in autoimmune hepatitis. J Clin Med Res. 2013;5:407-15.

86. Fletcher J, Cooper SC, Ghosh S, Hewison M. The role of vitamin D in inflammatory bowel disease: mechanism to management. Nutrients. 2019;11:1019.

87. Hassanalilou T, Khalili L, Ghavamzadeh S, Shokri A, Payahoo L, Bishak YK. Role of vitamin D deficiency in systemic lupus erythematosus incidence and aggravation. Auto Immun Highlights. 2018;9:1.

88. Cutolo M, Otsa K, Uprus M, Paolino S, Seriolo B. Vitamin D in rheumatoid arthritis. Autoimmunity Rev. 2007;7:59-64.

89. Deluca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. FASEB J. 2001;15:2579-85.

90. Agmon-Levin N, Mosca M, Petri M, Shoenfeld Y. Systemic lupus erythematosus one disease or many? Autoimmun Rev. 2012:11:593-5.

91. Arapović A, Vukojević K, Filipović N, Glavina Durdov M, Ljubanović-Galešić D, Saraga-Babić M i sur. Epidemiology of 10-year paediatric renal biopsies in the region of southern Croatia. BMC Nephrol. 2020;21:65.

92. Arapović A, Vukojević K, Glavina Durdov M, Benzon B, Šolić I, Racetin A i sur. Expression of renal vitamin D receptors and metabolizing enzymes in IgA nephropathy. Acta Histochem. 202;123:151740.

93. Hammer O, Harper D, Ryan P. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica. 2001;4:1-9.

94. Fidan K, Isik Gonul I, Buyukkaragoz B, Isiyel E, Arinsoy T, Soylemezoglu O. Changing trends in pediatric renal biopsies: analysis of pediatric renal biopsies in national nephrology registry data. Ren Fail. 2016;38:1228-33.

95. Jiang M, Xiao Z, Rong L, Xu Y, Chen L, Mo Y i sur. Twenty-eight-year review of childhood renal diseases from renal biopsy data: a single Centre in China. Nephrology (Carlton). 2016;21:1003-9.

96. Mubarak M, Kazi JI, Shakeel S, Lanewala A, Hashmi S. The spectrum of histopathological lesions in children presenting with steroid-resistant nephrotic syndrome at a single center in Pakistan. ScientificWorldJournal. 2012;2012:681802.

97. Boyer O, Moulder JK, Somers MJ. Focal and segmental glomerulosclerosis inchildren: a longitudinal assessment. Pediatr Nephrol. 2007;22:1159-66.

98. Shah SS, Akhtar N, Sunbleen F, ur Rehman MF, Ahmed T. Histopathological patterns in Paediatric idiopathic steroid resistant Nephrotic syndrome. J Ayub Med Coll Abbottabad. 2015;27:633-6.

99. Khoo JJ, Pee S, Thevarajah B, Yap YC, Chin CK. Biopsy-proven childhood glomerulonephritis in Johor. Med J Malaysia. 2004;59:218-25.

100. Rychlik I, Jancova E, Tesar V, Kolsky A, Lacha J, Stejskal J i sur. The Czech registry of renal biopsies. Occurrence of renal diseases in the years 1994-2000. Nephrol Dial Transplant. 2004;19:3040-9.

101. Madani A, Fahimi D, Esfehani ST, Mohsseni P, Atayee N, Ahmadi M i sur. Glomerular diseases in Iranian children: clinico-pathological correlations. Pediatr Nephrol. 2003;18:925-8.

102. Hussain F, Mallik M, Marks SD, Watson AR. Renal biopsies in children: current practice and audit of outcomes. Nephrol Dial Transplant. 2010;25:485-9.

103. Zhai Y, Xu H, Shen Q, Cao Q, Zhu G, Wei M i sur. Renal histological features of school-age children with asymptomatic haematuria and/or proteinuria: a multicenter study. Nephrology (Carlton). 2014;19:426-31.

104. Lopez-Gomez JM, Rivera F. Renal biopsy findings in acute renal failure in the cohort of patients in the Spanish registry of glomerulonephritis. Clin J Am Soc Nephrol. 2008;3:674-81.

105. Maixnerova D, Jancova E, Skibova J, Rysava R, Rychlik I, Viklicky O i sur. Nationwide biopsy survey of renal diseases in the Czech Republic during the years 1994-2011. J Nephrol. 2015;28:39-49.

106. Wang N, Zhu T, Tao Y. Clinicopathological features of pediatric renal biopsies in the plateau regions of China. J Int Med Res. 2018;46:4539-46.

107. Yoshikawa N, Tanaka R, Iijima K. Pathophysiology and treatment of IgA nephropathy in children. Pediatr Nephrol. 2001;16:446-57.

108. Zhou TB, Lin N, Qin YH, Liu YG. Distribution of pathological finding in the children with nephrotic syndrome from Guangxi. Saudi J Kidney Dis Transpl. 2014;25:684-8.

109. Coppo R, Troyanov S, Bellur S, Cattran D, Cook HT, Feehally J i sur. Validation of the Oxford classification of IgA nephropathy in cohorts with different presentations and treatments. Kidney Int. 2014;86:828-36.

110. Hamed RM. The spectrum of chronic renal failure among Jordanian children. J Nephrol. 2002;15:130-5.

111. Anonimous. The primary nephrotic syndrome in children. Identification of patients with minimal change nephrotic syndrome from initial response to prednisone. A report of the International study of kidney disease in children. J Pediatr. 1981;98:561-4.

112. Soylemezoglu O, Ozkaya O, Ozen S, Bakkaloglu A, Dusunsel R, Peru H i sur. Henoch-Schonlein nephritis: a nationwide study. Nephron Clin Pract. 2009;112:199-204.

113. Savige J, Ariani F, Mari F, Bruttini M, Renieri A, Gross O i sur. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. Pediatr Nephrol. 2019;34:1175-89.

114. Koskela M, Ylinen E, Ukonmaanaho EM, Autio-Harmainen H, Heikkila P, Lohi J i sur. The ISKDC classification and a new semiquantitative classification for predicting outcomes of Henoch-Schonlein purpura nephritis. Pediatr Nephrol. 2017;32:1201-9.

115. Devasahayam J, Erode-Singaravelu G, Bhat Z, Oliver T, Chandran A, Zeng X i sur. C1q nephropathy: the unique Underrecognized pathological entity. Anal Cell Pathol (Amst). 2015;2015:490413.

116. Galesic K, Horvatic I, Batinic D, Milosevic D, Saraga M, Durdov MG i sur. C1q nephropathy: case reports and literature review. Lijec Vjesn. 2015;137:283-7.

117. Kersnik Levart T, Kenda RB, Avgustin Cavic M, Ferluga D, Hvala A, Vizjak A. C1Q nephropathy in children. Pediatr Nephrol. 2005;20:1756-61.

118. Markowitz GS, Schwimmer JA, Stokes MB, Nasr S, Seigle RL, Valeri AM i sur. C1q nephropathy: a variant of focal segmental glomerulosclerosis. Kidney Int. 2003;64:1232-40.

119. Churg A, Brallas M, Cronin SR, Churg J. Formes frustes of Churg-Strauss syndrome. Chest. 1995;108:320-3.

120. Colvin R, Chang A. Diagnostic pathology: kidney diseases. Amsterdam: Elsevier; 2016.

121. Adorini, L. Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists. Cellular immunology. 2005;233:115-24.

122. Kuhlmann A, Haas CS, Gross ML, Reulbach U, Holzinger M, Schwarz U i sur. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 decreases podocyte loss and podocyte hypertrophy in the subtotally nephrectomized rat. Am J Physiol Renal Physiol. 2004; 286:526-33.

123. Mizobuchi M, Morrissey J, Finch JL, Martin DR, Liapis H, Akizawa T i sur. Combination therapy with an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a vitamin D analog suppresses the progression of renal insufficiency in uremic rats. J Am Soc of Nephrol. 2007;18:1796-806.

124. Panichi V, Migliori M, Taccola D, Filippi C, De Nisco L, Giovannini L i sur. Effects of 1,25(OH)2D3 in experimental mesangial proliferative nephritis in rats. Kidney Int. 2001;60:87-95.

125. Yang L, Ma J, Zhang X, Fan Y, Wang L. Protective role of the vitamin D receptor. Cell Immunol. 2012;279:160-6.

126. Ye JJ, Zhou TB, Zhang YF, Wang Q, Su YY, Tang JM i sur. Levels of vitamin D receptor and CYP24A1 in patients with end-stage renal disease. Afr Health Sci. 2016;16:462-7.

127. Mo MQ, Pan L, Tan L, Jiang L, Pan YQ, Li FJ i sur. Association between VDR gene FokI polymorphism and renal function in patients with IgA nephropathy. PeerJ. 2019;7:e7092.

128. Shi M, Ouyang Y, Yang M, Yang M, Zhang X, Huang W i sur. IgA nephropathy susceptibility loci and disease progression. Clin J Am Soc Nephrol. 2018;13:1330-8.

129. Wang Y, Borchert ML, DeLuca HF. Identification of the vitamin D receptor in various cells of the mouse kidney. Kidney Int. 2012;81:993-1001.

130. Andress DL. Vitamin D in chronic kidney disease: a systemic role for selective vitamin D receptor activation. Kidney Int. 2006;69:33-43.

131. Ravani P, Malberti F, Tripepi G, Pecchini P, Cutrupi S, Pizzini P i sur. Vitamin D levels and patient outcome in chronic kidney disease. Kidney Int. 2009;75:88-95.

132. Adorini L, Penna G. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. Hum Immunol. 2009;70:345-52.

133. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. Chem biol. 2014;21:319-29.

134. Lang CL, Wang MH, Chiang CK, Lu KC. Vitamin D and the immune system from the nephrologist's viewpoint**.** ISRN Endocrinol. 2014;2014:105456.

135. Cravedi P, Ruggenenti P, Remuzzi G. Proteinuria should be used as a surrogate in CKD. Nat Rev Nephrol. 2012;8:301-6.

136. Levey AS, Cattran D, Friedman A, Miller WG, Sedor J, Tuttle K i sur. Proteinuria as a surrogate outcome in CKD: report of a scientific workshop sponsored by the National Kidney Foundation and the US Food and Drug Administration. Am J Kidney Dis. 2009;54:205-26.

137. Li XH, Huang XP, Pan L, Wang CY, Qin J, Nong FW i sur. Vitamin D deficiency may predict a poorer outcome of IgA nephropathy. BMC Nephrol. 2016;17:164.

138. Szeto CC, Chow KM, Kwan BC, Chung KY, Leung CB, Li PK. Oral calcitriol for the treatment of persistent proteinuria in immunoglobulin A nephropathy: an uncontrolled trial. Am J Kidney Dis. 2008;51:724-31.

139. Liu LJ, Lv JC, Shi SF, Chen YQ, Zhang H, Wang HY. Oral calcitriol for reduction of proteinuria in patients with IgA nephropathy: a randomized controlled trial. Am J Kidney Dis. 2012;59:67-74.

140. Tan X, Wen X, Liu Y. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D receptor-mediated sequestration of NF-kappaB signaling. J Am Soc Nephrol. 2008;19:1741-52.

141. Zehnder D, Quinkler M, Eardley KS, Bland R, Lepenies J, Hughes SV i sur. Reduction of the vitamin D hormonal system in kidney disease is associated with increased renal inflammation. Kidney Int. 2008;74:1343-53.

142. Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. Endocrinol Metab Clin North Am. 2010;39:365-79.

143. Ishimura E, Nishizawa Y, Inaba M, Matsumoto N, Emoto M, Kawagishi T i sur. Serum levels of 1,25-dihydroxyvitamin D, 24,25-dihydroxyvitamin D, and 25-hydroxyvitamin D in nondialyzed patients with chronic renal failure. Kidney Int. 1999;55:1019-27.

144. Wu S, Ren S, Nguyen L, Adams JS, Hewison M. Splice variants of the CYP27b1 gene and the regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 production. Endocrinology. 2007;148:3410-8.

145. LaClair RE, Hellman RN, Karp SL, Kraus M, Ofner S, Li Q i sur. Prevalence of calcidiol deficiency in CKD: a cross-sectional study across latitudes in the United States. Am J Kidney Dis. 2005;45:1026-33.

146. Viaene L, Evenepoel P, Meijers B, Vanderschueren D, Overbergh L, Mathieu C. Uremia suppresses immune signal-induced CYP27B1 expression in human monocytes. Am J Nephrol. 2012;36:497-508.

9. SAŽETAK

Perkutana biopsija bubrega izvodi se u KBC-u Split kontinuirano od 1994. Stroge indikacije za invazivni zahvat obuhvaćaju poznate bubrežne sindrome. Bubrežno tkivo se nakon postavljanja dijagnoze može naknadno analizirati radi novih biljega, važnih u patogenezi bubrežnih bolesti. Bubreg je mjesto aktivacije vitamina D koji ima pleiotropni povoljni učinak na organizam. Zbog bubrežne bolesti kompleksni mehanizam regulacije vitamina D može biti poremećen. Istražili smo izražaj receptora za vitamin D (VDR) te enzima aktivacje (1α-OHaza) i razgradnje (CYP24A1) vitamina D u bioptatima bubrega bolesnika s IgA nefropatijom (IgAN) i usporedili s kontrolnim tkivima.

Za epidemiološku analizu prikupljeni su klinički i patološki padaci o 54 bolesnika bioptirana na Klinici za dječje bolesti od 2008. do 2017. Za eksperimentalnu analizu prikupljeni su arhivirani parafinski blokovi bubrežnog tkiva 12 bolesnika s IgAN-om (šestero djece i šestero odraslih). Izrezani su preparati debljine 5 μm, standardno priređeni za indirektno imunohistokemijsko bojenje protutijelima na VDR, 1α-OHazu i CYP24A1, analizirani na imunofluoroscencijskom mikroskopu, fotografirani i kvantificirani uporabom ImageJ računalnog programa. U statističkoj analizi je značajnim smatran $P < 0,05$.

U epidemiološkoj analizi, od 54 ispitanika, 29 je bilo muškog i 25 ženskog spola, srednja dob 9,84 ± 5,4 godine. Polovina indikacija za biopsiju otpada na nefrotski sindrom (NS; 25,93%) i ne-nefrotsku proteinuriju s hematurijom (22,22%). Najčešće je dijagnosticirana IgAN, a potom bolest minimalnih promjena (MCD), Henoch-Schönlein nefritis (HSPN), fokalna segmentalna glomeruloskleroza (FSGS) i Alportov sindrom (AS). Spektar dijagnoza se promijenio u odnosu na prethodno analizirano razdoblje 1995 – 2005. jer je mali postotak prethodno često dijagnosticiranog mezangioproliferativnog glomerulonefritisa (MesPGN). Na promjene u indikacijama i veći broj bioptiranih s IH-om i ne-nefrotskom proteinurijom s hematurijom utjecale su nove klasifikacije i mogućnost boljeg dijagnosticiranja hereditarnih bolesti glomerularne bazalne membrane (GBM). U eksperimentalnoj analizi, izražaj VDR-a u bubrežnom tkivu je značajno veći u bolesnika s IgAN-om nego u kontroli ($P = 0,037$), a izražaj 1α-OHaze značajno manji nego u kontroli ($P < 0,001$). Izražaj CYP24A1 i postotak jezgara imunoreaktivnih na CYP24A1 u glomerulima i epitelu distalnih kanalića je značajno veći u bolesnika s IgAN-om nego u kontrolnim tkivima

($P < 0,001$). Postotak nuklearnog izražaja CYP24A1 u epitelu proksimalnih kanalića pokazuje negativnu korelaciju s eGFR ($P = 0,034$).

Raspodjela indikacija i patoloških nalaza slična je podacima iz većine drugih studija. Razlika u izražaju VDR-a i enzima povezanih s aktivacijom i degradacijom vitamina D upućuje na smanjenu proizvodnju kalcitriola i povećanu razgradnju vitamina D u bubregu bolesnika s IgAN-om.

10. SUMMARY

Percutaneous kidney biopsy has been performed at University Hospital of Split continuously since 1994. Strict indications for invasive procedure include well- known renal syndromes. After diagnosis, renal tissue can be subsequently analyzed for new markers, important in the pathogenesis of renal disease. The kidney is the site of activation of vitamin D, which has a pleiotropic beneficial effect on the body. Due to kidney disease, the complex mechanism of vitamin D regulation can be disrupted. We investigated the expression of vitamin D receptor (VDR) and the enzymes of activation (1α-OHase) and degradation (CYP24A1) of vitamin D in kidney biopsies of patients with IgA nephropathy (IgAN) and compared it with control.

For epidemiological analysis, clinical and pathological data were collected on 54 patients biopsied in the Clinic for Children´s Diseases from 2008 to 2017. For experimental analysis, archived paraffin blocks of renal tissue of 12 patients with IgAN (6 children and 6 adults) were collected. Five μm thick slides, standardly prepared for indirect immunohistochemical staining with antibodies to VDR, 1α-OHase and CYP24A1, were analyzed on an immunofluorescence microscope, photographed and quantified using an Image J computer program. In the statistical analysis, $P < 0.05$ was considered significant.

In the epidemiological analysis, out of the 54 patients, 29 were male and 25 female; mean age 9.84 ± 5.4 years. Half of the biopsyindications are nephrotic syndrome (NS; 25.93%) and non-nephrotic proteinuria with hematuria, 22.22%. IgAN was most commonly diagnosed, followed by minimal change disease (MCD), Henoch-Schönlein purpura nephritis (HSPN), focal segmental glomerulosclerosis (FSGS), and Alport syndrome (AS). The spectrum of diagnoses changed compared to the previously analyzed period 1995 – 2005 because a small percentage of previously frequently diagnosed mesangioproliferative glomerulonephritis (MesPGN). Changes in indications were influenced by new classifications and the possibility of better diagnosis of hereditary disease of the glomerular basement membrane (GBM). In the experimental analysis, the expression of VDR in renal tissue was higher in patients with IgAN ($P = 0.037$), and the expression of 1α-OHase was significantly lower than in control ($P < 0.001$). CYP24A1 expression in renal tissue, as well as the percentage of positive nuclei int he glomeruli and epithelium of distal tubules were higher in patients with IgAN than in control ($P < 0.001$). The percentage of nuclear CYP24A1

expression in the epithelium of the proximal tubules shows a negative correlation with the estimated glomerular filtration (eGFR; P = 0.034).

The distribution of indications and pathological findings is similar to that of most other studies. The difference in the expression of VDR and enzymes associated with vitamin D activation and degradation suggests decreased calcitriol production and increased renal degradation of vitamin D in patients with IgAN.

11. ŽIVOTOPIS

Osobni podatci

Ime i prezime: ADELA ARAPOVIĆ
Adresa: Tavelićeva 48, 21 000 Split
E mail: abram87@yahoo.com
Godina rođenja: 1968.

Obrazovanje

Osnovnu školu i prva dva razreda srednjeg obrazovanja završila sam u Makarskoj, a zadnja dva razreda u Splitu (Zdravstvena škola, zanimanje - medicinska sestra).
Diplomirala sma na medicinskom fakultetu u Splitu - Sveučilište u Zagrebu 1999.

Radno iskustvo

Nakon dvogodišnjeg pripravničkog staža u DZ Makarska položila sam državni ispit 2001, radila u DZ Makarska kao liječnik opće prakse i specijalist pedijatar do 2008.
Od prosinca 2008. zaposlenica sam KBC-a Split - Klinika za dječje bolesti- Zavod za dječju nefrologiju s gastroenterologijom i hepatologijom.

Znanstveno i stručno usavršavanje:

Poslijediplomski studij iz Kliničke pedijatrije na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu završila sam 2005.
Specijalistički ispit iz pedijatrije položila sam 2006.
Subspecijalistički ispit iz pedijatrijske nefrologije položila sam 2016.
Ministarstvo zdravstva priznalo mi je naziv primarijus 2018.
Asistentica sam na medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu, znanstveno polje – Kliničke medicinske znanosti, grana - Pedijatrija od 2013.
Poslijediplomski znanstveni studij „Biologija novotvorina“ pri Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Splitu završila sam 2021.

Stručno subspecijalističko usavršavanje:

Poslijediplomski tečaj I kategorije „Ultrazvuk u kliničkoj praksi - ultrasonografska dijagnostika abdomena“, Split - 2009.

Individualni poslijediplomski tečaj I kategorije „Ultrazvuk u kliničkoj praksi - ultrazvučna dijagnostika organa mokraćnog sustava i nadbubrežnih žlijezda u djece“, Split - 2010.
Edukacija iz kronične hemodijalize, plazmafereze i praćenja transplantirane djece -Slovenija, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Pediatrična klinika u trajanju od 5 tjedana - 2012.
„Regional Enuresis Spring School Ljubljana“, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Slovenija - 2015.
Poslijediplomski tečaj stalnog medicinskog usavršavanja I kategorije - DIJALIZA (250 sati) iz područja liječenja metodama dijalize u organizaciji Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu i Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju HLZ-a i stekla Potvrdnicu o osposobljenosti za rad u Centrima za dijalizu sukladno pravilniku o minimalnim uvjetima u pogledu prostora, radnika i medicinsko-tehničke opreme za obavljanje zdravstvene djelatnosti dijalize. - 2016.
Dialysis master class, Dyalisis working group of the ESPN, Athens - 2016.
Radionica „Klinička primjena ultrazvučnog kontrastnog sredstva“, KB Dubrava Zagreb 2017.
Praktična radionica „Biopsija bubrega i algoritmi liječenja primarnih glomerularnih bolesti“, KBC Zagreb-2018.

Član sam Hrvatske liječnike komore, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatskog pedijatrijskog društva i Hrvatskog pedijatrijskog društva - ogranak Split, Hrvatskog društva za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju kao i Hrvatskog pedijatrijskog nefrološkog društva.

Strani jezik (aktivno)

engleski

Stručni i/ili znanstveni radovi:

Radovi indeksirani u Science Citation Indeks Expanded (SCIE):

1. Ilić T, Gračan S, **Arapović A**, Capkun V, Subat-Dežulović M, Saraga M. Changes in bacterial resistance patterns in children with urinary tract infections on antimicrobial prophylaxis at University Hospital in Split. Med Sci Monit. 2011;17:CR355-61.

2. Sanna-Cherchi S, Kiryluk K, Burgess KE, Bodria M, Sampson MG, Hadley D, Nees SN, Verbitsky M, Perry BJ, Sterken R, Lozanovski VJ, Materna-Kiryluk A, Barlassina C, Kini A,

Corbani V, Carrea A, Somenzi D, Murtas C, Ristoska-Bojkovska N, Izzi C, Bianco B, Zaniew M, Flogelova H, Weng PL, Kacak N, Giberti S, Gigante M**, Arapovic A**, et al. Copy-number disorders are a common cause of congenital kidney malformations. Am J Hum Genet. 2012;91:987-97.

3. Barić A, Marković V**, Arapović A**, Prgomet S, Saraga M. Gastrointestinal lymphorrhea diagnosed by exercise lymphoscintigraphy. Clin Nucl Med. 2016;41:e520-e521.

4. Lopez-Rivera E, Liu YP, Verbitsky M, Anderson BR, Capone VP, Otto EA, Yan Z, Mitrotti A, Martino J, Steers NJ, Fasel DA, Vukojevic K, Deng R, Racedo SE, Liu Q, Werth M, Westland R, Vivante A, Makar GS, Bodria M, Sampson MG, Gillies CE, Vega-Warner V, Maiorana M, Petrey DS, Honig B, Lozanovski VJ, Salomon R, Heidet L, Carpentier W, Gaillard D, Carrea A, Gesualdo L, Cusi D, Izzi C, Scolari F, van Wijk JA**, Arapovic A**, Saraga-Babic M, Saraga M, et al. Genetic drivers of kidney defects in the DiGeorge syndrome. N Engl J Med. 2017;376:742-754.

5. Sanna-Cherchi S, Khan K, Westland R, Krithivasan P, Fievet L, Rasouly HM, Ionita-Laza I, Capone VP, Fasel DA, Kiryluk K, Kamalakaran S, Bodria M, Otto EA, Sampson MG, Gillies CE, Vega-Warner V, Vukojevic K, Pediaditakis I, Makar GS, Mitrotti A, Verbitsky M, Martino J, Liu Q, Na YJ, Goj V, Ardissino G, Gigante M, Gesualdo L, Janezcko M, Zaniew M, Mendelsohn CL, Shril S, Hildebrandt F, van Wijk JAE**, Arapovic A**, Saraga M, et al. Exome-wide association study identifies GREB1L mutations in congenital kidney malformations. Am J Hum Genet. 2017;101(5):789-802. Erratum in: Am J Hum Genet. 2017;101:1034.

6. Prgomet S, Lukšić B, Pogorelić Z, Jurić I, Čapkun V**, Arapović A**, Boban N. Perinatal risk factors in newborns with gastrointestinal perforation. World J Gastrointest Surg. 2017;9:46-52.

7. **Arapović A**, Prgomet S, Saraga M, Kovačević T, Prohászka Z, Despot R, Marušić E, Radić J. Association of appendicitis, Helicobacter pylori positive gastritis and thrombotic thrombocytopenic purpura in an Adolescent. Am J Case Rep. 2019;31;20:131-133.

8. **Arapović A**, Vukojević K, Filipović N, Glavina Durdov M, Ljubanović-Galešić D, Saraga-Babić M, Prgomet S, Simičić Majce A, Belavić A, Borić Škaro D, Ljutić D, Saraga M. Epidemiology of 10-year paediatric renal biopsies in the region of southern Croatia. BMC Nephrol. 2020;26;21:65.

9. **Arapović A**, Punda A, Brdar D, Čapkun V, Bajo D, Veljačić D, Punda H, Simičić-Majce A, Saraga-Babić M, Vukojević K, Saraga M. Types of parenchymal changes diagnosed on DMSA scans of kidneys affected by different grades of vesicoureteral reflux. Med Sci Monit. 2021;1;27:e929617.

10. Simicic Majce A, **Arapovic A**, Saraga-Babic M, Vukojevic K, Benzon B, Punda A, Saraga M. Intrarenal reflux in the light of contrast-enhanced voiding urosonography. Front Pediatr. 2021;2;9:642077.

11. **Arapović A**, Vukojević K, Glavina Durdov M, Benzon B, Šolić I, Racetin A, Jurić M, Čujić T, Kosović I, Lozić M, Borić Škaro D, Ljutić D, Saraga-Babić M, Simičić Majce A, Saraga M, Filipović N. Expression of renal vitamin D receptors and metabolizing enzymes in IgA nephropathy. Acta Histochem. 2021:123:151740.

Ostali radovi u časopisima:

1. Košuljandić D, **Arapović A,** Rogulj M, Tomasović M, Čulić V, Meštrović J et al. Galloway Mowat syndrome: Case report [Sindrom Galloway-Mowat-Prikaz bolesnika] Paediatr Croat. 2014;58:142-5.

2. Todorić J, Budimir D, Saraga M, Košuljandić D, **Arapović A,** Šušnjar T et al. Vesicoureteral reflux: Etiology, clasification and diagnostic investigation [Vezikoureteralni refluks: Etiologija, dijagnostika i podjela] Paediatr Croat. 2014;58:115-8.

3. Drnasin K, Saraga M, Bilić E, Roganović J, Čulić S, Rajić LJ, Stepan Giljević J, Trutin Ostović K, **Arapović A,** et al. Postnatalni ultrazvučni probir mokraćnog sustava. Paediatr Croat. 2015.

4. Herceg-Čavrak V, Šarić D, Kniewald H, Tokić Pivac V, Ćuk M, Trutin I, Košuljandić Đ, **Arapović A**, Balažin D, Musil V, Jureša V, Jelaković B, Benco N, Valent Morić B. Praktične smjernice za dijagnostiku i liječenej arterijske hipertenzije u djece i adolescenata. Medix 2019;138:1-50.

Radovi u Zbornicima radova:

1. Drnasin K, Saraga M, Bilić E, Roganović J, Čulić S, Rajić LJ, Stepan Giljević J, Trutin Ostović K, **Arapović A,** et al. Postnatalni ultrazvučni probir mokraćnog sustava. Hrvatska proljetna pedijatrijska škola, XXXII. seminar, Zbornik radova za medicinske sestre. Split, 20-24. travnja 2015.

2. **Arapović A,** Prgomet S, Saraga M. Glomerulonefritis. Hrvatska proljetna pedijatrijska škola, XXXII. seminar, Zbornik radova za medicinske sestre. Split, 20-24. travnja 2015.

Priopćenja na stručnim i/ili znanstvenim skupovima:

1. **Arapović A**, Valić I, Meštrović M. Akutni demijelinizirajući encefalomijelitis (ADEM) - prikaz bolesnice. XXII. stručni sastanak pedijatara Dalmacije, Cavtat, 15. studenoga 2003. Poster.

2. Sanna-Cherchi S, Kiryluk K, Burgess KE, Bodria M, Sampson MG, **Arapović A** et. al. High frequency of genomic disorders in patients with congenital kidney malformations. PEDIATRIC NEPHROLOGY 2012;27:1621-2. Meeting Abstract.

3. **Arapović A,** Prgomet S, Saraga M. Glomerulonefritis. Proljetna pedijatrijska škola, Split, 20-24 travnja 2015. Predavanje.

4. **Arapović A**, Markić J. Prikaz bolesnika s trombotičnom trombocitopeničnom purpurom. Simpozij: Liječenje akutne ozljede bubrega kod djece, Zagreb, 29. travanj 2016. Predavanje.

5. **Arapović A**, Prgomet S. Enureza kod djece - primjeri iz prakse, Stručni sastanak Hrvatskog pedijatrijskog društva - Ogranak Split. Dubrovnik 8. lipnja 2017. Predavanje.

6. **Arapović A**, Saraga M. Proteinurija kod djece. Stručni sastanak Hrvatskog pedijatriskog nefrološkog društva, Varaždin, 22. rujna 2017. Predavanje.

7. Saraga M, Fridl V, Zekić Tomaš S, **Arapović A**, Prgomet S, Čulić V. The new mutation in PKD2 gene for early onset of ADPKD. 50th Anniversary Meeting of the European Society for Paediatric Nephrology, Glasgow, 6th-9th September 2017. PEDIATRIC NEPHROLOGY 2017;32:1759. Meeting Abstract.

8. **Arapović A**, Saraga M. Proteinurije kod djece. Stručni sastanak Hrvatskog pedijatriskog društva, ogranak, Split, 25. listopada 2017. Predavanje.

9. **Arapović A**. Cistinurija u djece. Tečaj: Rijetke bolesti u Republici Hrvatskoj - nefrologija. Diferencijalna dijagnostika trombotičkih mikroangiopatija, cistinoze, cistinurije i ANCA-vaskulitisi u djece. HLZ, Hrvatsko pedijatrijsko društvo - Ogranak Split, Kl. za dječje bolesti-KBC Split, 16. ožujka 2018. Predavanje.

10. **Arapović A.** Enureza kod djece. XXVIII. sastanak pedijatara Dalmacije, Solin, 24. ožujka 2018. Predavanje.

11. **Arapović A**, Vukojević K, Filipović N, Glavina-Durdov M, Galešić Ljubanović D, Saraga-Babić M, Prgomet S, Simičić Majce A, Saraga M. Epidemiologija 10-godišnjeg razdoblja biopsije dječjih bubrega u južnoj Hrvatskoj. 13. kongres hrvatskog pedijatrijskog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, 11.-14.10.2018. Poster.

12. **A. Arapovic,** I. Solic, A. Racetin, M. Juric, T. Cujic, I. Kosovic, D. Boric, D. Ljutic, M. Saraga-Babic, K. Vukojevic, M. Glavina Durdov, S. Prgomet, A. Simicic Majce, M. Saraga, N. Filipovic. Expression of renal vitamin D receptors and metabolizing enzymes in IgA nephropathy. 18th Congress International Pediatric Nephrology Association , Venice, Italy, 17. - 21.10.2019. IPNA, PEDIATRIC NEPHROLOGY 2019;34:1988 Meeting Abstract and Poster.

Međunarodni skupovi i domaći skupovi s međunarodnim sudjelovanjem:

1. Todorić J**,** Budimir D, Pogorelić Z, Saraga M, **Arapović A**, Šušnjar T, Biočić M. Treatment of hydronephrosis using the „double J“ prohesis in children, XII. simpozij iz dječije kirurgije i urologije, Mostar, svibanj 2015. Predavanje.

2. Budimir D, Todorić J, Milunović KP, Pogorelić Z, Saraga M, **Arapović A,** Prgomet S. Chyluria - rare urolologic manifestation of the lymphatic system disease - Case Report, XII. simpozij iz dječije kirurgije i urologije, Mostar, svibanj 2015. Predavanje.

3. Budimir D, Todorić J, Milunović KP, Pogorelić Z, Saraga M, **Arapović A,** Prgomet S. Chyluria - rare urolologic manifestation of the lymphatic system disease - Case Report, 7. Hrvatski kongres dječje kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek, 7.- 11. listopada 2015. Predavanje.

4. Todorić J**,** Budimir D, Pogorelić Z, Saraga M, **Arapović A**, Šušnjar T, Biočić M, Treatment of hydronephrosis using the „double J" prohesis in children, 7. Hrvatski kongres dječje kirurgije s međunarodnim sudjelovanjem, Osijek, 7.- 11. listopada 2015. Predavanje.

5. **Arapović A** et al. Unusual color of urine as a first sign of posttraumatic chyluria and enteric lymphorrhea in one adolescent sportsman (case report). 17th Congress of the International Pediatric Nephrology Association, Iguacu, 20th-24th September 2016. Poster.

6. **Arapović A** et al. Acute appendicitis and thrombocytopenia – first signs of thrombotic thrombocytopenic purpura (case report). 17th Congress of the International Pediatric Nephrology Association, Iguacu, 20th-24th September 2016., Poster.

7. Marković V, Barić A, Čapkun V, Punda A., Eterović D, Pranić-Kragić A, Marović A, **Arapović A.** Agreement Between Renal Lenght Measurements by Planar DMSA Scintigraphy and Ultrasonography , Barcelona, 15th-19th October 2016. Poster.

8. Saraga M, Fridl V, Zekić Tomaš S, **Arapović A**, Prgomet S, Čulić V. The new mutation in PKD2 gene for early onset of ADPKD. 50th Anniversary Meeting of the European Society for Paediatric Nephrology, Glasgow, 6th-9th September 2017. Poster.

9. **Arapovic A,** Saraga M, Prgomet S, Marusic E, Slavicek J, Radic J. Seven years of peritoneal dialysis treatment in child with congenital nephrotic syndrome of the Finnich type - first Croatian experience. 13th European Peritoneal Dialysis Meeting, Dublin, 4th - 7th October 2017. Poster.

10. Marušić E, Runjić E, Tomasović M, Ursić A, Lahman Dorić M, Ćepić K, Pavelin S, **Arapović A.** Acute psychotic episode as manifestation of multiple sclerosis - case report. European Journal of Pediatric Neurology. 2017;21:e120. Poster.

11. **Arapović A**, Vukojević K, Filipović N, Glavina-Durdov M, Galešić Ljubanović D, Saraga-Babić M, Prgomet S, Simičić Majce A, Saraga M. Epidemiologija 10-godišnjeg razdoblja biopsije dječjih bubrega u južnoj Hrvatskoj. 13. kongres hrvatskog pedijatrijskog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, 11.-14.10.2018. Poster.

12. Veljačić D, **Arapović A**, Prgomet S, Saraga M. Provjera točnosti formula za procjenu funkcijskog kapaciteta mokraćnog mjehura kod djece u odnosu na vrijednosti dobivene direktnom radionuklidnom cistografijom. 13. kongres hrvatskog pedijatrijskog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, 11.-14.10.2018. Poster.

13. Kosović I, **Arapović A**, Polić B, Markić J, Kovačević T, Prgomet S, Saraga M. Trombotična mikroangiopatija u djece: uzroci, dijagnostika, liječenje, praćenje i ishod. 13. kongres hrvatskog pedijatrijskog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, 11.-14.10.2018. Poster.

14. Bajo D, Bucat M**, Arapović A,** Prgomet S, Saraga M. Vrjednovanje prenatalnog ultrazvučnog probira mokraćnog sustava postnatalnim ultrazvučnim pregledom mokraćnog sustava. 13. kongres hrvatskog pedijatrijskog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, 11.-14.10.2018. Poster.

15. Prgomet S, Todorić J, Simičić Majce A, **Arapović A,** Poljak Ž, Saraga M. Kasna prezentacija valvule stražnje uretre - prikaz slučaja. 13. kongres hrvatskog pedijatrijskog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, 11.-14.10.2018. Poster.

16. Rogulj M, Brković T, **Arapović A,** Lozić B, Dragišić Ivulić S, Krželj V, Pavlov N, Unić Šabašov I, Pavić I, Petrić Duvnjak J. Psudo - Bartterov sindrom kod dojenčeta. 13. kongres hrvatskog pedijatrijskog društva HLZ-a s međunarodnim sudjelovanjem, Šibenik, 11.-14.10.2018. Poster.

17. **Arapović A.** Slabokrvnost, voda, elektroliti in acido-bazno ravnovesje. 5. Slovenski simpozij pediatrične nefrologije. 1. Slovensko-hrvaški simpozij pediatrične nefrologije, Bled, Slovenija, 29.11.2019. Predavanje.

Poglavlje u knjizi:

Marijan Saraga, **Adela Arapović**. Arterijska hipertenzija u djece i adolescenata. U: Bralić I i sur. Kvartarna prevencija-racionalna dijagnostika i liječenje u pedijatriji. Drugo izdanje. Medicinska naklada, Zagreb, 2020. str. 125-38.