



Izvorni rad | Original article

Nasljedne glomerulopatije dječje dobi: Hrvatsko iskustvo

Inherited glomerulopathies of children: a Croatian experience

Petar Šenjug¹, Danica Galešić Ljubanović^{1,2}

¹ Odjel za nefropatologiju i elektronsku mikroskopiju, Klinički zavod za patologiju i citologiju, Klinička bolnica Dubrava, Zagreb, Hrvatska

² Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, Hrvatska

Ključne riječi

HEREDITARNI NEFRITIS;
BENIGNA OBITELJSKA HEMATURIJA;
KOLAGEN TIP IV;
GENSKO TESTIRANJE

Key words

NEPHRITIS, HEREDITARY;
HEMATURIA, BENIGN FAMILIAL;
COLLAGEN TYPE IV;
GENETIC TESTING

SAŽETAK. Bolesti iz spektra Alportovog sindroma (AS-a) nastaju kao posljedica mutacija gena za kolagen tip IV (*COL43*, *COL4A4* i *COL4A5*). Spektr bolesti obuhvaća sve od tzv. benigne obiteljske hematurije na jednom kraju do klasičnog AS-a s ranom progresijom bolesti i izvanbubrežnim manifestacijama na drugom kraju spektra. Istraživačko iskustvo naše skupine počelo je 2003. godine, kada se prof. dr. sc. Danica Galešić Ljubanović vratila s edukacije iz nefropatologije od 18 mjeseci u Denveru, SAD i otvorila nefropatološki laboratorij u KB Dubrava. Dugogodišnji rad rezultirao je projektom Hrvatske zaklade za znanost "Genotip-fenotip korelacija u AS-u i nefropatiji tankih glomerularnih bazalnih membrana (TBMN)" provedenom u periodu od 2015. do 2019. godine kojeg je profesorica bila voditelj. Glavni cilj istraživanja bio je utvrditi prevalenciju AS-a i TBMN-a u Hrvatskoj i razjasniti AS i TBMN histološki, genetski i klinički s krajnjim ciljem stvaranja registra pacijenta s ovim bolestima. Dijagnostički proces poremećaja iz spektra AS-a je često zahtijevan. Postoji velika varijabilnost u kliničkoj prezentaciji bolesti, ali i u histološkoj slici. Najtočniji test za otkrivanje uzročnih patogenih varijanti u genima kolagena tipa IV je opsežno paralelno genetsko testiranje čitavih kodirajućih sekvenci sva tri gena *COL4A5*, *COL4A3* i *COL4A4*. Biopsija bubrega je od posebne koristi ako su klinički i podaci o članovima obitelji negativni i ne postoji mogućnost genetskog testiranja. Biopsija daje uvid u stupanj oštećenja parenhima bubrega te je u nekim slučajevima neizbježna dijagnostička metoda, osobito u pacijenata s neobičnim kliničkim tijekom bolesti (npr. neočekivano povećanje proteinurije). Tanke glomerularne bazalne membrane (GBM) su morfološki entitet utvrđen mjerenjem na elektronskoj mikroskopiji (EM) te su za razumijevanje njihovog značaja neophodni klinički i genetski podaci.

SUMMARY. Alport spectrum disorders are result of mutations in the type IV collagen genes (*COL43*, *COL4A4* and *COL4A5*). The spectrum of diseases includes the so-called benign familial hematuria at one end to classic Alport syndrome (AS) with early progression and extrarenal manifestations at the other end of the spectrum. The research experience of our group started in 2003 when professor Danica Galešić Ljubanović returned to Zagreb after 18 months education in renal pathology (Denver, USA) and started a renal pathology laboratory at Dubrava University Hospital. This long-term work resulted in a project of the Croatian Science Foundation "Genotype-phenotype correlations in Alport's syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy" conducted in the period from 2015 to 2019 under the leadership of professor Galešić Ljubanović. The main goal of the study was to determine the prevalence of AS and thin glomerular basement membrane nephropathy (TBMN) in Croatia and to clarify AS and TBMN histologically, genetically and clinically with the ultimate goal of creating a registry of patients with AS and TBMN. The diagnostic process of AS spectrum disorders is often challenging. There is great variability in the clinical presentation of the disease, but also in the histological findings. The most accurate test for detecting causative pathogenic variants in type IV collagen genes is extensive parallel genetic testing of the entire coding sequences of all three *COL4A5*, *COL4A3*, and *COL4A4* genes. A kidney biopsy is especially helpful if there are negative clinical and pedigree data and there is no possibility of genetic testing. The biopsy provides insight into the degree of kidney parenchymal injury and is in some cases an unavoidable diagnostic method, especially in patients with type IV collagen mutations with an unusual clinical course of the disease (such as an unexpected increase in proteinuria). Thin glomerular basement membranes are a morphological entity determined by measurement on electron microscopy, and clinical and genetic data are necessary to understand their significance.

Nasljedne glomerulopatije su bolesti bubrega nastale kao posljedica mutacija gena koji kodiraju proteine koji su strukturalno ili funkcionalno važni u glomerulu. U doba dostupnosti genske analize i sve prisutnijeg sekvenciranja gena ili čak cijelog genoma, broj gena povezanih s bolestima bubrega je velik i posebno je narastao posljednjih godina.¹ Nasljedne bolesti glomerula se mogu podijeliti na one koje zahvaćaju glo-

merularnu bazalnu membranu (GBM) i na one koje zahvaćaju podocyte (podocitopatije).² Obzirom da su glavni fokus naše istraživačke skupine poremećaji

Adresa za dopisivanje:

Prof. dr. sc. Danica Galešić Ljubanović, dr. med., <https://orcid.org/0000-0002-2850-6316>
Zavod za patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu,
Šalata 10, 10000 Zagreb, Hrvatska; e-pošta: danica.ljubanovic@mef.hr

uzrokovani mutacijama kolagena tipa IV, u ovom ćemo se tekstu ograničiti na poremećaje iz spektra Alportovog sindroma (AS-a).

Kolagen tipa IV je ubikvitarni protein u bazalnim membranama i čini njihovu glavnu, kolagenu komponentu. Svaka molekula kolagena tipa IV je trimer koji se sastoji od tri α lanca. U GBM-u to su $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ trimeri (koji se nalaze u građi svih bazalnih membrana u tijelu) te $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ trimeri koji se nalaze u GBM-u, Bowmanovoj čahuri, distalnim bubrežnim kanalčićima te u nekim očnim i kohlearnim membranama.²

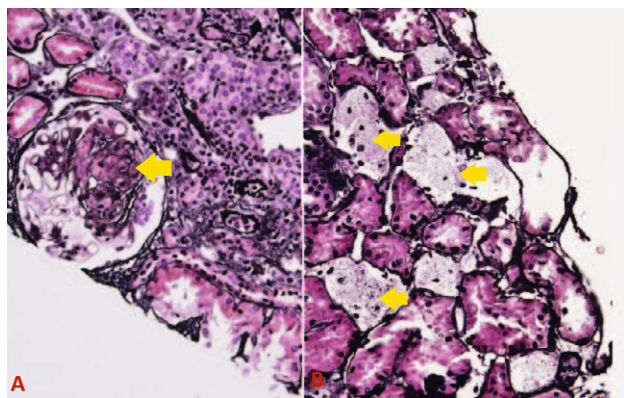
Bolesti izazvane mutacijama kolagena tipa IV su vrlo heterogene. Opisan je velik broj mutacija koje su moguće u tri gena za kolagen tipa IV (*COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5*). Naravno, moguća je prisutnost više mutacija istovremeno. Miner³ je 2014. godine u časopisu *Kidney International* napisao da je poremećaje uzrokovane *COL4A3*, *COL4A4* i/ili *COL4A5* mutacijama najbolje shvatiti kao spektar AS-a. To bi obuhvatilo sve poremećaje koji nastaju mutacijama gena za kolagen tipa IV, a koji se na jednom kraju spektra očituju kao benigna obiteljska hematurija (bez posljednjeg učinka na funkciju bubrega), a na drugom kao klasični AS s nedetektabilnim kolagenom tipa IV u GBM-u, progresijom u završnu fazu bubrežne bolesti (ESKD – eng. *end stage kidney disease*) te slušnim i vidnim smetnjama. Sve između tih dviju krajnosti ulazi u spektar poremećaja AS-a, uključujući i nasljednu fokalnu segmentalnu glomerulosklerozu (FSGS). Obzirom da mutacija koja uzrokuje samo hematuriju kod jednog pojedinca u drugoga može uzrokovati progresivnu bubrežnu bolest, Miner je također napisao da bi klasifikacija tih poremećaja u određene dijelove spektra AS-a bila korisna za kliničare, ali i za bolesnike i njihove obitelji, kako bi bili upoznati s realnim rizikom kronične bubrežne bolesti.

Klasični AS je prvi opisao Arthur Cecil Alport 1927. godine.⁴ Devedesetih godina prošlog stoljeća dokazano je da AS nastaje kao posljedica defekta lanaca $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ kolagena tipa IV.⁵ Klinički se AS prezentira kao progresivna nasljedna nefropatija koju karakterizira progresivni hematurički nefritis uz ultrastrukturne promjene GBM-a (nepravilna stanjenja, zadebljanja i cjepkanja), gubitak sluha za tonove visokih frekvencija i oftalmološki problemi (prednji lentikonus, makularne pjege, kornealne endotelne vezikule, rekurentne kornealne erozije i katarakte).^{4,6,7} U 85 % pacijenata genska osnova AS-a je mutacija X vezanog gena *COL4A5* smještenog na Xq22 regiji, koji kodira $\alpha 5$ lance kolagena tipa IV.⁸ U ovom podtipu, muški spol ima težu kliničku sliku u odnosu na ženski. Muškarci s X-vezanim AS-om koji razviju ESKD-e prije dobi od 30 godina uglavnom imaju pridruženu većinu izvanbubrežnih manifestacija bolesti,^{9,10} dok oni s kasnijim razvojem ESKD-a imaju pridružen samo gubi-

tak sluha.¹¹ Gubitak sluha za spektar visokofrekventnih tonova javlja se u 70 %, a lentikonus u 30 % oboljelih muškaraca do četvrtog desetljeća života kada su zatajenje bubrega, gubitak sluha i retinopatija već zajedno prisutni.¹¹ Gotovo sve bolesnice (95 %) s X-vezanim AS-om imaju hematuriju te većina naposljetku razvije i ostale kliničke karakteristike bolesti: proteinuriju (75 %),¹² ESKD-e (8 – 30 %), gubitak sluha (40 %) i/ili retinopatiju (40 %).^{10,11,13} Oko 15 % svih AS-a su posljedica autosomne mutacije gena koji kodiraju $\alpha 3$ i/ili $\alpha 4$ lance kolagena tipa IV (*COL4A3* i/ili *COL4A4*), koji se najčešće nasljeđuju recesivno.^{14–16} Kliničke karakteristike bolesnika s autosomno recesivnim AS-om su iste kao kod muških članova obitelji s X-vezanim tipom bolesti.¹¹ Termin autosomno dominantnog AS-a (AS uzrokovan jednom mutacijom *COL4A3* ili *COL4A4*) iako opisan, još je uvijek stvar literaturnih prijepora i debata. Dio stručnjaka izbjegava taj termin o čemu će biti riječi kasnije u tekstu.^{17–19}

Kod analize **biopsije bubrega** ne postoje patognomonične promjene na svjetlosnoj mikroskopiji (SM) za AS. U ranijim fazama bolesti glomeruli najčešće imaju urednu morfologiju. Često su prisutne diskretne promjene glomerula koje uključuju blago fokalno proširenje mezangija (na račun povećane količine mezangijskog matriksa i/ili povećanog broja mezangijskih stanica). Kako bolest napreduje, pojavljuju se fokalne segmentalne (sl. 1.A) ili globalne glomeruloskleroze. Pjenušave stanice (sl. 1.B) se najčešće nalaze u uzorcima biopsija bubrega starije djece i odraslih kod kojih su pronađene i kronične promjene, ali nisu patognomoničan nalaz.^{20–23} U kasnijim fazama bolesti, uz pojavu FSGS-a i globalne glomeruloskleroze, posljedično se razvijaju intersticijska fibroza i tubularna atrofija te nespecifična arterioloskleroza. Imunofluorescentna mikroskopija (IF) je negativna ili nespecifična. Glavna ultrastrukturna (elektronsko mikroskopska – EM) karakteristika X-vezanog AS-a je izmjena stanjenih i zadebljanih područja GBM-a, fragmentacija i lameliranje (sl. 2.), pojava sitnih granula unutar GBM-a te nepravilne vanjske konture GBM-a.^{7,22–26}

U posljednja dva desetljeća u centru istraživanja poremećaja iz spektra AS-a je genotip-fenotip korelacija. Postoje studije koje su opisale cijeli spektar kliničkih fenotipa mutacija gena *COL4A5* – **studije genotip-fenotip korelacije za X-vezani AS**. Navedene studije potvrdile su položaj i tip svake pojedine mutacije te opisali kako ta mutacija određuje kliničke karakteristike bolesti (težinu bolesti i brzinu progresije u ESKD-e).^{9,12,27–29} Određeni tipovi mutacija koreliraju s težim fenotipom bolesti, a Gross i suradnici su predložili klasifikaciju fenotipa bolesnika s X-vezanim AS-om u tri tipa: tip S (teški), tip MS (umjereni-teški) i tip M (umjereni).²⁷ Varijante bolesti koje rezultiraju blagim kliničkim fenotipom (zatajenje bubrega u ka-

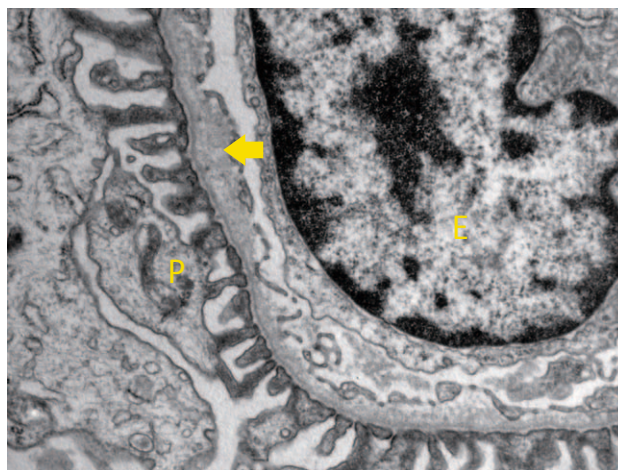


SLIKA 1. SVJETLOSNA MIKROSKOPIJA TKIVA BUBREGA U PACIJENTA S ALPORTOVIM SINDROMOM. A) SEGMENTALNA GLOMERULOSKLEROZA (STRELICA). JONES METHENAMINE SILVER BOJENJE, ORIGINALNO POVEĆANJE 400 X. B) PJENUŠAVE STANICE U INTERSTICIJU BUBREGA (STRELICE). JONES METHENAMINE SILVER BOJENJE, ORIGINALNO POVEĆANJE 400 X.

FIGURE 1. KIDNEY BIOPSY, LIGHT MICROSCOPY OF THE PATIENT WITH ALPORT SYNDROME. A) SEGMENTAL GLOMERULOSCLEROSIS (ARROW). JONES METHENAMINE SILVER STAIN, ORIGINAL MAGNIFICATION X400. B) INTERSTITIAL FOAMY CELLS (ARROWS). JONES METHENAMINE SILVER STAIN, ORIGINAL MAGNIFICATION X400.

snijim srednjim godinama) nazivaju se hipomorfne varijante. Primjer takve varijante je mutacija *COL4A5 G624D* koju su prvi opisali Martin i suradnici, a relativno je česta u području istočne i srednje Europe.^{28,30,31}

Valja naglasiti da postoji velika varijabilnost u fenotipu za poremećaje iz spektra AS-a čak i unutar iste obitelji (pacijenti s istom mutacijom) pogotovo kada se radi o heterozigotnim pacijentima – **pacijenti s jednom *COL4A3* ili *COL4A4* mutacijom.**³² Kod takvih pacijenata i kod muških i ženskih članova obitelji fenotip može varirati od potpuno asimptomatskog stanja, preko izolirane hematurije do ESKD-a, a u nekim slučajevima prisutan je i gubitak sluha.^{33–37} Nomenklatura heterozigotnih pojedinaca (pacijenti s jednom *COL4A3* ili *COL4A4* mutacijom) nije razriješena te je predmet rasprave stručnjaka. Analiza *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* patogenih varijanti u gnomAD bazi podataka je pokazala da je učestalost X-vezanog AS-a (mutacije *COL4A5*) otprilike jedan na 2 000, dok su pojedinačne heterozigotne *COL4A3* ili *COL4A4* mutacije znatno češće, u otprilike 1 na 100 pojedinaca.³⁸ Takva učestalost ih čini najčešćim uzrocima nasljednih bubrežnih bolesti. U više istraživanja je uočena korelacija nefropatije tankih glomerularnih bazalnih membrana (TBMN) s heterozigotnim mutacijama *COL4A3* ili *COL4A4* pri čemu se termin TBMN često izjednačavao s benignom obiteljskom hematurijom.^{33,39–49} Međutim, rezultati genotip-fenotip korelacije su pokazali da nemaju svi heterozigotni nosioci *COL4A3* ili *COL4A4* mutacija benigni tijek bolesti, već su pojedinci imali progresivni tijek s hematurijom, hipertenzijom i ESKD-om.^{32,33,50–56} Kod određenog broja



SLIKA 2. ULTRASTRUKTURA GLOMERULA PACIJENTA S ALPORTOVIM SINDROMOM. VIDLJIVA JE DIJELOM STANJENA, A DIJELOM ZADEBLJANA GLOMERULARNA BAZALNA MEMBRANA S FRAGMENTIRANJEM I LAMELIRANJEM (STRELICA). E-ENDOTEL, P – PODOCIT. TRANSMISIJSKA ELEKTRONSKA MIKROSKOPIJA, ORIGINALNO POVEĆANJE 20 000 X.

FIGURE 2. GLOMERULAR ULTRASTRUCTURE OF THE PATIENT WITH ALPORT SYNDROME. THERE IS A PARTIALLY THINNED AND PARTIALLY THICKENED GLOMERULAR BASEMENT MEMBRANE WITH FRAGMENTATION AND LAMELLATION (ARROW). E – ENDOTHELIAL CELL, P – PODOCYTE. TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY, ORIGINAL MAGNIFICATION X20.000.

takvih pacijenata će se razviti proteinurija i FSGS s progresijom u ESKD-e.^{57–62} Takvi rezultati dovode u pitanje naziv autosomno dominantnog AS-a. Dio stručnjaka odbacuje taj termin i zalažu se za upotrebu TBMN-a kao valjanog termina, a Ciparska istraživačka grupa zagovara izraz Alport nefropatije s kasnom manifestacijom.^{17,19,63} Argumenti za korištenje TBMN-a kao valjanog termina su: 1. činjenica da većina bolesnika iz te skupine nema gubitak sluha, oftalmološke promjene ili lameliranje GBM-a; 2. vjerojatnost progresije u ESKD-e je niska; 3. postavljanje dijagnoze AS-a vjerojatno bi imalo nepotreban negativan psihološki utjecaj na bolesnika zbog svih komplikacija koje se opisuju uz AS-u, a u većine ovih bolesnika će bubrežna funkcija ostati normalna.^{11,19,64} Druga grupa stručnjaka zagovara klasificiranje heterozigotnih *COL4A3* ili *COL4A4* mutacija kao autosomni AS s ciljem redefiniranja termina TBMN-a, smatrajući kako je prisutnost tanke GBM samo morfološka promjena prisutna kod nekih bolesnika s X-vezanim AS-om, autosomno recesivnim AS-om i heterozigotnim *COL4A3* ili *COL4A4* mutacijama.¹⁸ Danas se smatra da je opisana varijabilnost u fenotipu vjerojatno kombinacija više učinaka: vrste i težine mutacije, statusa u ostalim genima najčešće povezanim s nasljednim FSGS-om (tzv. geni s modificirajućim učinkom), ostalih čimbenika (pretilost, pušenje, hipertenzija, dijabetes) i drugih, nenasljednih bolesti bubrega.

Naša iskustva

Interes za detaljnije istraživanje hereditarnog nefritisa (AS-a i TBMN-a) i početak formiranja naše istraživačke grupe počeo je 2012. godine, a nastao je iz činjenice da smo u rutinskoj patohistološkoj dijagnostici (PHD) primijetili varijabilnost morfoloških promjena u AS-u i TBMN-u uz ograničenost do tada dostupnih metoda (SM, IF i EM) u postavljanju dijagnoze.

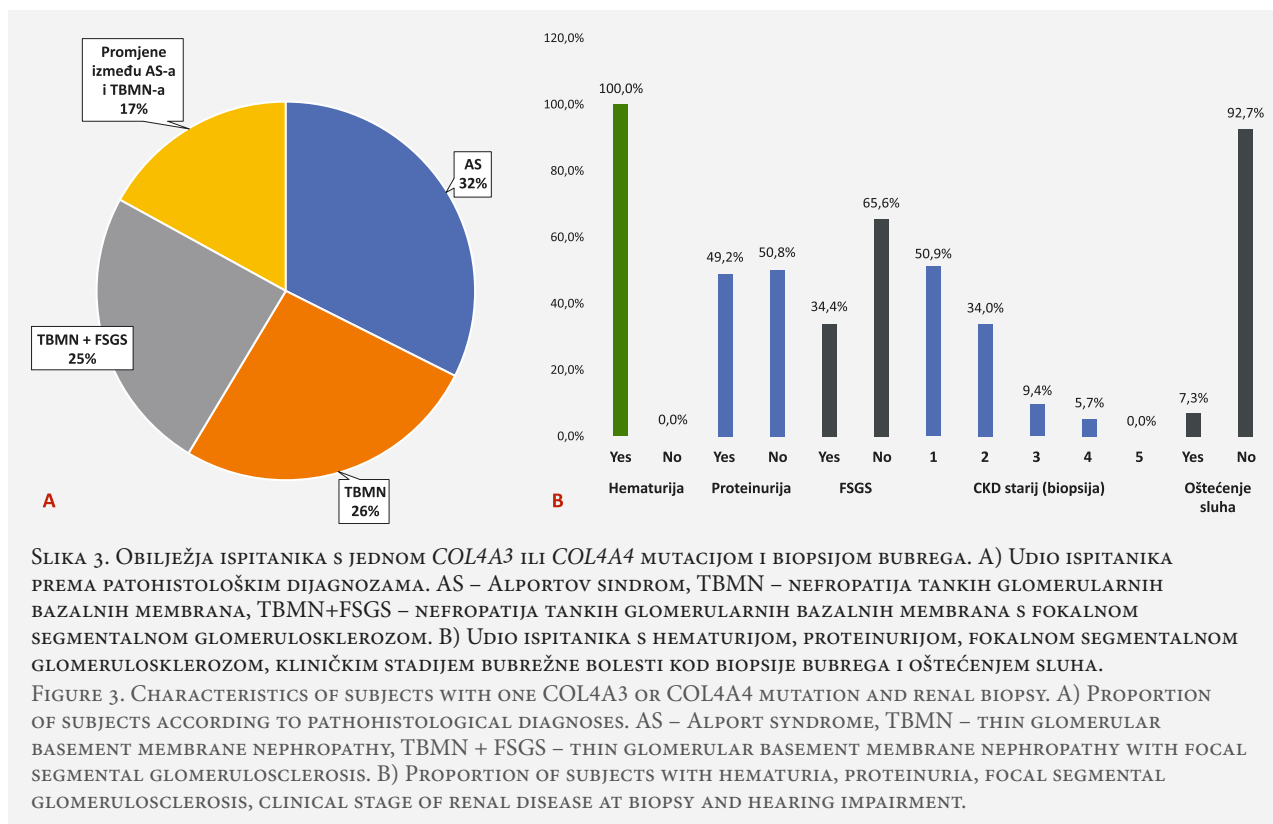
Kako je osnovni kriterij za dijagnozu TBMN-a difuzno stanjena GBM-a na EM-u, prvi korak u našem istraživanju bio je **standardizacija mjerenja debljine GBM-a** u Odjelu za nefropatologiju i EM, KB Dubrava. Metodom direktnog mjerenja udaljenosti od podocitne do endotelne membrane, modificirano prema postupku koji je opisao Haas, na 23 muška i 22 ženska ispitanika (s poremećajima koji ne utječu na debljinu GBM-a) odredili smo referentne debljine GBM-a odrasle populacije za naš laboratorij.⁶⁵ Utvrdili smo da raspon uredne debljine GBM-a iznosi 268 – 412 nm za muškarce i 213 – 389 nm za žene.⁶⁶

Drugi korak u našem istraživanju bio je ispitivanje **imunohistokemijskog (IHC) bojenja na lance kolagena tipa IV** ($\alpha 3$, $\alpha 4$ i $\alpha 5$) u biopsijama bubrega. Istraživanje je financirano potporom Sveučilišta u Zagrebu, a provedeno je kao dio izrade disertacije dr. sc. Petra Šenjuga.⁶⁷ Počivalo je na hipotezi da IHC-e analiza $\alpha 3$, $\alpha 4$ i $\alpha 5$ lanaca kolagena tipa IV znatno pridonosi razlikovanju TBMN-a od AS-a i subtipiziranju AS-a. Analizirali smo tkivo nativnih bubrega 90 ispitanika. Iznenađujuća je bila činjenica da su na temelju IHC-e analize, iz skupine ispitanika s PHD-om AS-a (njih 30), subklasificirane samo dvije ispitanice kao nositeljice X-vezanog AS-a i dva ispitanika kao muškarci s X-vezanim AS-om. Dva ispitanika s PHD-om AS-a pokazivala su atipičan obrazac IHC-e bojenja s urednim bojenjem za $\alpha 3$ i $\alpha 4$ lance kolagena tipa IV u glomerulima, dok su $\alpha 5$ lanci u glomerulima bili negativni, ali su bili pozitivni u Bowmanovoj čahuri. Negativno bojenje za $\alpha 5$ lance kolagena tipa IV u glomerularnom klupku uz pozitivitet u Bowmanovoj čahuri karakteristično je za autosomno recesivni AS. Međutim, ono je tada kombinirano s negativnim bojenjem za $\alpha 3$ i $\alpha 4$ lance u glomerulima, što u našem istraživanju nije bio slučaj.²⁴ Niti jedan ispitanik nije pokazivao IHC-e obrazac bojenja karakterističan za autosomno recesivni AS. Osjetljivost IHC-e metode za subtipiziranje AS-a kojeg je dijagnoza postavljena na temelju SM, IF i EM u našem istraživanju je bila samo 20 %, što je bio razočaravajući rezultat. Od 33 ispitanika s PHD-om TBMN-a, jedan je imao atipičan obrazac bojenja za lance kolagena tipa IV, a svi ostali su, očekivano, imali uredne obrasce bojenja za sva tri lanca. Interesantno je da su među ispitanicima s nejasnim PHD-om (promjene na EM između AS-a i TBMN-a) dvije ispitanice pomoću IHC-a subklasificirane kao nositeljice X-vezanog AS-a.

Uzimajući u obzir dugogodišnje iskustvo u svakodnevnom radu i rezultate gore navedenog IHC-e istraživanja, odlučili smo aplicirati za **istraživački projekt** u okviru Hrvatske zaklade za znanost (HRZZ). Projekt pod naslovom “**Genotip-fenotip korelacija u Alportovom sindromu i nefropatiji tankih glomerularnih bazalnih membrana**” je prihvaćen od HRZZ-a i proveden u periodu od 1. rujna 2015. do 1. rujna 2019. godine. Tijekom trajanja projekta, pod vodstvom prof. dr. sc. Danice Galešić Ljubanović, provedeno je multidisciplinarno, kolaborativno istraživanje na nacionalnoj razini, u kojem je sudjelovalo devet hrvatskih nefroloških, pedijatrijsko-nefroloških i nefropatoloških institucija (KB Dubrava, KB Merkur, Klinički bolnički centri Zagreb, Rijeka, Split, Osijek i Sestre Milosrdnice, te Klinika za dječje bolesti Zagreb i Opća bolnica Zadar). Prikupili smo kliničke podatke o bubrežnim i izvanbubrežnim simptomima te histološke podatke (uključujući bojenje za lance kolagena tipa IV) i proveli studije obitelji za pacijente s AS-om i TBMN-om. U svrhu otkrivanja mutacija gena *COL4A5*, *COL4A4* i *COL4A3* koristili smo sekvenciranje slijedeće generacije (eng. *next generation sequencing* – NGS) na Illumina platformi uz potvrdu novih mutacija Sanger sekvenciranjem. Analize su bile provedene u molekularnom laboratoriju Zavoda za patologiju i Centru za translacijska i klinička istraživanja Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Glavni cilj istraživanja bio je utvrditi prevalenciju AS-a i TBMN-a u Hrvatskoj i razjasniti AS i TBMN histološki, genetski i klinički s krajnjim ciljem stvaranja registra pacijenta s AS-om i TBMN-om.

Inicijalna identifikacija probanda izvršena je pretragom zapisa PHD-e nalaza. Identificirano je 370 ispitanika s biopsijom bubrega kod kojih je postavljena dijagnoza AS-a ili TBMN-a. Ukupno je u istraživanju identificiran 681 ispitanik i član obitelji. Od navedenih 681 ispitanika 403 su regrutirana za gensku analizu na mutacije kolagena tipa IV. Od 403 testirana pacijenta 241 (60 %) su bile žene, a 162 (40 %) muškarci, dobi od jedne do 72 godine. Od 403 testirana pacijenta u 224 (56 %) nađena je patogena varijanta ili varijanta neodređenog značenja, dok u 179 ispitanika primijenjenom metodologijom genska mutacija nije nađena.

Rezultati našeg projekta slična su onima u svjetskoj literaturi. Zapazili smo veliku varijabilnost, kako u kliničkoj prezentaciji tako i u patohistološkoj slici, kod pacijenata s poremećajima iz spektra AS-a. Posebno se u toj skupini izdvajaju heterozigotni ispitanici. Maththaiou i suradnici su 2020. godine objavili sistematski pregled literature koji je uključio 48 publikacija o pacijentima s heterozigotnim mutacijama *COL4A3* ili *COL4A4* s ukupno 777 pacijenata iz 258 obitelji. Od 777 ispitanika 222 su bila podvrgnuta biopsiji, a 193 je imalo PHD-e nalaz. U EM-u je dominirao nalaz tankih GBM-a koji je u 27 % slučajeva bio udružen s



nekom od promjena GBM-a koja upućuje na AS (zadebljanjem 18,4 %, cjepkanjem 16,1 %, lameliranjem 6,9 %, nabiranjem 1,7 %, izgledom pletene košare 5,8 %). Interesantno je da je kod naših 65 pacijenata s biopsijom bubrega i heterozigotnim mutacijama *COL4A3* ili *COL4A4* njih 32 % imalo promjene karakteristične za AS, a 17 % morfologiju između klasičnog AS-a i TBMN-a (sl. 3.A). Ostale karakteristike ovih pacijenata prikazane su na slici 3.B.

Varijabilnost u kliničkoj slici, ali i u histologiji prisutna je i među heterozigotnim ispitanicima s istom mutacijom. Kao primjer navodimo skupinu naših pacijenata s mutacijom *COL4A4 c.193-2A>C*. Radi se o novo opisanoj mutaciji od strane naše grupe.^{68,69} S navedenom mutacijom pronađeno je pet probanda s biopsijom bubrega i pet članova obitelji. Jedini homozigotni bolesnik, u dobi od dvije godine, imao je proteinuriju i hematuriju s očuvanom funkcijom bubrega i bez izvanbubrežnih simptoma. Taj bolesnik je imao promjene karakteristične za AS uočene EM-om. U heterozigotnoj skupini, šest pacijenata je imalo hematuriju, četiri bioptrirana probanda imala su proteinuriju, a samo jedan je imao umjereno smanjenu bubrežnu funkciju. Heterozigotni probandi imali su varijabilne nalaze biopsije bubrega. Tri bolesnika imala su TBMN i FSGS, od kojih su dva imala i fokalno lameliranje GBM-a na EM-u. Jedan heterozigot je imao promjene karakteristične za AS na EM-u bez FSGS-a.

U ovom pregledu je važno dotaći se i pacijenata kod kojih su na biopsiji bubrega pronađene tanke GBM. Analiza *COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* patogenih varijanti u gnomAD bazi podataka je pokazala da je učestalost X-vezanog AS-a jedan na 2 000 dok su pojedinačne heterozigotne *COL4A3* ili *COL4A4* mutacije znatno češće, 1 na 100 pojedinaca.³⁸ Lemmink i suradnici su prvi opisali *COL4A4* mutaciju u bolesnika s TBMN-om.³⁹ Nakon njihovog istraživanja, uslijedio je cijeli niz istraživanja koja su ukazala na postojanje korelacije između TBMN-a i heterozigotnih mutacija *COL4A3* ili *COL4A4* s takozvanom "benignom obiteljskom hematurijom".^{33,39-49} U našoj kohorti od 88 ispitanika s tankim GBM-om na EM-u u 42 (48%) nije pronađena mutacija za kolagen tip IV NGS analizom.

Također je interesantno prikazati rezultate mjerenja debljine GBM-a koje smo proveli na 84 biopsije transplantiranih bubrega koje su učinjene u trenutku transplantacije (tzv. nulte biopsije) u kojima je učestalost tankih GBM-a bila 31 %. Zanimljivo je da, kada se usporede podaci kod istih pacijenata 12 mjeseci nakon transplantacije, nije bilo razlike u proteinuriji, hematuriji i procijenjenoj brzini glomerularne filtracije između ispitanika sa i bez tankih GBM-a.⁷⁰ Navedeno nas navodi na nužan oprez kod interpretacije histološkog nalaza tanke GBM kao morfološkog entiteta koji ne treba *a priori* izjednačavati s poremećajima s mutacijom gena za kolagen tipa IV. Kod takvih pacijenata

važna je kliničko-patološka korelacija te cjelokupna obrada, uključujući i gensku analizu.

Tijekom provedbe ovog projekta uspostavljena je dobra suradnja s Ciparskim timom na čelu s profesorom Constantinosom Deltasom. Članovi projektnog tima aktivno sudjeluju u kongresima International workshop on Alport Syndrome.⁷¹ Radi se o skupovima koji okupljaju istraživače iz cijelog svijeta koji se bave poremećajima iz spektra AS-a, a prof. Galešić Ljubanović je jedan od članova organizacijskog odbora. Članovi projektnog tima su također koautori smjernica za gensko testiranje i zbrinjavanje bolesnika s AS-om, a kao rad će biti publicirano izvješće sa skupova o AS-u koji su održani 2019. i 2021. godine u kojem će biti sažete i terapijske preporuke.⁷²

Zaključci

Dijagnostički proces poremećaja iz spektra AS-a je često zahtijevan. Postoji velika varijabilnost u kliničkoj prezentaciji bolesti, ali i u patohistološkoj slici. Danas se smatra da je opisana varijabilnost u fenotipu vjerojatno kombinacija više učinaka: vrste i težine genetske mutacije, statusa u ostalim genima najčešće povezanima s nasljednom FSGS (tzv. geni s modificirajućim učinkom), ostalih čimbenika (pretilost, pušenje, hipertenzija, dijabetes) i eventualne prisutnosti drugih, nenasljednih bolesti bubrega. Najtočniji test za otkrivanje uzročne patogene varijante u genima kolagena tipa IV je opsežno paralelno genetsko testiranje čitavih kodirajućih sekvenci sva tri gena COL 4A5, COL 4A3 i COL 4A4.⁷³ Biopsija bubrega je od posebne koristi ako su klinički i podaci o članovima obitelji negativni i ne postoji mogućnost genetskog testiranja.⁷⁴ Biopsija daje uvid u stupanj oštećenja parenhima bubrega te je u nekim slučajevima neizbježna dijagnostička metoda, osobito u pacijenata s mutacijama gena kolagena tipa IV s neobičnim kliničkim tijekom bolesti (npr. neočekivano povećanje proteinurije). Tanke GBM su morfološki entitet određen mjerenjem na EM-u te su za razumijevanje njihova značaja neophodni klinički i genetski podaci.

Zahvale

Iskreno se zahvaljujemo svim članovima projektnog tima, a posebno prof. dr. sc. Tamari Nikuševoj Martić, dr. Mariji Šenjug Perica i dr. Matiji Horačeku, te ostalim suradnicima koji su sudjelovali i dalje sudjeluju na ovom istraživačkom putu.

LITERATURA

- Pollak MR, Friedman DJ. The Genetic Architecture of Kidney Disease. *Clin J Am Soc Nephrol* 2020;15(2):268–75.
- Rheault MN, Kashtan CE. Inherited Glomerular Diseases. U: Avner ED, Harmon WE, Niaudet P, Yoshikawa N, Emma F, Goldstein SL, ur. *Pediatric Nephrology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016, str. 777–803.
- Miner JH. Pathology vs. molecular genetics: (re)defining the spectrum of Alport syndrome. *Kidney Int* 2014;86(6):1081–3.
- Alport AC. Hereditary Familial Congenital Haemorrhagic Nephritis. *Br Med J* 1927;1(3454):504–6.
- Hudson BG. The molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes: beacons for the discovery of the collagen IV family. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(10):2514–27.
- Flinter F. Alport's syndrome. *J Med Genet* 1997;34(4):326–30.
- Kashtan CE, Michael AF. Alport syndrome. *Kidney Int* 1996;50(5):1445–63.
- Pirson Y. Making the diagnosis of Alport's syndrome. *Kidney Int* 1999;56(2):760–75.
- Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A i sur. X-linked Alport syndrome: natural history in 195 families and genotype-phenotype correlations in males. *J Am Soc Nephrol* 2000;11(4):649–57.
- Tan R, Colville D, Wang YY, Rigby L, Savige J. Alport retinopathy results from "severe" COL4A5 mutations and predicts early renal failure. *Clin J Am Soc Nephrol* 2010;5(1):34–8.
- Savige J, Gregory M, Gross O, Kashtan C, Ding J, Flinter F. Expert guidelines for the management of Alport syndrome and thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2013;24(3):364–75.
- Jais JP, Knebelmann B, Giatras I, De Marchi M, Rizzoni G, Renieri A i sur. X-linked Alport syndrome: natural history and genotype-phenotype correlations in girls and women belonging to 195 families: a "European Community Alport Syndrome Concerted Action" study. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(10):2603–10.
- Dagher H, Buzza M, Colville D, Jones C, Powell H, Fassett R i sur. A comparison of the clinical, histopathologic, and ultrastructural phenotypes in carriers of X-linked and autosomal recessive Alport's syndrome. *Am J Kidney Dis* 2001;38(6):1217–28.
- Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 2003;348(25):2543–56.
- Mochizuki T, Lemmink HH, Mariyama M, Antignac C, Gubler MC, Pirson Y i sur. Identification of mutations in the alpha 3(IV) and alpha 4(IV) collagen genes in autosomal recessive Alport syndrome. *Nat Genet* 1994;8(1):77–81.
- Heidet L, Arrondel C, Forestier L, Cohen-Solal L, Mollet G, Gutierrez B i sur. Structure of the human type IV collagen gene COL4A3 and mutations in autosomal Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(1):97–106.
- Savige J. Should We Diagnose Autosomal Dominant Alport Syndrome When There Is a Pathogenic Heterozygous COL4A3 or COL4A4 Variant? *Kidney Int Rep* 2018;3(6):1239–41.
- Kashtan CE, Ding J, Garosi G, Heidet L, Massella L, Nakanishi K i sur. Alport syndrome: a unified classification of genetic disorders of collagen IV alpha345: a position paper of the Alport Syndrome Classification Working Group. *Kidney Int* 2018;93(5):1045–51.
- Savige J, Ariani F, Mari F, Bruttini M, Renieri A, Gross O i sur. Expert consensus guidelines for the genetic diagnosis of Alport syndrome. *Pediatr Nephrol* 2019;34(7):1175–89.
- Gubler M, Levy M, Broyer M, Naizot C, Gonzales G, Perrin D i sur. Alport's syndrome. A report of 58 cases and a review of the literature. *Am J Med* 1981;70(3):493–505.
- Krickstein HI, Gloor FJ, Balogh K, Jr. Renal pathology in hereditary nephritis with nerve deafness. *Arch Pathol* 1966;82(6):506–17.

22. Yoshikawa N, White RH, Cameron AH. Familial hematuria; clinico-pathological correlations. *Clin Nephrol* 1982;17(4):172–82.
23. Gubler M, Heidet L, Antignac C. Alport's syndrome, thin basement membrane nephropathy, nail-patella syndrome, and type III collagen glomerulopathy. U: Jennette JC, Heptinstall RH, ur. *Heptinstall's pathology of the kidney*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007, str. 487–517.
24. Kashtan CE. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane disease. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(9):1736–50.
25. Hinglais N, Grunfeld JP, Bois E. Characteristic ultrastructural lesion of the glomerular basement membrane in progressive hereditary nephritis (Alport's syndrome). *Lab Invest* 1972;27(5):473–87.
26. Rumpelt HJ. Hereditary nephropathy (Alport syndrome): correlation of clinical data with glomerular basement membrane alterations. *Clin Nephrol* 1980;13(5):203–7.
27. Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M. Meta-analysis of genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome: impact on clinical counselling. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17(7):1218–27.
28. Slajpah M, Gorinsek B, Berginc G, Vizjak A, Ferluga D, Hvala A *i sur*. Sixteen novel mutations identified in COL4A3, COL4A4, and COL4A5 genes in Slovenian families with Alport syndrome and benign familial hematuria. *Kidney Int* 2007;71(12):1287–95.
29. Bekheirnia MR, Reed B, Gregory MC, McFann K, Shamshirsaz AA, Masoumi A *i sur*. Genotype-phenotype correlation in X-linked Alport syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2010;21(5):876–83.
30. Martin P, Heiskari N, Zhou J, Leinonen A, Tumelius T, Hertz JM *i sur*. High mutation detection rate in the COL4A5 collagen gene in suspected Alport syndrome using PCR and direct DNA sequencing. *J Am Soc Nephrol* 1998;9(12):2291–301.
31. Barker DF, Hostikka SL, Zhou J, Chow LT, Oliphant AR, Gerken SC *i sur*. Identification of mutations in the COL4A5 collagen gene in Alport syndrome. *Science* 1990;248(4960):1224–7.
32. Voskarides K, Damianou L, Neocleous V, Zouvani I, Christodoulidou S, Hadjiconstantinou V *i sur*. COL4A3/COL4A4 mutations producing focal segmental glomerulosclerosis and renal failure in thin basement membrane nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2007;18(11):3004–16.
33. Longo I, Porcedda P, Mari F, Giachino D, Meloni I, Deplano C *i sur*. COL4A3/COL4A4 mutations: from familial hematuria to autosomal-dominant or recessive Alport syndrome. *Kidney Int* 2002;61(6):1947–56.
34. Jefferson JA, Lemmink HH, Hughes AE, Hill CM, Smeets HJ, Doherty CC *i sur*. Autosomal dominant Alport syndrome linked to the type IV collagen alpha 3 and alpha 4 genes (COL4A3 and COL4A4). *Nephrol Dial Transplant* 1997;12(8):1595–9.
35. van der Loop FT, Heidet L, Timmer ED, van den Bosch BJ, Leinonen A, Antignac C *i sur*. Autosomal dominant Alport syndrome caused by a COL4A3 splice site mutation. *Kidney Int* 2000;58(5):1870–5.
36. Ciccicarese M, Casu D, Ki Wong F, Faedda R, Arvidsson S, Tonolo G *i sur*. Identification of a new mutation in the alpha4(IV) collagen gene in a family with autosomal dominant Alport syndrome and hypercholesterolaemia. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16(10):2008–12.
37. Pescucci C, Mari F, Longo I, Vogiatzi P, Caselli R, Scala E *i sur*. Autosomal-dominant Alport syndrome: natural history of a disease due to COL4A3 or COL4A4 gene. *Kidney Int* 2004;65(5):1598–603.
38. Gibson J, Fieldhouse R, Chan MMY, Sadeghi-Alavijeh O, Burnett L, Izzi V *i sur*. Prevalence Estimates of Predicted Pathogenic COL4A3-COL4A5 Variants in a Population Sequencing Database and Their Implications for Alport Syndrome. *J Am Soc Nephrol* 2021;32(9):2273–90.
39. Lemmink HH, Nillesen WN, Mochizuki T, Schroder CH, Brunner HG, van Oost BA *i sur*. Benign familial hematuria due to mutation of the type IV collagen alpha4 gene. *J Clin Invest* 1996;98(5):1114–8.
40. Buzza M, Wang YY, Dagher H, Babon JJ, Cotton RG, Powell H *i sur*. COL4A4 mutation in thin basement membrane disease previously described in Alport syndrome. *Kidney Int* 2001;60(2):480–3.
41. Ozen S, Ertoy D, Heidet L, Cohen-Solal L, Ozen H, Besbas N *i sur*. Benign familial hematuria associated with a novel COL4A4 mutation. *Pediatr Nephrol* 2001;16(11):874–7.
42. Badenas C, Praga M, Tazon B, Heidet L, Arrondel C, Armengol A *i sur*. Mutations in the COL4A4 and COL4A3 genes cause familial benign hematuria. *J Am Soc Nephrol* 2002;13(5):1248–54.
43. Buzza M, Dagher H, Wang YY, Wilson D, Babon JJ, Cotton RG *i sur*. Mutations in the COL4A4 gene in thin basement membrane disease. *Kidney Int* 2003;63(2):447–53.
44. Gross O, Netzer KO, Lambrecht R, Seibold S, Weber M. Novel COL4A4 splice defect and in-frame deletion in a large consanguine family as a genetic link between benign familial haematuria and autosomal Alport syndrome. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(6):1122–7.
45. Tazon Vega B, Badenas C, Ars E, Lens X, Mila M, Darnell A *i sur*. Autosomal recessive Alport's syndrome and benign familial hematuria are collagen type IV diseases. *Am J Kidney Dis* 2003;42(5):952–9.
46. Wang YY, Rana K, Tonna S, Lin T, Sin L, Savige J. COL4A3 mutations and their clinical consequences in thin basement membrane nephropathy (TBMN). *Kidney Int* 2004;65(3):786–90.
47. Rana K, Tonna S, Wang YY, Sin L, Lin T, Shaw E *i sur*. Nine novel COL4A3 and COL4A4 mutations and polymorphisms identified in inherited membrane diseases. *Pediatr Nephrol* 2007;22(5):652–7.
48. Baek JI, Choi SJ, Park SH, Choi JY, Kim CD, Kim YL *i sur*. Identification of novel variants in the COL4A4 gene in Korean patients with thin basement membrane nephropathy. *Indian J Med Res* 2009;129(5):525–33.
49. Endreffy E, Ondrik Z, Ivanyi B, Maroti Z, Bereczki C, Haszon I *i sur*. Collagen type IV nephropathy: genetic heterogeneity examinations in affected Hungarian families. *Mol Cell Probes* 2011;25(1):28–34.
50. Nieuwhof CM, de Heer F, de Leeuw P, van Breda Vriesman PJ. Thin GBM nephropathy: premature glomerular obsolescence is associated with hypertension and late onset renal failure. *Kidney Int* 1997;51(5):1596–601.
51. Nogueira M, Cartwright J, Jr., Horn K, Doe N, Shappell S, Barrios R *i sur*. Thin basement membrane disease with heavy proteinuria or nephrotic syndrome at presentation. *Am J Kidney Dis* 2000;35(4):E15.
52. van Paassen P, van Breda Vriesman PJ, van Rie H, Tervaert JW. Signs and symptoms of thin basement membrane nephropa-

- thy: a prospective regional study on primary glomerular disease-The Limburg Renal Registry. *Kidney Int* 2004;66(3): 909–13.
53. Norby SM, Cosio FG. Thin basement membrane nephropathy associated with other glomerular diseases. *Semin Nephrol* 2005;25(3):176–9.
 54. Haas M. Thin glomerular basement membrane nephropathy: incidence in 3471 consecutive renal biopsies examined by electron microscopy. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130(5): 699–706.
 55. Pierides A, Voskarides K, Athanasiou Y, Ioannou K, Damianou L, Arsali M *i sur.* Clinico-pathological correlations in 127 patients in 11 large pedigrees, segregating one of three heterozygous mutations in the COL4A3/ COL4A4 genes associated with familial haematuria and significant late progression to proteinuria and chronic kidney disease from focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24(9): 2721–9.
 56. Papazachariou L, Demosthenous P, Pieri M, Papagregoriou G, Savva I, Stavrou C *i sur.* Frequency of COL4A3/COL4A4 mutations amongst families segregating glomerular microscopic hematuria and evidence for activation of the unfolded protein response. Focal and segmental glomerulosclerosis is a frequent development during ageing. *PLoS One* 2014;9(12): e115015.
 57. Deltas C, Savva I, Voskarides K, Papazachariou L, Pierides A. Carriers of Autosomal Recessive Alport Syndrome with Thin Basement Membrane Nephropathy Presenting as Focal Segmental Glomerulosclerosis in Later Life. *Nephron* 2015;130 (4):271–80.
 58. Gast C, Pengelly RJ, Lyon M, Bunyan DJ, Seaby EG, Graham N *i sur.* Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant* 2016;31(6):961–70.
 59. Xie J, Wu X, Ren H, Wang W, Wang Z, Pan X *i sur.* COL4A3 mutations cause focal segmental glomerulosclerosis. *J Mol Cell Biol* 2015;7(2):184.
 60. Malone AF, Phelan PJ, Hall G, Cetincelik U, Homstad A, Alonso AS *i sur.* Rare hereditary COL4A3/COL4A4 variants may be mistaken for familial focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 2014;86(6):1253–9.
 61. Temme J, Peters F, Lange K, Pirson Y, Heidet L, Torra R *i sur.* Incidence of renal failure and nephroprotection by RAAS inhibition in heterozygous carriers of X-chromosomal and autosomal recessive Alport mutations. *Kidney Int* 2012;81 (8):779–83.
 62. Hoefele J, Lange-Sperandio B, Ruessmann D, Glockner-Pagel J, Alberer M, Benz MR *i sur.* Novel heterozygous COL4A3 mutation in a family with late-onset ESRD. *Pediatr Nephrol* 2010;25(8):1539–42.
 63. Papazachariou L, Papagregoriou G, Hadjipanagi D, Demosthenous P, Voskarides K, Koutsofti C *i sur.* Frequent COLA mutations in familial microhematuria accompanied by later-onset Alport nephropathy due to focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Genet* 2017;92(5):517–27.
 64. Deltas C, Pierides A, Voskarides K. Molecular genetics of familial hematuric diseases. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28 (12):2946–60.
 65. Haas M. Alport syndrome and thin glomerular basement membrane nephropathy: a practical approach to diagnosis. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133(2):224–32.
 66. Šenjug P, Krištić A, Bauer Šegvić A, Bacalja J, Bulimbašić S, Galešić Ljubanović D. Standardization of measurement and determination of normal glomerular basement membrane thickness at Department of Pathology and Cytology, Dubrava University Hospital, Zagreb. *Virchows Archiv* 2015;467 (Supplement 1):33–34.
 67. Šenjug P. Obilježja glomerularne bazalne membrane u Alportovom sindromu i nefropatiji tankih bazalnih membrana (Disertacija). Sveučilište u Zagrebu, Medicinski Fakultet, 2021.
 68. Senjug P, Nikuseva Martić T, Senjug Perica M, Oroz M, Horaček M, Gotovac Jercić K *i sur.* Clinical and pathohistological characteristics of Alport spectrum disorder caused by COL4A4 mutation c.193-2A>C: a case series. *Croat Med J* 2021;62(3):204–14.
 69. Senjug P, Nikuseva Martić T, Senjug Perica M, Oroz M, Horaček M, Cuk M *i sur.* Autosomal recessive Alport syndrome caused by a novel COL4A4 splice site mutation: a case report. *Croat Med J* 2019;60(5):458–62.
 70. Šenjug P, Horaček M, Maksimović B, Vučur K, Horvatić I, Zagorec N *i sur.* Clinical significance of zero-time renal transplant biopsies and thin glomerular basement membranes in zero-time renal transplant biopsies. *Acta Clin Croat (Suppl. 1)* 2021;60:133–41.
 71. Odiatis C, Savva I, Pieri M, Ioannou P, Petrou P, Papagregoriou G *i sur.* A glycine substitution in the collagenous domain of Col4a3 in mice recapitulates late onset Alport syndrome. *Matrix Biol Plus* 2021;9:100053.
 72. Savige J, Lipska-Zietkiewicz BS, Watson E, Hertz JM, Deltas C, Mari F *i sur.* Guidelines for Genetic Testing and Management of Alport Syndrome. *Clin J Am Soc Nephrol* 2022;17(1): 143–54.
 73. Savige J, Storey H, Watson E, Hertz JM, Deltas C, Renieri A *i sur.* Consensus statement on standards and guidelines for the molecular diagnostics of Alport syndrome: refining the ACMG criteria. *Eur J Hum Genet* 2021;29(8):1186–97.
 74. Kashtan CE, Gross O. Clinical practice recommendations for the diagnosis and management of Alport syndrome in children, adolescents, and young adults—an update for 2020. *Pediatr Nephrol* 2021;36(3):711–19.