

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Ana Juras

**POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA
GLUTATION S-TRANSFERAZE S KLINIČKIM
ZNAČAJKAMA IgA VASKULITISA**

Doktorski rad

Osijek, 2026.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Sveučilište u Dubrovniku

Institut Ruđer Bošković

Doktorski studij Molekularne bioznanosti

Ana Juras

**POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA
GLUTATION S-TRANSFERAZE S KLINIČKIM
ZNAČAJKAMA IgA VASKULITISA**

Doktorski rad

Osijek, 2026.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Sveučilište u Dubrovniku
Institut Ruđer Bošković
Poslijediplomski interdisciplinarni sveučilišni
studij Molekularne bioznanosti

Doktorski rad

Znanstveno područje: Interdisciplinarno područje znanosti
Znanstvena polja: biologija, temeljne medicinske znanosti

POVEZANOST POLIMORFIZMA GENA ZA GLUTATION S-TRANSFERAZE S KLINIČKIM ZNAČAJKAMA IgA VASKULITISA

Ana Juras

Disertacija je izrađena u:

Mentor/i:

Kratki sažetak doktorske disertacije:

IgA vaskulitis najčešći je sistemski vaskulitis dječje dobi i obilježen je izraženom kliničkom raznolikošću, od blažih oblika bolesti do gastrointestinalnih, bubrežnih i drugih organskih manifestacija koje mogu utjecati na tijek i ishod bolesti. U patogenezi bolesti važna skupina kandidata su enzimi glutation-S-transferaze, koji sudjeluju u detoksikaciji reaktivnih metabolita i održavanju redoks ravnoteže tijekom upale. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost delecijjskih polimorfizama *GSTM1* i *GSTT1* te varijanti *GSTA1* C-69T i *GSTP1* Ile105Val s pojavom IgA vaskulitisa i s unaprijed definiranim kliničkim podfenotipovima bolesti u djece iz Republike Hrvatske. Istraživanje je provedeno kao multicentrična studija slučajeva i kontrola u pet tercijarnih pedijatrijskih centara, a u analizu su uključena 293 bolesnika s IgA vaskulitisom i 94 kontrolna ispitanika. Genotipizacija *GSTM1* i *GSTT1* provedena je metodom višestruke lančane reakcije polimerazom, dok su polimorfizmi *GSTA1* i *GSTP1* određeni odgovarajućim metodama genotipizacije. Uz genotipske podatke analizirane su kliničke, laboratorijske, biokemijske i imunološke varijable. Rezultati su pokazali da *GSTM1*-null, *GSTT1*-null i *GSTP1* rs1695 nisu bili povezani s pojavom IgA vaskulitisa u osnovnoj usporedbi bolesnika i kontrola. Za *GSTA1* C-69T utvrđena je povezanost u recesivnom modelu, pri čemu je TT genotip bio češći u bolesnika nego u kontrolama, ali taj nalaz treba tumačiti oprezno zbog odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini. Unutar skupine bolesnika uočene su povezanosti pojedinih GST varijanti s dijelom kliničkih manifestacija bolesti, ponajprije s gastrointestinalnim i urogenitalnim zahvaćanjem, dok za nefritis i relaps nije utvrđena dosljedna povezanost. Dobiveni rezultati upućuju na to da GST polimorfizmi vjerojatno nemaju jednako značenje u ukupnoj osjetljivosti za bolest i u oblikovanju njezina fenotipa. Njihov doprinos, ako postoji, vjerojatnije se očituje kroz modulaciju pojedinih manifestacija bolesti nego kroz određivanje ukupnog rizika za nastanak IgA vaskulitisa.

Broj stranica: 81

Broj slika: 6

Broj tablica: 24

Broj literaturnih navoda: 82

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: IgA vaskulitis, djeca, glutation-S-transferaze, GSTM1, GSTT1, GSTA1, GSTP1, genetski polimorfizmi, nefritis, gastrointestinalna zahvaćenost

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (zamjena)

Disertacija je pohranjena u: Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; Gradskoj i sveučilišnoj knjižnici Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Sveučilištu Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

BASIC DOCUMENTATION CARD

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
University of Dubrovnik
Ruđer Bošković Institute
University Postgraduate Interdisciplinary Doctoral Study of
Molecular biosciences

PhD thesis

Scientific Area: Interdisciplinary area of science
Scientific Fields: biology, basic medical sciences

ASSOCIATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE GENE POLYMORPHISMS WITH THE CLINICAL FEATURES OF IgA VASCULITIS

Ana Juras

Thesis performed at:

Supervisor/s:

Short abstract:

IgA vasculitis is the most common systemic vasculitis in childhood and is characterized by marked clinical heterogeneity, ranging from mild forms of disease to gastrointestinal, renal, and other organ manifestations that may determine disease severity and outcome. In the pathogenesis of the disease, glutathione S-transferases represent an important group of candidate enzymes because they participate in the detoxification of reactive metabolites and in the maintenance of redox balance during inflammation. The aim of this study was to investigate the association of GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms, as well as GSTA1 C-69T (rs3957357) and GSTP1 Ile105Val (rs1695) variants, with the occurrence of IgA vasculitis and with predefined clinical subphenotypes of the disease in children from the Republic of Croatia. This multicenter case-control study was conducted in five tertiary pediatric centers, and the analysis included 293 patients with IgA vasculitis and 94 controls. GSTM1 and GSTT1 deletion polymorphisms were determined using multiplex polymerase chain reaction, whereas GSTA1 and GSTP1 polymorphisms were analyzed by appropriate genotyping methods. In addition to genotypic data, clinical, laboratory, biochemical, and immunological variables were analyzed. The results showed that GSTM1-null, GSTT1-null, and GSTP1 rs1695 were not associated with the occurrence of IgA vasculitis in the primary comparison between patients and controls. For GSTA1 C-69T, an association was observed in the recessive model, with the TT genotype being more frequent in patients than in controls; however, this finding should be interpreted with caution because deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in the control group. Within the patient group, several GST variants were associated with selected clinical manifestations of the disease, mainly gastrointestinal and urogenital involvement, whereas no consistent association was found for nephritis or disease relapse. The obtained findings suggest that GST polymorphisms are unlikely to have the same effect on overall disease susceptibility and on the clinical expression of the disease. If present, their contribution is more likely reflected in the modulation of individual disease manifestations than in determining the overall risk of disease onset.

Number of pages: 81

Number of figures: 6

Number of tables: 24

Number of references: 82

Original in: Croatian

Key words: IgA vasculitis, children, glutathione S-transferases, GSTM1, GSTT1, GSTA1, GSTP1, genetic polymorphisms, nephritis, gastrointestinal involvement

Date of the thesis defense:

Reviewers:

- 1.
- 2.
- 3.
4. (substitute)

Thesis deposited in: National and University Library in Zagreb, Ul. Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb; City and University Library of Osijek, Europska avenija 24, Osijek; Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Trg sv. Trojstva 3, Osijek

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
1.1.	IgA vaskulitis kao klinički i znanstveni problem.....	2
1.2.	Epidemiološka obilježja IgA vaskulitisa.....	4
1.3.	Klinička heterogenost i varijabilni tijek bolesti	5
1.4.	Etiopatogeneza IgA vaskulitisa.....	7
1.5.	Antioksidacijski obrambeni sustavi u čovjeka	9
1.6.	Glutation kao središnja molekula stanične zaštite.....	12
1.7.	Glutation-S-transferaze - funkcionalni okvir	14
1.8.	Razredi GST enzima i njihova biološka važnost	15
1.9.	Genetska varijabilnost GST enzima.....	16
2.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	20
2.1.	Hipoteza istraživanja.....	20
3.	BOLESNICI I METODE.....	21
3.1.	Veličina uzorka i snaga istraživanja.....	21
3.2.	Uzorci, pohrana i laboratorijske metode	22
3.3.	Izdvajanje i pohrana genomske DNA	23
3.4.	Određivanje polimorfizama gena GST	24
3.4.1.	Određivanje delecijskog polimorfizma gena GSTM1	25
3.4.2.	Određivanje delecijskog polimorfizma gena GSTT1.....	25
3.4.3.	Određivanje polimorfizma gena GSTA1	27
3.4.4.	Određivanje polimorfizama gena GSTP1 Ile105Val (rs1695).....	28
3.5.	Statistička obrada podataka	30
4.	REZULTATI.....	32
4.1.	Raspodjela alela i genotipova analiziranih varijanti GST.....	34
4.2.	Kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika IgAV prema GSTA1 genotipu	37

4.3. Kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika IgAV prema GSTM1 genotipu.....	39
4.4. Kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika IgAV prema GSTP1 rs1695 genotipu	43
4.5. Kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika IgAV prema GSTT1 genotipu.....	46
5. RASPRAVA.....	51
5.1. Povezanost GSTA1 s pojavom bolesti i kliničkim fenotipom IgA vaskulitisa.....	51
5.2. Povezanost GSTM1 s pojavom bolesti i kliničkim fenotipom IgA vaskulitisa	52
5.3. Povezanost GSTP1 s pojavom bolesti i kliničkim fenotipom IgA vaskulitisa	54
5.4. Povezanost GSTT1 s pojavom bolesti i kliničkim fenotipom IgA vaskulitisa	55
5.5. Povezanost GST varijanti s nefritisom i recidivima.....	56
5.6. Metodološka ograničenja i značenje dobivenih nalaza	56
5.7. Završno tumačenje	57
6. ZAKLJUČAK	59
7. LITERATURA.....	60
8. SAŽETAK.....	68
9. SUMMARY	70
10. ŽIVOTOPIS	72

POPIS KRATICA

Kratika	Značenje
A/G	omjer albumina i globulina
ANOVA	analiza varijance (engl. analysis of variance)
APTV / aPTT	aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme
AST-O	antistreptolizin O
C3	komponenta C3 komplementa
C4	komponenta C4 komplementa
CH50	ukupna hemolitička aktivnost komplementa
CI	interval pouzdanosti (engl. confidence interval)
CRP	C-reaktivni protein
CYP1A1	citokrom P450, obitelj 1, podobitelj A, član 1
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
eGFR	procijenjena brzina glomerularne filtracije
ESR / SE	sedimentacija eritrocita
EULAR	Europska liga protiv reumatizma (engl. European League Against Rheumatism)
G6PD	glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza
Gd-IgA1	galaktozno-deficitarni imunoglobulin A1
GI / GIT	gastrointestinalni / gastrointestinalni trakt
GPx	glutation-peroksidaza
GR	glutation-reduktaza
GSH	reducirani glutathion
GSSG	oksidirani glutathion
GST	glutation-S-transferaza
GSTA1	glutation-S-transferaza alfa 1
GSTM1	glutation-S-transferaza mi 1
GSTP1	glutation-S-transferaza pi 1
GSTT1	glutation-S-transferaza teta 1
HMGB1	protein visoke pokretljivosti skupine 1 (engl. high mobility group box 1)
IgA	imunoglobulin A
IgA1	imunoglobulin A1
IgAV	IgA vaskulitis
IgAVN	nefritis povezan s IgA vaskulitisom
IgE	imunoglobulin E
IgG	imunoglobulin G

Kratika	Značenje
IgM	imunoglobulin M
INR	međunarodni normalizirani omjer
KBC	klinički bolnički centar
KKS	kompletna krvna slika
LOOH	lipidni hidroperoksidi
NADPH	reducirani nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat
NQO1	NAD(P)H:kinon oksidoreduktaza 1
NSAID	nesteroidni protuupalni lijekovi
NTC	negativna kontrola bez DNA (engl. no-template control)
OR	omjer izgleda (engl. odds ratio)
PCR	lančana reakcija polimerazom
PCR-RFLP	PCR s analizom polimorfizma duljine restrikcijskih fragmenata
PRINTO	Međunarodna organizacija za pedijatrijska reumatološka ispitivanja
PRES	Europsko društvo za pedijatrijsku reumatologiju
PT / PV	protrombinsko vrijeme
RFLP	polimorfizam duljine restrikcijskih fragmenata
ROS	reaktivne kisikove vrste
SD	standardna devijacija
SNP	polimorfizam jednog nukleotida
SOD1 / SOD2	superoksid-dismutaza 1 / superoksid-dismutaza 2

1. UVOD

IgA vaskulitis u djece bolest je s jasno prepoznatljivim kliničkim obilježjima, ali s neujednačenim tijekom i ishodom. U većine bolesnika simptomi se povuku bez trajnih posljedica, no kod dijela djece dolazi do recidiva, težeg oblika bolesti ili komplikacija koje zahtijevaju dulje praćenje i liječenje. Zbog takvih razlika važno je istražiti čimbenike koji mogu objasniti zbog čega bolest kod dijela bolesnika prolazi blaže, a kod drugih poprima teži oblik [1–5]. Sve je više podataka koji upućuju na povezanost upale krvnih žila s poremećajem redoks-ravnoteže i pojačanim oksidacijskim opterećenjem. Redoks-ravnoteža označava odnos između stvaranja reaktivnih spojeva i sposobnosti organizma da ih ukloni ili neutralizira. Tijekom upale nastaju reaktivni metaboliti koji mogu pojačati oštećenje endotela. Endotel je unutarnji sloj krvnih žila koji održava njihovu funkciju i propusnost. Kada dođe do njegova oštećenja, upalni proces može trajati dulje i zahvatiti više organskih sustava. U takvim uvjetima važan je glutationski sustav. Glutation je mali unutarstanični spoj koji štiti stanice od oksidativnog stresa i sudjeluje u uklanjanju štetnih metabolita. Enzimi povezani s glutationskim smanjuju posljedice oksidativnog opterećenja i pomažu u detoksikaciji reaktivnih spojeva [6–8]. Glutation-S-transferaze, skraćeno GST, skupina su enzima koji vežu glutationski na elektrofilne spojeve i produkte lipidne peroksidacije. Elektrofilni spojevi kemijski su reaktivne molekule koje mogu oštetiti stanične sastavnice. Lipidna peroksidacija označava oštećenje masnih sastavnica staničnih membrana djelovanjem reaktivnih spojeva. GST enzimi ne uklanjaju početne reaktivne kisikove spojeve, nego smanjuju sekundarno stanično oštećenje nastalo tijekom upale. Osim detoksikacije, sudjeluju i u regulaciji signalnih putova povezanih sa stresnim odgovorom i upalom. Zbog toga GST sustav predstavlja moguću poveznicu između biokemijskih promjena tijekom upale i kliničke slike bolesti [6–7]. Važnost oksidacijskog opterećenja u IgA vaskulitisu podupiru i radovi u kojima su u djece s bolešću opisane promjene u antioksidacijskim enzimima, produktima lipidne peroksidacije i drugim biljezima oksidacijskog stresa [9–13].

Genetska varijabilnost GST gena može promijeniti zaštitni kapacitet stanice. Gen je odsječak DNA koji nosi uputu za sintezu određenog proteina. Delecije *GSTM1* i *GSTT1* mogu dovesti do potpunog izostanka enzimskog proizvoda. SNP-ovi, odnosno polimorfizmi jednog nukleotida, u genu *GSTP1* mogu promijeniti građu i aktivnost proteina. Varijante u promotorskoj regiji *GSTA1* mogu sniziti ekspresiju enzima. Promotorska regija dio je gena koji

regulira količinu nastalog proteinskog proizvoda. Takve genetske razlike ne moraju same uzrokovati bolest, ali u uvjetima izražene upale mogu utjecati na težinu kliničke slike i ishod bolesti [7, 14–16]. U hrvatskoj populaciji nedostaju opsežniji sustavni podatci koji povezuju GST polimorfizme s kliničkim obilježjima IgA vaskulitisa u djece. Zbog toga postoji jasna potreba za istraživanjem koje će ispitati povezanost polimorfizama *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1* i *GSTA1* s pojavom bolesti i unaprijed definiranim podfenotipovima. Takav pristup može pridonijeti preciznijoj procjeni rizika i boljem razlikovanju djece s blažim i težim tijekom bolesti [1, 17–20].

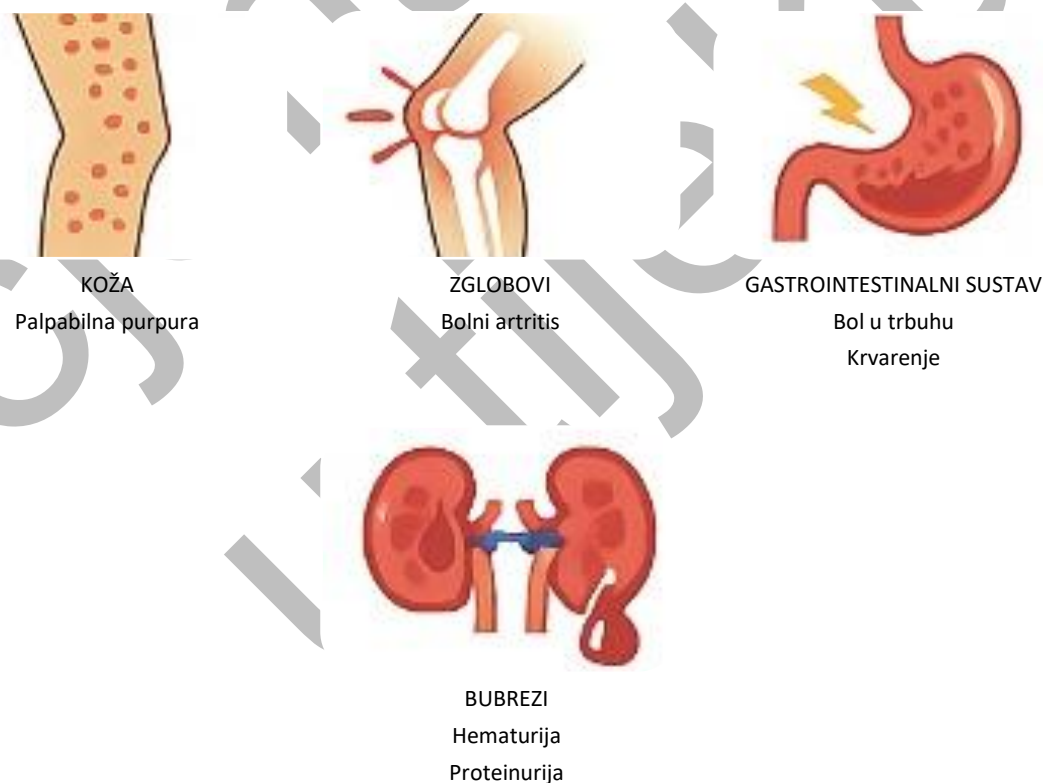
1.1. IgA vaskulitis kao klinički i znanstveni problem

IgA vaskulitis u djece bolest je s jasno prepoznatljivim kliničkim obilježjima, ali s neujednačenim tijekom i ishodom. U većine bolesnika simptomi se povuku bez trajnih posljedica, no kod dijela djece dolazi do recidiva, težeg oblika bolesti ili komplikacija koje zahtijevaju dulje praćenje i liječenje. Zbog takvih razlika važno je istražiti čimbenike koji mogu objasniti zbog čega bolest kod dijela bolesnika prolazi blaže, a kod drugih poprima teži oblik [1–5]. Sve je više podataka koji upućuju na povezanost upale krvnih žila s poremećajem redoks-ravnoteže i pojačanim oksidacijskim opterećenjem. Redoks-ravnoteža označava odnos između stvaranja reaktivnih spojeva i sposobnosti organizma da ih ukloni ili neutralizira. Tijekom upale nastaju reaktivni metaboliti koji mogu pojačati oštećenje endotela. Endotel je unutarnji sloj krvnih žila koji održava njihovu funkciju i propusnost. Kada dođe do njegova oštećenja, upalni proces može trajati dulje i zahvatiti više organskih sustava. U takvim uvjetima važan je glutationski sustav. Glutation je mali unutarstanični spoj koji štiti stanice od oksidacijskog stresa i sudjeluje u uklanjanju štetnih metabolita. Enzimi povezani s glutationom smanjuju posljedice oksidacijskog opterećenja i pomažu u detoksikaciji reaktivnih spojeva [6–8].

Glutation-S-transferaze, skraćeno GST, skupina su enzima koji vežu glutation na elektrofilne spojeve i produkte lipidne peroksidacije. Elektrofilni spojevi kemijski su reaktivne molekule koje mogu oštetiti stanične sastavnice. Lipidna peroksidacija označava oštećenje masnih sastavnica staničnih membrana djelovanjem reaktivnih spojeva. GST enzimi ne uklanjaju početne reaktivne kisikove spojeve, nego smanjuju sekundarno stanično oštećenje nastalo tijekom upale. Osim detoksikacije, sudjeluju i u regulaciji signalnih putova povezanih sa stresnim odgovorom i upalom. Zbog toga GST sustav predstavlja moguću poveznicu između

biokemijskih promjena tijekom upale i kliničke slike bolesti [6–7]. Važnost oksidacijskog opterećenja u IgA vaskulitisu podupiru i radovi u kojima su u djece s bolešću opisane promjene u antioksidacijskim enzimima, produktima lipidne peroksidacije i drugim biljezima oksidacijskog stresa [9–13, 21–24]. Delecije gena *GSTM1* i *GSTT1* mogu rezultirati potpunim izostankom enzimskog produkta. Polimorfizmi jednog nukleotida (SNP) u genu *GSTP1* mogu uzrokovati promjene u strukturi i funkcionalnoj aktivnosti proteina. Varijacije u promotorskoj regiji gena *GSTA1* mogu dovesti do smanjene ekspresije enzima, pri čemu promotorska regija ima ključnu ulogu u regulaciji razine sinteze proteinskog produkta. Iako takve genetske varijacije same po sebi ne moraju biti dovoljne za razvoj bolesti, u uvjetima izraženog upalnog odgovora mogu modulirati težinu kliničke slike i utjecati na ishod bolesti [7, 14–16].

Na slici 1. prikazane su četiri glavne skupine kliničkih manifestacija IgA vaskulitisa prema zahvaćenim organskim sustavima: koža (palpabilna purpura), zglobovi (bol i/ili otok), gastrointestinalni sustav (bol u trbuhu, krvarenje) te bubrezi (hematurija, proteinurija). Shema omogućuje brz uvid u širinu fenotipa i tipične simptome koji se mogu javiti izolirano ili u kombinaciji [25].



Slika 1. Shematski prikaz kliničkih manifestacija IgA vaskulitisa (organ-sustavi)

Izvor: Izrada autorice.

1.2. Epidemiološka obilježja IgA vaskulitisa

IgA vaskulitis najčešći je sistemski vaskulitis u djece. Bolest se javlja znatno češće u dječjoj nego u odrasloj dobi, što upućuje na povezanost s razvojem imunološkog sustava. Imunološki sustav u djece prolazi kroz sazrijevanje, a tijekom tog razdoblja dolazi do češćih kontakata s infektivnim i okolišnim podražajima. Zbog toga dječja dob predstavlja razdoblje povećane osjetljivosti za razvoj bolesti [2, 26–28].

Najveća pojavnost bilježi se između četvrte i desete godine života. U tom razdoblju djeca češće borave u kolektivima i izložena su respiratornim infekcijama. Respiratorne infekcije često prethode početku bolesti, što upućuje na moguću povezanost između aktivacije sluznične imunosti i sustavne upalne reakcije u stijenkama malih krvnih žila [1, 29].

U većini istraživanja bolest je nešto češća u dječaka nego u djevojčica. Razlika nije velika, ali se ponavlja u različitim populacijama. Takva raspodjela upućuje na moguć utjecaj bioloških čimbenika povezanih sa spolom, iako mehanizmi još nisu potpuno razjašnjeni [2].

Sezonski raspored bolesti podupire povezanost s infekcijama. Veći broj slučajeva bilježi se tijekom jeseni i zime, kada je učestalost respiratornih infekcija veća. Infekcija se ne smatra izravnim uzrokom bolesti, nego mogućim okidačem u djece s osjetljivijim imunološkim odgovorom [18]. Geografska raspodjela pokazuje da se bolest pojavljuje u različitim dijelovima svijeta, ali s razlikama u učestalosti i tijeku. Takve razlike upućuju na međudjelovanje genetske podloge i okolišnih čimbenika. U nekim populacijama češće se bilježe teži oblici bubrežnog zahvaćanja, što dodatno povećava zanimanje za genetske i imunološke odrednice bolesti [2].

Tijek bolesti nije jednak kod sve djece. Većina bolesnika ima jednu epizodu bolesti koja se povuče kroz nekoliko tjedana. Unatoč tomu, kod dijela djece javljaju se recidivi. Recidiv označava ponovnu pojavu simptoma nakon prividnog smirivanja bolesti. Recidivi produljuju razdoblje praćenja i povećavaju potrebu za ponovnim kliničkim procjenama [3]. Najvažnije epidemiološko pitanje odnosi se na bubrežno zahvaćanje. Promjene u mokraći mogu se pojaviti kod znatnog broja djece, ali klinički važan nefritis razvija se kod manjeg dijela bolesnika. Nefritis označava upalno zahvaćanje bubrega. Bubrežne komplikacije mogu nastati i nakon povlačenja kožnih i zglobnih simptoma, zbog čega je potrebno dulje praćenje mokraćnog statusa i bubrežne funkcije [30].

1.3 Klinička heterogenost i varijabilni tijek bolesti

IgA vaskulitis ne prolazi jednako kod sve djece. Dvoje bolesnika može imati sličan početak bolesti, a posve različit tijek i ishod. Razlike ne proizlaze iz dijagnostičke nejasnoće, nego iz same prirode bolesti. Na kliničku sliku utječu imunološka reaktivnost, okolišni podražaji i biološka obilježja bolesnika. Zbog toga IgA vaskulitis u pedijatrijskoj praksi traži pažljivo praćenje od početka bolesti do potpunog smirenja simptoma [1, 31].

Početak bolesti najčešće je obilježen kožnim promjenama. Purpura nastaje zbog upalne promjene stijenki malih krvnih žila, pri čemu eritrociti izlaze u potkožno tkivo. Eritrociti su crvene krvne stanice, a njihovo izlaženje iz krvne žile uzrokuje vidljive kožne promjene. Osip je palpabilan jer upala uzrokuje zadebljanje stijenke krvne žile i okolnog tkiva. Kod dijela djece osip ostaje jedina manifestacija bolesti i povlači se bez komplikacija. Kod druge djece kožne promjene postaju izraženije ili se ponovno javljaju nakon privremenog smirenja [18, 32].

Zglobne tegobe česte su u ranom tijeku bolesti. Najčešće su prisutni bol i oticanje velikih zglobova donjih ekstremiteta. Takve promjene povezane su s upalom sinovije, odnosno unutarnje ovojnice zgloba. Tegobe mogu privremeno ograničiti kretanje i svakodnevne aktivnosti, ali se najčešće povlače bez trajnog oštećenja zglobova [33].

Probavne manifestacije unose dodatnu nepredvidivost u klinički tijek. Bolovi u trbuhu nastaju zbog edema i upale crijevne stijenke. Edem označava nakupljanje tekućine u tkivu. U blažim oblicima tegobe su prolazne, dok se u težim slučajevima mogu javiti gastrointestinalno krvarenje, povraćanje ili invaginacija. Invaginacija je stanje u kojem se dio crijeva uvuče u susjedni segment i uzrokuje opstrukciju. Takve komplikacije traže hitnu procjenu i liječenje [34].

Najvažnije mjesto u procjeni težine bolesti ima bubrežno zahvaćanje. Promjene na bubrezima često prolaze bez jasnih subjektivnih simptoma i zato mogu ostati neprepoznate bez laboratorijskog praćenja. Prvi znakovi često se otkrivaju analizom urina, pri čemu se bilježe eritrociti ili proteini. Proteini u urinu upućuju na poremećaj propusnosti glomerula, sitnih bubrežnih struktura u kojima započinje filtracija krvi. Kod dijela djece promjene ostaju blage i prolazne, dok se kod drugih razvija nefritis s produljenim tijekom i rizikom trajnog oštećenja bubrežne funkcije [30, 35–43].

Varijabilnost bolesti očituje se i u vremenskom slijedu simptoma. Kožne promjene mogu prethoditi drugim manifestacijama, ali se ponekad javljaju nakon zglobnih ili probavnih tegoba. Bubrežne promjene mogu nastati i nekoliko tjedana nakon povlačenja početnih simptoma. Zbog toga privid kliničkog smirenja ne znači uvijek završetak bolesti. Dugotrajan nadzor mokraćnog statusa ostaje važan dio praćenja bolesnika [3, 44].

Kod dijela djece dolazi do recidiva. Recidiv označava ponovnu pojavu simptoma nakon razdoblja smirenja bolesti. Ponavljanje simptoma često se povezuje s novom infekcijom ili drugim imunološkim podražajem. Svaka nova epizoda može imati drukčiji intenzitet i drukčiji raspored organskog zahvaćanja, što dodatno otežava procjenu dugoročnog ishoda [3]. Razlike u kliničkom tijeku potaknule su istraživanja čimbenika koji bi mogli objasniti zbog čega bolest kod dijela djece prolazi blago, a kod druge ostavlja trajne posljedice. Istraživanja upućuju na povezanost kliničke raznolikosti s imunološkim mehanizmima, aktivacijom komplementa i promjenama na razini endotela. Komplement je skupina proteina koja sudjeluje u imunološkom odgovoru, a endotel unutarnji sloj krvnih žila. Sve više pažnje privlači i oksidacijski stres, odnosno neravnoteža između stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva i antioksidativne zaštite. Takva neravnoteža može produljiti upalu i pojačati oštećenje krvnih žila [17, 45]. Klinička heterogenost IgA vaskulitisa pokazuje da bolest nema jedinstven obrazac. Raznolikost simptoma, promjenjiv tijek i mogućnost kasnih komplikacija razlog su zbog kojega praćenje bolesnika ima jednaku važnost kao i postavljanje dijagnoze. Upravo zbog takve neujednačenosti postoji potreba za istraživanjima bioloških i genetskih čimbenika koji mogu pomoći u procjeni rizika i predviđanju tijeka bolesti [18].

Tablica 1 prikazuje tipičan vremenski slijed IgA vaskulitisa: akutnu fazu s dominantnim manifestacijama (osip/purpura, zglobne smetnje, gastrointestinalne tegobe), zatim prozor za pojavu promjena u urinu kroz tjedne do mjeseca (hematurija, proteinurija), uz naznačenu mogućnost recidiva. Na završetku je istaknuta skupina bolesnika kod kojih se razvijaju kasne bubrežne promjene odnosno klinički značajno zahvaćanje bubrega.

Tablica 1. Vremenska linija tijeka bolesti i mogućih kasnih bubrežnih promjena,

Faza / razdoblje	Kliničke značajke / promjene
Akutna faza	Osip (purpura)
Akutna faza	Smetnje sa zglobovima

Akutna faza	Gastrointestinalne tegobe
Prostor za promjene u urinu	Promjene u urinu
Prostor za promjene u urinu	Hematurija
Prostor za promjene u urinu	Proteinurija
Vremenski tijek	Tjedni / mjeseci
Moguće kasne bubrežne promjene	Zahvaćanje bubrega

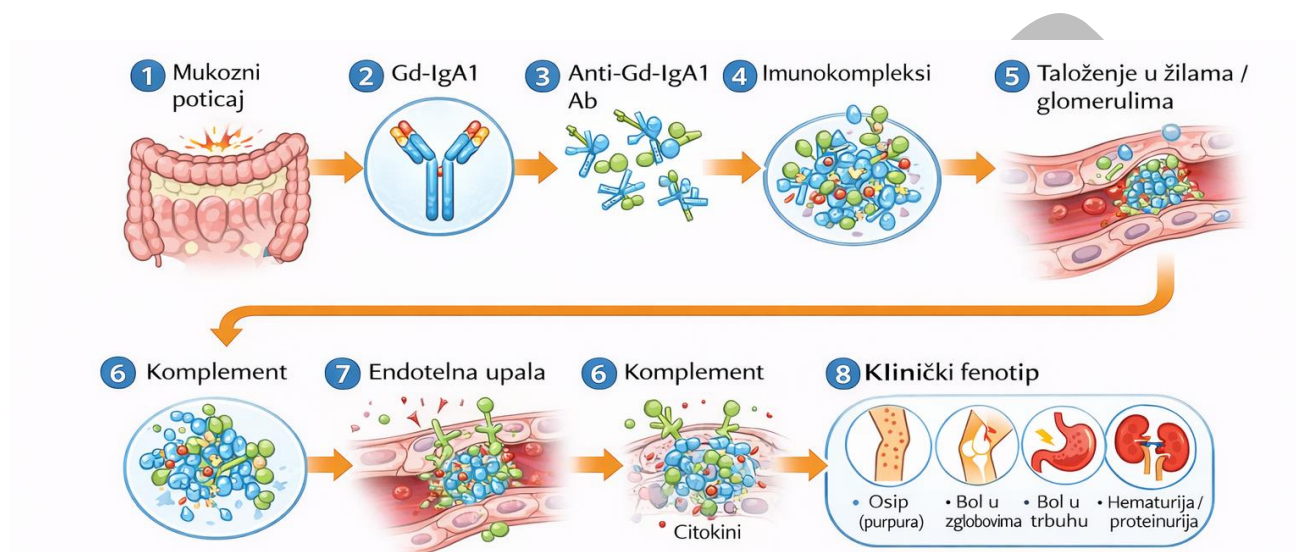
1.4. Etiopatogeneza IgA vaskulitisa

IgA vaskulitis ne nastaje zbog jednoga uzroka. Bolest se razvija kroz više povezanih imunoloških i upalnih procesa. U središtu bolesti nalazi se imunoglobulin A, protutijelo koje sudjeluje u zaštiti sluznica. Kod dijela bolesnika dolazi do poremećaja u građi podtipa IgA1. Najviše se istražuje galaktozno-deficitarni IgA1, oblik molekule s promijenjenom glikozilacijom. Glikozilacija označava vezanje šećernih lanaca na proteinsku molekulu, a promjene u tom procesu mogu utjecati na način na koji imunološki sustav prepoznaje vlastite strukture [2, 30, 46–49]. Takav promijenjeni IgA1 može potaknuti stvaranje protutijela usmjerenih protiv vlastitog imunoglobulina. Nastaju imunokompleksi koji cirkuliraju u krvi i zadržavaju se u stijenkama malih krvnih žila te u glomerulima bubrega. Imunokompleksi su spojevi antigena i protutijela, a glomeruli su sitne bubrežne strukture u kojima započinje filtracija krvi. Njihovo taloženje pokreće lokalnu upalnu reakciju i oštećenje tkiva [30]. Nakon zadržavanja imunokompleksa dolazi do aktivacije komplementa. Komplement je skupina proteina koji sudjeluju u imunološkom odgovoru i pojačavaju upalu. U IgA vaskulitisu važni su alternativni i lektinski put aktivacije. Posljedica je stvaranje upalnih medijatora koji povećavaju propusnost krvnih žila i potiču dolazak leukocita u zahvaćeno tkivo. Leukociti su bijele krvne stanice koje sudjeluju u obrani organizma, ali tijekom upale mogu pridonijeti i oštećenju tkiva [18]. Važna poveznica s nastankom bolesti nalazi se na razini mukoznog imuniteta. Sluznice dišnog i probavnog sustava prvo su mjesto kontakta organizma s vanjskim antigenima. IgA je glavno protutijelo na tim površinama. Poremećaj regulacije mukoznog odgovora može dovesti do pojačane proizvodnje strukturno promijenjenog IgA1. Takav poremećaj često se povezuje s infekcijama gornjih dišnih putova, što objašnjava zašto bolest često počinje nakon infektivne epizode [2]. Endotel krvnih žila aktivno sudjeluje u razvoju bolesti. Endotel je unutarnji sloj krvne žile koji održava ravnotežu između prohodnosti žile,

koagulacije i imunološke stabilnosti. Nakon kontakta s imunokompleksima endotelne stanice mijenjaju ekspresiju adhezijskih molekula i oslobađaju citokine. Adhezijske molekule omogućuju prijanjanje leukocita, a citokini su signalne molekule koje usmjeravaju upalni odgovor. Zbog tih promjena pojačava se vaskularna upala i oštećenje žilne stijenke [18, 30]. U održavanju bolesti sudjeluju i mehanizmi urođene imunosti [50]. Tijekom oštećenja tkiva iz stanica se oslobađaju molekule koje djeluju kao signali opasnosti. Među njima se ističe HMGB1, protein koji može pojačati upalni odgovor vezanjem na receptore imunoloških i endotelnih stanica. Takav mehanizam omogućuje nastavak upale i nakon prestanka početnog podražaja [45]. Važan dio etiopatogeneze čini i oksidacijski stres. Oksidacijski stres označava neravnotežu između stvaranja reaktivnih kisikovih spojeva i sposobnosti organizma da ih ukloni. Tijekom upale nastaje veća količina reaktivnih spojeva koji mogu oštetiti endotelne stanice i pojačati propusnost krvnih žila. U normalnim uvjetima djeluju antioksidacijski zaštitni sustavi, među kojima središnje mjesto ima glutathion. Glutathion je mali unutarstanični spoj koji pomaže u neutralizaciji štetnih metabolita [6]. Glutathion-S-transferaze sudjeluju u detoksikaciji reaktivnih metabolita i produkata lipidne peroksidacije. Lipidna peroksidacija označava oštećenje masnih sastavnica staničnih membrana djelovanjem reaktivnih spojeva. Iako GST enzimi ne uklanjaju izravno reaktivne kisikove spojeve, njihova aktivnost smanjuje sekundarno oštećenje stanica. Genetske razlike u GST sustavu mogu utjecati na sposobnost organizma da ograniči upalno i oksidacijsko opterećenje tijekom bolesti [7, 17]. Etiopatogeneza IgA vaskulitisa često se prikazuje konceptom višestrukog udara. Taj koncept znači da za nastanak bolesti nije dovoljan samo jedan poremećaj. Potrebno je preklapanje više procesa: stvaranje promijenjenog IgA1, nastanak protutijela protiv takve molekule, stvaranje imunokompleksa, njihovo taloženje u krvnim žilama i bubrezima, aktivacija komplementa te održavanje upale putem endotelne disfunkcije i oksidativnog stresa. Izostanak pojedinog koraka može spriječiti razvoj pune kliničke slike bolesti [2, 30]. Slični mehanizmi opisani su i u IgA nefropatiji, bolesti bubrega obilježenoj taloženjem IgA u glomerulima. Zbog zajedničkih patogenetskih obilježja IgA vaskulitis se sve češće promatra unutar šireg spektra IgA-posredovanih poremećaja. Razlike među bolesnicima nastaju zbog međudjelovanja imunoloških, genetskih i okolišnih čimbenika, što objašnjava neujednačen klinički tijek bolesti [51–55].

Dijagram slike 2 prikazuje slijed patogenetskih koraka koji vode od mukoznog podražaja do kliničke ekspresije bolesti: (1) mukozni poticaj, (2) nastanak galaktozno-deficitarnog IgA1 (Gd-IgA1), (3) stvaranje protutijela na Gd-IgA1, (4) nastanak cirkulirajućih imunokompleksa, (5) taloženje u stijenjkama malih krvnih žila i/ili glomerulima, (6) aktivacija komplementa, (7)

endotelna aktivacija i vaskularna upala te (8) razvoj kliničkih manifestacija (koža, zglobovi, GIT/ gastrointestinalni trakt, bubrezi). Shema sažima “multi-hit” okvir i povezuje molekularne događaje s fenotipom.



Slika 2. “Višestruki udar”-konceptualni dijagram patogeneze (multi-hit), Izvor: izrada autorice

1.5. Antioksidacijski obrambeni sustavi u čovjeka

Život u oksidirajućem okruženju zahtijeva stalnu prilagodbu. Svaka stanica proizvodi reaktivne metabolite tijekom normalnog metabolizma, a intenzitet njihova nastanka raste u stanjima pojačane imunološke aktivnosti. Da bi se očuvala stabilnost staničnih struktura, organizam raspolaže složenim obrambenim sustavima koji ograničavaju štetno djelovanje takvih spojeva. Antioksidacijska obrana ne djeluje kao izolirani mehanizam, nego kao mreža međusobno povezanih procesa koji zajedno održavaju redoks-ravnotežu unutar stanica i tkiva [6, 46]. Antioksidacijski sustavi mogu se podijeliti na enzimске i neenzimske, iako se u stvarnim biološkim uvjetima njihove funkcije isprepliću. Enzimski sustavi čine skupine proteina koji ubrzavaju pretvorbu reaktivnih kisikovih spojeva u manje štetne molekule. Navedeni enzimi djeluju brzo i učinkovito, sprječavajući nakupljanje reaktivnih metabolita u staničnom prostoru. Njihova aktivnost ovisi o pravilnoj strukturi enzima i dostupnosti supstrata, što ih čini osjetljivima na promjene u staničnom okruženju [7]. Neenzimski antioksidacijski sustavi djeluju drukčijim putem. Riječ je o malim molekulama koje mogu izravno neutralizirati slobodne radikale ili sudjelovati u regeneraciji drugih antioksidacijskih tvari. Među njima se

ističe glutation, tripeptid prisutan u visokoj koncentraciji u većini stanica. Glutation djeluje kao univerzalni stanični pufer, jer se lako oksidira i reducira, čime prihvaća i otpušta elektrone prema potrebi. Takva svojstva omogućuju mu sudjelovanje u širokom rasponu zaštitnih reakcija [6]. Enzimski i neenzimski sustavi ne djeluju odvojeno. Njihova učinkovitost proizlazi iz međusobne suradnje, pri čemu neenzimski antioksidansi često služe kao supstrati ili kofaktori za enzimске reakcije. Glutation, primjerice, sudjeluje u reakcijama koje kataliziraju glutation-S-transferaze, enzimi uključeni u detoksikaciju reaktivnih metabolita i produkata lipidne peroksidacije. Takva povezanost omogućuje fleksibilan odgovor na promjenjivo oksidativno opterećenje [8]. Unatoč složenosti i prilagodljivosti, antioksidacijska obrana ima svoja ograničenja. U stanjima produljene ili izrazite upale količina reaktivnih kisikovih spojeva može premašiti kapacitet dostupnih zaštitnih mehanizama. Kada se to dogodi, dolazi do oksidacijskog oštećenja staničnih komponenti, što se očituje promjenama u membranskim lipidima, proteinskim strukturama i genetskom materijalu. Takva oštećenja ne nastaju naglo, nego se akumuliraju tijekom vremena, čime se produljuje razdoblje oporavka stanica i tkiva [7]. Granice antioksidacijske obrane postaju osobito vidljive u tkivima izloženima stalnom metaboličkom i imunološkom opterećenju. Endotelne stanice krvnih žila, koje neprestano reagiraju na mehaničke i biokemijske podražaje, osjetljive su na promjene u redoks-ravnoteži. Kada zaštitni sustavi ne uspijevaju neutralizirati nastale reaktivne metabolite, dolazi do produljene disfunkcije stanica i sporijeg povratka u stanje stabilnosti. Takva situacija pogoduje održavanju upalnih procesa [18]. U dječjoj dobi antioksidacijska obrana djeluje unutar organizma koji je u stalnom razvoju. Metabolički zahtjevi rastućih tkiva visoki su, a sustavi zaduženi za neutralizaciju oksidacijskog opterećenja prolaze kroz faze sazrijevanja. Takve okolnosti ne znače manju otpornost, nego drukčiju raspodjelu resursa i prilagodbu promjenjivim potrebama organizma. U uvjetima sustavne upale, ravnoteža između stvaranja i uklanjanja reaktivnih metabolita može se lakše poremetiti, čime se produljuje trajanje oksidacijskog stresa [56]. Povezanost antioksidacijske obrane s genetskom varijabilnošću objašnjava individualne razlike u osjetljivosti na oksidacijskog opterećenje. Geni koji kodiraju enzime uključene u redoks-regulaciju pokazuju varijacije koje mogu utjecati na količinu, strukturu ili aktivnost tih proteina. Takve razlike ne dovode nužno do bolesti u mirnim uvjetima, ali u situacijama pojačanog metaboličkog i imunološkog stresa mogu postati vidljive kroz produljeno trajanje upale ili sporiji oporavak tkiva [16]. Glutation-S-transferaze predstavljaju dobar primjer povezanosti genetske varijabilnosti i učinkovitosti antioksidacijske obrane. Razlike u genskoj strukturi mogu dovesti do potpune odsutnosti enzima ili do promijenjene enzimске aktivnosti [8].

Tablica 2 sažima glavne komponente antioksidacijske obrane organizma i razdvaja ih na enzimске i neenzimске sustave. Za svaki sustav navodi se reprezentativan primjer, najčešće mjesto djelovanja (npr. citosol, mitohondrij, peroksisomi, plazma, membrane) te vrsta reaktivnih kisikovih spojeva ili sekundarnih produkata oksidacijskog oštećenja koje neutralizira ili čije učinke ograničava.

Tablica 2. Antioksidacijski sustavi (enzimски i neenzimски)

Sustav	Primjer	Gdje djeluje	Što neutralizira / ograničava
Enzimски	Superoksid-dismutaza (SOD1/SOD2)	citosol (SOD1), mitohondrij (SOD2)	superoksid ($O_2^{\bullet-}$) → pretvorba u H_2O_2
	Katalaza	peroksisomi	vodikov peroksid (H_2O_2) → $H_2O + O_2$
	Glutation-peroksidaza (GPx)	citosol i mitohondrij	H_2O_2 i lipidni hidroperoksidi (LOOH)
	Peroksiredoksini (Prx)	citosol/mitohondrij/ jezgra (ovisno o izoformi)	H_2O_2 i organski peroksidi; fina “kontrola” peroksida
	Tioredoxin / tioredoxin-reduktaza	citosol i mitohondrij	redukcija oksidiranih proteina (disulfidne veze), posredno smanjuje ROS-eefekte
	Glutation-reduktaza (GR)	citosol i mitohondrij	regenerira GSH iz GSSG/ oksidirani glutation (održava redoks-ravnotežu)
	GST (glutation-S-transferaze)	jetra, krvne stanice, endotel i druga tkiva	konjugira GSH na elektrofilne spojeve i sekundarne produkte lipidne peroksidacije
	NQO1 (NAD(P)H:kinon oksidoreduktaza 1)	citosol	sprječava redoks-cikliranje kinona i nastanak ROS iz kinonskih spojeva
	G6PD / pentoza-fosfatni put (NADPH)	citosol (osobito eritrociti)	osigurava NADPH za GR/TrxR; posredno čuva GSH i tioredoxin u reduciranom stanju
Neenzimски	Glutation (GSH)	visoka koncentracija u citosolu; prisutan i u mitohondriju	“pufer” redoks-stanja; hvata reaktivne metabolite, sudjeluje u GPx/GST reakcijama
	Vitamin C (askorbat)	vodena faza plazme i citosola	neutralizira radikale u vodenom okruženju; obnavlja vitamin E
	Vitamin E (tokoferoli)	membrane i lipoproteini	prekida lančanu lipidnu peroksidaciju (radikali u lipidnoj fazi)
	Urat (mokraćna kiselina)	plazma	hvata oksidanse u cirkulaciji (u fiziološkim koncentracijama)
	Bilirubin / albumin	plazma	antioksidacijska zaštita u cirkulaciji; vezanje reaktivnih spojeva

Proteini vezanja metala (transferin, ferritin, ceruloplazmin)	plazma i stanice	ograničava Fentonovu kemiju (Fe/Cu) i nastanak •OH radikala
Koenzim Q10, karotenoidi	membrane, mitohondrij	hvatanje radikala u lipidnoj fazi; potpora membranskoj stabilnosti

Izvor: Izrada autorice prema [6–8].

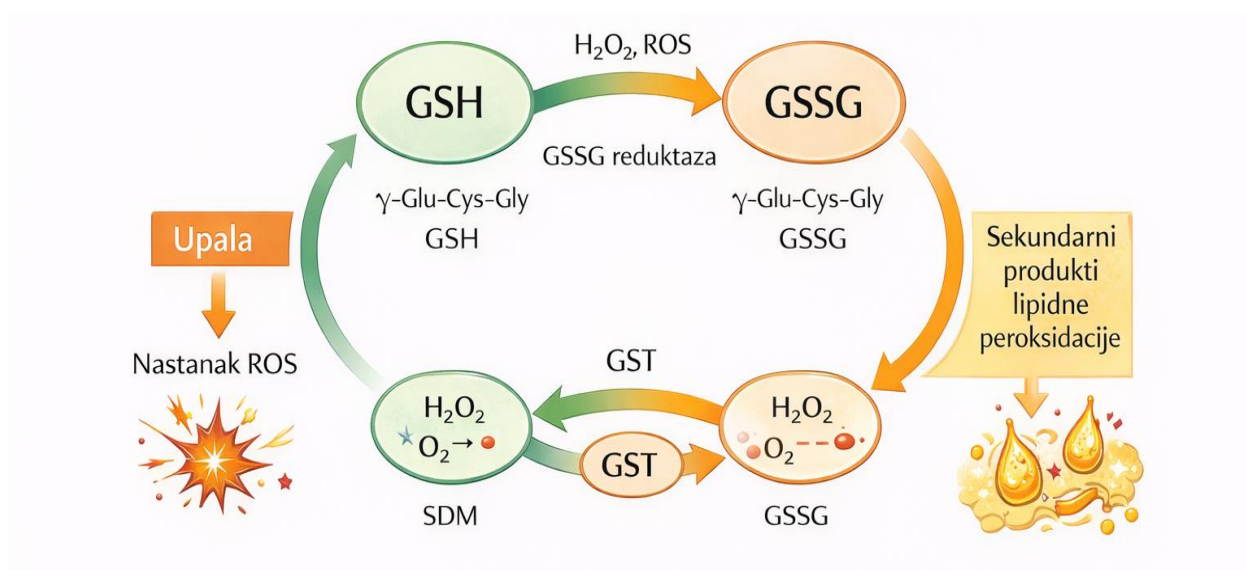
1.6. Glutation kao središnja molekula stanične zaštite

U unutrašnjosti svake stanice odvija se tihi, ali neprekidni proces održavanja ravnoteže između kemijskih reakcija koje omogućuju život i onih koje ga mogu ugroziti. U središtu tog procesa nalazi se glutathion, mala molekula sastavljena od tri aminokiseline koja se pojavljuje u gotovo svim stanicama ljudskog organizma. Njegova rasprostranjenost nije slučajna. Glutathion sudjeluje u zaštiti staničnih struktura od oštećenja nastalih tijekom normalnog metabolizma i u uvjetima pojačanog biološkog opterećenja, čime se potvrđuje njegova temeljna povezanost sa staničnom stabilnošću [6]. Biološka vrijednost glutathiona proizlazi iz njegove kemijske građe. Molekula posjeduje tiolnu skupinu koja lako reagira s reaktivnim spojevima, pri čemu se oksidira bez trajnog gubitka funkcije. Takva sposobnost omogućuje glutathionu prihvaćanje i neutralizaciju reaktivnih metabolita nastalih tijekom staničnih procesa. Nakon oksidacije glutathion se može regenerirati u svoj aktivni oblik, čime se osigurava kontinuirana zaštita stanice. Taj kružni proces daje glutathionu osobit položaj među molekulama uključenima u staničnu obranu [6]. Pojam redoks-homeostaze odnosi se na ravnotežu između oksidacijskih i redukcijskih reakcija u stanici. Glutathion djeluje kao jedan od glavnih regulatora tog stanja, jer izravno sudjeluje u prijenosu elektrona. Omjer reducirane i oksidirane forme glutathiona odražava unutarnje stanje stanice i njezinu sposobnost da se nosi s metaboličkim opterećenjem. Kada se taj omjer pomakne prema oksidiranom obliku, stanica ulazi u stanje povećane osjetljivosti na oštećenja, što može utjecati na njezinu funkciju i preživljenje [7]. Glutathion ne djeluje izolirano, nego u bliskoj povezanosti s enzimskim sustavima koji koriste njegov redukcijski potencijal. Takva suradnja omogućuje preciznu regulaciju redoks-stanja u različitim dijelovima stanice. U mitohondrijima, gdje se proizvodi najveći dio reaktivnih metabolita, glutathion pomaže u ograničavanju oštećenja nastalih tijekom stvaranja energije. U citoplazmi sudjeluje u detoksikaciji štetnih spojeva, dok u jezgri pomaže u očuvanju stabilnosti genetskog materijala [7]. Povezanost glutathiona i upale očituje se kroz njegov utjecaj na stanične signalne

putove. Promjene u redoks-stanju mogu utjecati na aktivaciju transkripcijskih čimbenika koji reguliraju ekspresiju upalnih medijatora. U uvjetima smanjene dostupnosti reduciranog glutaciona dolazi do pojačane aktivacije upalnih signala, što može produljiti trajanje imunološkog odgovora. Navedeni mehanizam objašnjava zašto poremećaji u glutacionom sustavu prate brojna upalna stanja [18]. U imunološkim stanicama glutation ima veću važnost. Aktivacija limfocita i fagocita zahtijeva intenzivne metaboličke promjene, koje su praćene stvaranjem reaktivnih kisikovih spojeva. Glutacion sudjeluje u očuvanju funkcionalnosti tih stanica, omogućujući im da odgovore na imunološke podražaje bez prelaska u stanje nekontroliranog oštećenja. Njegova dostupnost utječe na proliferaciju limfocita, proizvodnju citokina i sposobnost fagocita da reguliraju vlastiti oksidacijski odgovor [57]. Imunološke stanice pokazuju osjetljivost na promjene u glutacionom sustavu zbog svoje uloge u obrani organizma. U uvjetima produljene upale, potrošnja glutaciona raste, a sposobnost njegove regeneracije može biti smanjena. Takva neravnoteža ne dovodi samo do oštećenja samih imunoloških stanica, nego može promijeniti način na koji one komuniciraju s okolnim tkivima. Posljedica je produžena ili pojačana upalna reakcija, koja se teško vraća u stanje ravnoteže [7].

Promatranje glutaciona kao središnje molekule stanične zaštite omogućuje povezivanje metaboličkih, imunoloških i upalnih procesa u jedinstvenu cjelinu. Njegova prisutnost u različitim staničnim odjeljcima i sudjelovanje u brojnim zaštitnim reakcijama čine ga osjetljivim pokazateljem stanja stanice. Takva središnja pozicija objašnjava zašto poremećaji u glutacionom sustavu mogu imati široke posljedice koje nadilaze pojedini organ ili sustav [6].

Slika 3. daje prikaz glutationskog sustava tijekom oksidativnog stresa i upale. Upalni proces potiče nastanak reaktivnih kisikovih vrsta (ROS), među kojima su superoksidni anion (O_2^-) i vodikov peroksid (H_2O_2). Reducirani glutation (GSH), tripeptid građen od glutamata, cisteina i glicina (γ -Glu-Cys-Gly), sudjeluje u neutralizaciji reaktivnih spojeva i pritom prelazi u oksidirani oblik glutaciona (GSSG). Oksidirani glutation nastaje povezivanjem dviju molekula GSH disulfidnom vezom. Enzim glutation-reduktaza ponovno pretvara GSSG u GSH i tako obnavlja antioksidacijski kapacitet stanice. Glutacion-S-transferaze (GST) sudjeluju u detoksikaciji sekundarnih produkata lipidne peroksidacije nastalih tijekom oksidativnog oštećenja. Shema prikazuje međusobnu povezanost upale, nastanka ROS, oksidacije glutaciona i enzimskih mehanizama koji održavaju redoks-ravnotežu.



Slika 3. Glutation i GST “na jednoj stranici” (redoks krug). GSH - reducirani glutation, GSSG - oksidirani glutation, GST - glutation-S-transferaze, H₂O₂ - vodikov peroksid, O₂⁻ - superoksidni anion, ROS - reaktivne kisikove vrste. Izvor: izrada autorice

1.7. Glutation-S-transferaze - funkcionalni okvir

Stanična zaštita ne ovisi samo o prisutnosti glutathiona, nego i o enzimima koji omogućuju njegovo učinkovito korištenje. Među njima se ističu glutation-S-transferaze, skupina enzima koji sudjeluju u procesima detoksikacije i regulacije staničnog odgovora na štetne podražaje. Njihova funkcija nadilazi jednostavno vezanje glutathiona na toksične spojeve i uključuje sudjelovanje u širem spektru staničnih procesa [8]. U fazi II biotransformacije glutation-S-transferaze omogućuju konjugaciju glutathiona s elektrofilnim spojevima nastalim tijekom metabolizma ili unesene iz okoliša. Takva reakcija čini spojeve topljivima u vodi, čime se olakšava njihovo izlučivanje iz stanice. Proces ne služi samo uklanjanju stranih tvari, nego i neutralizaciji endogenih metabolita koji mogu nastati tijekom oksidacijskog stresa. Time GST enzimi doprinose očuvanju stanične stabilnosti u uvjetima pojačanog metaboličkog opterećenja [7]. Razlika između glutation-S-transferaza i primarnih antioksidacijskih enzima leži u načinu djelovanja. Dok enzimi poput superoksid-dismutaze ili katalaze izravno uklanjaju reaktivne kisikove spojeve, GST enzimi djeluju na sekundarne produkte oksidacijskog oštećenja. Njihova aktivnost usmjerena je na spojeve nastale peroksidacijom lipida i oksidacijom drugih biomolekula. Navedeni položaj u obrambenom sustavu omogućuje im da ograniče širenje oštećenja unutar stanice [8]. Lipidni peroksidi predstavljaju skupinu spojeva nastalih

oksidacijom membranskih lipida. Njihovo nakupljanje može ozbiljno narušiti integritet staničnih membrana i promijeniti funkciju membranskih proteina. Glutation-S-transferaze sudjeluju u detoksikaciji tih spojeva vezanjem glutaciona, čime se sprječava daljnja propagacija oštećenja. Navedeni mehanizam ima osobitu važnost u stanicama izloženima stalnom oksidacijskom opterećenju, poput endotelnih i imunoloških stanica [7]. Funkcija GST enzima ne završava na detoksikaciji. Istraživanja ukazuju na njihovo sudjelovanje u regulaciji signalnih putova povezanih s upalom i staničnim stresom. Interakcija GST enzima s proteinima uključenima u signalizaciju može utjecati na aktivaciju ili inhibiciju određenih upalnih kaskada. Na taj način GST enzimi sudjeluju u modulaciji odgovora stanice na stresne podražaje, bez izravnog uklanjanja reaktivnih spojeva [7]. U imunološkim stanicama takva regulacijska funkcija dobiva poveću važnost. Aktivacija signalnih putova koji kontroliraju proizvodnju citokina i proliferaciju stanica ovisi o redoks-stanju unutar stanice. Glutation-S-transferaze sudjeluju u održavanju tog stanja, čime neizravno utječu na intenzitet i trajanje imunološkog odgovora. Promjene u aktivnosti tih enzima mogu dovesti do produljene aktivacije upalnih putova ili do smanjene sposobnosti stanice da se prilagodi stresnim uvjetima [6]. Genetske razlike u genima koji kodiraju GST enzime mogu rezultirati potpunim izostankom enzimske aktivnosti ili promijenjenom funkcijom proteina. Takve razlike postaju osobito važne u uvjetima pojačanog oksidacijskog i upalnog opterećenja, kada se kapacitet detoksikacijskih sustava približava svojim granicama. U tom kontekstu GST enzimi predstavljaju vezu između genetske podloge i individualne osjetljivosti stanica na oštećenja [8].

1.8. Razredi GST enzima i njihova biološka važnost

Glutation-S-transferaze ne čine jedinstvenu cjelinu, nego obitelj enzima koji se razlikuju prema strukturi, mjestu djelovanja i vrsti supstrata koje prepoznaju. Ta raznolikost omogućuje prilagodbu stanične zaštite različitim metaboličkim zahtjevima i vrstama oksidacijskog opterećenja. Razredi GST enzima označeni su prema sekvencijskoj i strukturnoj srodnosti, a među njima se u ljudskom organizmu najčešće ističu GSTA, GSTM, GSTP i GSTT [8].

Razred GSTA obuhvaća enzime koji se pretežno izražavaju u jetri, ali su prisutni i u drugim tkivima uključenima u metabolizam i detoksikaciju. Njihova struktura omogućuje učinkovito vezanje glutaciona na širok raspon endogenih i egzogenih spojeva. GSTA enzimi sudjeluju u neutralizaciji produkata oksidacijskog oštećenja lipida i proteina, čime pridonose očuvanju

stabilnosti staničnih membrana. Zbog takvih obilježja, razred GSTA često se povezuje s općom staničnom otpornošću na kemijski i oksidacijski stres [6].

Razred GSTM karakterizira izražena varijabilnost među pojedincima. GSTM enzimi prisutni su u različitim tkivima, uključujući krvne stanice i endotel, gdje sudjeluju u obradi reaktivnih metabolita nastalih tijekom upale. Njihova biološka važnost proizlazi iz sposobnosti prilagodbe promjenjivim uvjetima unutar stanice. U situacijama pojačanog oksidacijskog opterećenja GSTM enzimi pomažu u ograničavanju sekundarnog oštećenja, što ih čini relevantnima u bolestima obilježenima produljenom upalom [7].

GSTP enzimi pokazuju drukčiji obrazac izražavanja. Često su prisutni u tkivima izloženima okolišnim podražajima i u stanicama uključenima u imunološki odgovor. Osim detoksikacijske funkcije, GSTP enzimi sudjeluju u regulaciji signalnih putova povezanih sa staničnim stresom. Njihova interakcija s proteinima uključenima u signalizaciju omogućuje modulaciju upalnog odgovora, što ih izdvaja od drugih razreda GST enzima [8].

Razred GSTT obuhvaća enzime koji sudjeluju u obradi manjih molekula i spojeva s izraženim elektrofilnim svojstvima. Njihova tkivna distribucija uključuje jetru, bubrege i krvne stanice, što ih povezuje s procesima filtracije i sistemske detoksikacije. Iako kvantitativno manje zastupljeni u odnosu na neke druge razrede, GSTT enzimi imaju važnu zadaću u obrani od specifičnih metaboličkih izazova [6].

Tkivna distribucija GST enzima odražava metaboličke potrebe pojedinih organa. Jetra pokazuje visoku raznolikost GST razreda zbog svoje središnje uloge u biotransformaciji. Bubrezi i krvne stanice izražavaju GST izoenzime povezane s filtracijom i transportom metabolita. U imunološkim stanicama prisutnost određenih razreda GST povezana je s regulacijom upalnog odgovora i prilagodbom oksidacijskom opterećenju [7]. Funkcionalne razlike među razredima GST enzima proizlaze iz njihove strukture i specifičnosti prema supstratima. Neki izoenzimi pokazuju visoku aktivnost prema lipidnim peroksidima, dok su drugi usmjereni prema metabolitima lijekova ili okolišnih toksina. Takva specijalizacija omogućuje stanicama da odgovore na različite vrste kemijskog stresa bez oslanjanja na jedinstveni mehanizam obrane [8]. Klinička relevantnost pojedinih izoenzima proizlazi iz njihove povezanosti s osjetljivošću na oksidacijsko i upalno opterećenje. Razlike u aktivnosti GSTA, GSTM, GSTP i GSTT mogu utjecati na to kako stanice reagiraju u uvjetima produljene upale.

1.9. Genetska varijabilnost GST enzima

Razlike u aktivnosti glutation-S-transferaza među pojedincima ne ovise samo o okolišu, nego i o genskoj raznolikosti. Geni koji kodiraju *GST* enzime sadrže varijante koje mogu utjecati na prisutnost enzima, njegovu količinu ili funkcionalnost. Zbog toga se među pojedincima razlikuje sposobnost neutralizacije reaktivnih metabolita i podnošenja oksidacijskog i upalnog opterećenja [8]. Polimorfizmi su trajne varijacije u slijedu DNA koje se pojavljuju u populaciji. U *GST* sustavu dio polimorfizama dovodi do potpunog izostanka enzima, dok dio mijenja njegovu aktivnost ili razinu ekspresije. U svakodnevnim uvjetima takve razlike ne moraju biti vidljive. Tijekom jačeg metaboličkog ili imunološkog opterećenja njihov učinak postaje izraženiji [7].

Najpoznatiji primjeri potpunog gubitka enzima odnose se na *GSTM1* i *GSTT1*. Kod tih gena delecija može dovesti do null genotipa, odnosno do potpunog izostanka funkcionalnog proteinskog produkta. Posljedica je manji kapacitet detoksikacije za dio supstrata i veća osjetljivost stanice na oksidacijsko oštećenje tijekom produljene upale [14]. Drugu skupinu čine SNP varijante, odnosno polimorfizmi jednog nukleotida. Takve promjene ne uklanjaju enzim, nego mijenjaju njegovu funkciju. U genu *GSTP1* čest je polimorfizam Ile105Val, koji dovodi do zamjene aminokiseline u katalitičkom području proteina. Takva promjena može utjecati na afinitet enzima prema supstratu i njegovu katalitičku učinkovitost, pa se funkcionalne razlike među pojedincima mogu izraziti tek u uvjetima pojačanog oksidacijskog opterećenja [15]. Varijante u genu *GSTA1* najčešće djeluju preko promjene ekspresije. Promotorska regija regulira količinu nastalog enzima, pa promjene u tom dijelu gena mogu dovesti do niže razine ekspresije. U takvim okolnostima stanica ima funkcionalan enzim, ali ga ima manje, što smanjuje zaštitni kapacitet tijekom upale ili pojačanog metabolizma [16].

Genetska varijabilnost *GST* enzima zato se može promatrati kroz dvije glavne skupine. Prvu čine delecije koje uklanjaju enzim, a drugu varijante koje mijenjaju njegovu aktivnost ili količinu. Takva podjela olakšava tumačenje biološkog učinka pojedinog genotipa. Delecije *GSTM1* i *GSTT1* nose jasniji funkcionalni učinak jer enzim izostaje. Nasuprot tomu, polimorfizam *GSTP1* i promotorske varijante *GSTA1* češće djeluju kroz blaže, ali klinički važne promjene u katalizi ili ekspresiji [6–7]. U biološkom sustavu pojedini *GST* izoenzimi ne djeluju izolirano. Različiti razredi imaju različitu tkivnu raspodjelu i različite supstrate, pa se učinak pojedine varijante može razlikovati ovisno o vrsti opterećenja. Zbog toga se sve češće ne promatra samo jedan polimorfizam, nego kombinacija više varijanti. Kombinacije poput *GSTM1* null i *GSTT1* null, uz promjene u *GSTP1* ili *GSTA1*, mogu dodatno smanjiti kapacitet stanične obrane u uvjetima jače upale i oksidacijskog stresa [7–8]. U istraživanjima upalnih bolesti genetski podatak ima veću vrijednost kada se poveže s funkcionalnim pokazateljima,

kao što su aktivnost GST ili biomarkeri oksidacijskog opterećenja. Takav pristup povećava biološku uvjerljivost rezultata i olakšava povezivanje genotipa s kliničkom slikom [7, 17].

Radi lakšeg pregleda razreda citosolnih GST, tipičnih gena i najčešćih polimorfizama relevantnih u populacijskim istraživanjima, u Tablici 3 prikazani su osnovni oblici genetske varijabilnosti te njihov sažeti funkcionalni učinak.

Tablica 3. Razredi citosolnih GST i česti polimorfizmi relevantni u populacijskim studijama (primjeri)

Razred GST	Tipični geni	Česti polimorfizmi (primjeri)	Tip učinka	Funkcionalna posljedica (sažeto)	Izvori
Alfa	GSTA1	promotorne varijante (različiti haplotipovi)	regulacija ekspresije	smanjena količina enzima u tkivu, manja “rezerva” pri opterećenju	Ping i sur., 2006; Mazari i sur., 2023
Mu	GSTM1	GSTM1 null (delecija gena)	prisutnost enzima	izostanak GSTM1, manji kapacitet konjugacije za dio supstrata	Abdel-Rahman i sur., 1996; Strange i sur., 2001
Pi	GSTP1	Ile105Val (SNP)	promjena katalize	promijenjen afinitet/učinkovitost prema supstratima	Harries i sur., 1997; Mazari i sur., 2023
Teta	GSTT1	GSTT1 null (delecija gena)	prisutnost enzima	izostanak GSTT1, promjena kapaciteta detoksikacije za dio supstrata	Abdel-Rahman i sur., 1996; Strange i sur., 2001

Najčešći laboratorijski pristupi za analizu GST polimorfizama razlikuju se prema vrsti genske promjene, pa su u Tablici 4 prikazane metode koje se najčešće koriste za detekciju delecija, SNP varijanti i promjena u regulatornim regijama.

Tablica 4. Najčešći laboratorijski pristupi za analizu GST polimorfizama u istraživačkim uzorcima

Cilj analize	Primjer polimorfizma	Najčešća metoda	Što metoda daje	Izvori
Detekcija delecije (<i>null</i>)	<i>GSTM1 null</i> , <i>GSTT1 null</i>	višestruki PCR s internom kontrolom	prisutnost/izostanak gena (genotip “present” vs. “ <i>null</i> ”)	Abdel-Rahman i sur., 1996
SNP u kodirajućoj regiji	<i>GSTP1</i> Ile105Val	PCR + genotipizacija (npr. restrikcijska analiza ili drugi SNP pristupi)	alel i genotip, moguća korelacija s funkcijom	Harries i sur., 1997
Varijante regulatorne regije	<i>GSTA1</i> promotor	genotipizacija promotorskih varijanti	procjena rizika niže ekspresije u populaciji	Ping i sur., 2006

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja jest ispitati povezanost polimorfizama *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTA1* s pojavom IgA vaskulitisa (IgAV) u djece u Republici Hrvatskoj te s unaprijed definiranim kliničkim podfenotipovima bolesti. Populacija je mješovita, obuhvaća rodbinski nepovezanu djecu koja gravitiraju tercijarnim pedijatrijskim centrima u RH (Zagreb, Split, Osijek, Rijeka).

Specifični ciljevi:

1. Usporediti frekvencije alela i genotipova (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTA1*) između bolesnika s IgAV i kontrola.
2. Ispitati povezanost biokemijskih parametara za karakterizaciju fenotipa IgA vaskulitisa s genotipovima GST gena (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTA1*)
3. Ispitati povezanost navedenih polimorfizama s kliničkim podfenotipovima bolesti (koža, gastrointestinalno zahvaćanje, nefritis, orhitis, relaps).

2.1. Hipoteza istraživanja

Određeni polimorfizmi u genima glutathion-S-transferaza (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*, *GSTA1*) povezani su s povećanim rizikom za IgA vaskulitis i s odabranim kliničkim podfenotipovima bolesti u djece. Istraživanje je usmjereno na procjenu genetske predispozicije i povezanosti s fenotipom; ne postavljamo hipotezu o dijagnostičkim biomarkerima težine bolesti.

3. BOLESNICI I METODE

3.1. Veličina uzorka i snaga istraživanja

Istraživanje je provedeno kao multicentrična studija slučajeva i kontrola u pet tercijarnih pedijatrijskih centara u Republici Hrvatskoj: (1) KBC Zagreb – Klinika za pedijatriju, (2) Klinika za dječje bolesti Zagreb, (3) KBC Split, (4) KBC Osijek i (5) KBC Rijeka. Uključivanje centara u Osijeku i Rijeci omogućilo je bolju geografsku zastupljenost ispitanika i veću snagu uzorka. Za provedbu istraživanja dobivena su etička odobrenja nadležnih etičkih povjerenstava uključenih ustanova odobrenje Etičkog povjerenstva Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur. br. 380-59-10106-19-111/215; Klasa 641-01/19-02/01; datum 18. 09. 2019.). U skupinu slučajeva uključena su rodbinski nepovezana djeca s novodijagnosticiranim IgA vaskulitisom prema važećim EULAR/PRINTO/PRES kriterijima, regrutirana kao uzastopni bolesnici u navedenim centrima.

Kriteriji za uključivanje bolesnika bili su:

- dijagnoza IgA vaskulitisa prema EULAR/PRINTO/PRES kriterijima, odnosno palpabilna purpura, najčešće na donjim ekstremitetima, bez trombocitopenije ili drugih koagulopatija, uz barem još jedan od sljedećih kriterija:
 - difuzna bol u trbuhu koja može biti povezana s gastrointestinalnim krvarenjem,
 - histopatološki nalaz leukocitoklastičnog vaskulitisa s IgA depozitima u stijenci malih krvnih žila ili glomerulonefritisa s IgA depozitima,
 - akutni prolazni artritis ili artralgiya, najčešće velikih zglobova, te
 - bubrežna zahvaćenost definirana hematurijom i/ili proteinurijom.
- Dodatni kriteriji za uključivanje bili su dob manja od 18 godina te potpisan informirani pristanak roditelja ili skrbnika, kao i pristanak djeteta u dobi od 18 godina.

Iz istraživanja su isključeni bolesnici s drugim sistemskim vaskulitisima, primarnim imunodeficijencijama, aktivnim malignitetom i nedostatnom medicinskom dokumentacijom.

Kontrolnu skupinu činila su rodbinski nepovezana djeca iz opće pedijatrijske populacije. Kontrole nisu regrutirane iz populacije sa sumnjom na IgA vaskulitis, nego iz skupina kao što su rutinski pregledi, preoperativne procjene i ambulantne kontrole.

Kriteriji za uključivanje u kontrolnu skupinu bili su:

- odsutnost autoimunih bolesti i kroničnih bubrežnih bolesti,
- odsutnost aktualne febrilne bolesti ili akutne upale te
- odsutnost povijesti IgA vaskulitisa.

Kontrole su definirane kao zdrave u trenutku uzorkovanja, bez kliničkih i laboratorijskih znakova akutne upale. Za potvrdu uključenja korištena je postojeća medicinska dokumentacija. Iz kontrolne skupine isključeni su ispitanici s imunodeficiijama, nedavnom hospitalizacijom zbog teške infekcije, uporabom sistemskih kortikosteroida neposredno prije uzorkovanja te ranije dijagnosticiranim IgA vaskulitisom.

Za slučajeve i kontrole prikupljan je standardizirani skup kliničkih, biokemijskih i imunoloških parametara, u istom formatu kada je to bilo klinički primjenjivo. Takav pristup omogućio je usporedivost podataka između skupina. U konačnu analizu uključena su 124 bolesnika i 94 kontrole. Svi ispitanici u kontrolnoj skupini bili su starosti 16 ili više godina, što je bilo važno zbog usporedbe sa starijim adolescentima uključenima u analize.

3.2. Uzorci, pohrana i laboratorijske metode

Za fenotipsku karakterizaciju IgAV prikupljeni su standardizirani klinički i laboratorijski podaci. U slučajevima i kontrolama zabilježeni su demografski podaci (dob, spol; prema dostupnosti) te kliničke manifestacije (koža, zglobovi, gastrointestinalne manifestacije, bubrežno zahvaćanje/nefritis, urogenitalne komplikacije poput orhitisa, te recidiv).

Definiran je skup laboratorijskih varijabli koje su, gdje je klinički primjenjivo, prikupljene jednako i u kontrolnoj skupini. U svim ispitanicima kontrolne skupine učinjena je kompletna krvna slika (KKS), koja je obuhvaćala broj eritrocita, koncentraciju hemoglobina, hematokrit, eritrocitne indekse, broj leukocita s diferencijalnom krvnom slikom te broj trombocita i trombocitne indekse. Sve izmjerene vrijednosti bile su unutar referentnih granica za dob i spol, bez nalaza koji bi upućivali na akutnu upalu, hematološki poremećaj ili drugo stanje koje bi moglo utjecati na prikladnost uključivanja u kontrolnu skupinu.

Laboratorijske pretrage obuhvaćale su upalne i koagulacijske pokazatelje (sedimentacija eritrocita (SE/ESR), C-reaktivni protein (CRP), fibrinogen, D-dimer, protrombinsko vrijeme

(PT), aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme (aPTT), feritin, kompletna krvna slika, urea, kreatinin, ukupni proteini, albumin, imunoglobulin A (IgA), imunoglobulin G (IgG), imunoglobulin M (IgM), komponenta komplementa 3 (C3), komponenta komplementa 4 (C4) te, prema potrebi, ukupna hemolitička aktivnost klasičnog puta komplementa (CH50)) te dodatne testove prema kliničkoj indikaciji (npr. fekalni kalprotektin).

U procjeni bubrežnog zahvaćanja praćeni su parametri urinarnog nalaza i proteinurije (eritrociti u urinu/hematurija; uACR i/ili 24-satna proteinurija, gdje je dostupno) te procijenjena je glomerularna filtracija (eGFR).

Periferna krv izuzeta je standardnim postupkom u epruvete od 3 mL s antikoagulansom EDTA. Uzorci su označeni jedinstvenom šifrom ispitanika i evidentirano je vrijeme uzorkovanja. Uzorci su do obrade transportirani i čuvani prema uobičajenim laboratorijskim postupcima ustanove, uz mjere koje smanjuju rizik predanalitičkih pogrešaka. Rutinske laboratorijske analize napravljene su u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb prema standardnim laboratorijskim postupcima.

3.3. Izdvajanje i pohrana genomske DNA

Genomska DNA izdvojena je iz pune periferne krvi prikupljene u EDTA epruvete korištenjem kompleta QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Njemačka), prema uputama proizvođača. Uzorci su prije izdvajanja identificirani jedinstvenom šifrom ispitanika te je vođena evidencija o datumu uzorkovanja, datumu izolacije i seriji reagensa. Izdavanje je provedeno u serijama u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, uz strogo odvajanje prostora za pripremu uzoraka i prostora za amplifikaciju, radi smanjenja rizika kontaminacije.

Metoda je temeljena na spin-kolonama uključila je lizu stanica i vezanje DNA na silikatnu membranu, zatim višekratna ispiranja za uklanjanje proteina, soli i potencijalnih inhibitora PCR reakcije, te eluiranje DNA u AE puferu. U svakoj seriji izdvajanja uključena je negativna kontrola izdvajanja (prazna epruveta/reagens bez uzorka) radi praćenja eventualne kontaminacije tijekom postupka.

Koncentracija izdvojene DNA određena je fluorometrijski uređajem Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) uz primjenu reagensa Qubit dsDNA BR

Assay, prema protokolu proizvođača. Fluorometrijska metoda korištena je zbog veće selektivnosti za dvolančanu DNA i manjeg utjecaja kontaminanata u usporedbi sa spektrofotometrijom.

Čistoća DNA procjenjena je spektrofotometrijski na uređaju NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, SAD) omjerom apsorbancije A260/280, pri čemu se prihvatljivim smatra raspon 1,8-2,0. Po potrebi je procjenjen i omjer A260/230 radi uvida u moguće ostatke soli ili organskih spojeva; uzorci izvan prihvatljivih granica ponovno su pročišćeni ili je ponavljen proces izdvajanja.

Nakon kvantifikacije, DNA je po potrebi homogenizirana i alikvotirana u više manjih volumena kako bi se smanjio broj ciklusa smrzavanja i odmrzavanja.

Za genotipizaciju je pripremljena radna otopina DNA razrijeđena na unaprijed definiranu koncentraciju, ovisno o zahtjevima pojedine metode (PCR, PCR-RFLP), dok su matični alikvoti čuvani odvojeno. Izdvojena DNA pohranjena je u AE puferu na -20°C do daljnje analize. Tijekom pohrane i rukovanja uzorcima primijenjeni su standardni postupci biosigurnosti, a svi podaci o uzorcima (šifra, lokacija pohrane, broj alikvota, rezultati kvantifikacije i čistoće) zabilježeni su u laboratorijskoj evidenciji i elektroničkoj bazi podataka.

3.4. Određivanje polimorfizama gena GST

Genotipizacija je obuhvatila najčešće polimorfizme gena glutation-S-transferaza (GST): delecijske polimorfizme gena *GSTM1* i *GSTT1* te polimorfizme jednog nukleotida (SNP) u genima *GSTA1* i *GSTP1*. Svi polimorfizmi određeni su iz izdvojene genomske DNA. Uzorci su analizirani pod šiframa, bez uvida u pripadnost skupini (IgAV/kontrola), a svi koraci (priprema reakcija, amplifikacija, elektroforeza, očitavanje) provedeni su prema unaprijed definiranim laboratorijskim postupcima. Napravljena je i kontrola kvalitete genotipizacije. U svakoj seriji uključena je negativna kontrola (NTC; reakcija bez DNA). Kod PCR-RFLP analiza uključeni su kontrolni uzorci poznatog genotipa kada su dostupni. Uzorci s nejasnim nalazom (slab signal, nespecifične trake) ponovljeni su; trajno neodredivi uzorci označeni su kao nedostajući podatak.

3.4.1. Određivanje delecijuskog polimorfizma gena *GSTM1*

Delecijiski polimorfizam gena *GSTM1* određen je metodom višestruke lančane reakcije polimerazom (multiplex PCR) prema [14]. PCR reakcija provedena je u ukupnom volumenu od 50 µL i sadržavala je odgovarajući pufer, MgCl₂, dNTP, početnice, Taq DNA polimerazu i 100 ng genomske DNA, ovisno o koncentraciji uzorka.

Korištene su sljedeće početnice:

- *GSTM1* forward: 5'-GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC-3'
- *GSTM1* reverse: 5'-GTTGGGCTCAAATATACGGTGG-3'

Kao unutarnja kontrola uspješnosti PCR reakcije koamplificiran je ekson 7 gena *CYP1A1*, uz početnice:

- *CYP1A1* forward: 5'-GAACTGCCACTTCAGCTGTCT-3'
- *CYP1A1* reverse: 5'-CAGCTGCATTGGAAGTGCTC-3'

PCR je proveden na uređaju Mastercycler PCR (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) kroz 33 ciklusa. Inicijalna denaturacija trajala je 4 minute na 94°C. Nakon toga slijedili su ciklusi denaturacije na 94°C tijekom 2 minute, annealinga na 59°C tijekom 1 minute i elongacije na 72°C tijekom 1 minute. Završna elongacija trajala je 10 minuta na 72°C.

PCR produkti razdvojeni su elektroforezom na 2,5 % agaroznom gelu uz DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific GeneRuler 100 bp ladder pri naponu od 150 V tijekom 60 minuta. Fragmenti su vizualizirani bojenjem s etidij bromidom. Očekivana veličina amplificiranog fragmenta *GSTM1* iznosila je 215 bp. Uz prisutnu amplifikaciju kontrolnog fragmenta *CYP1A1*, izostanak *GSTM1* trake interpretiran je kao *GSTM1*-null genotip. Metoda je razlikovala prisutan i null genotip, bez razlučivanja heterozigotnog i homozigotnog present stanja.

3.4.2. Određivanje delecijuskog polimorfizma gena *GSTT1*

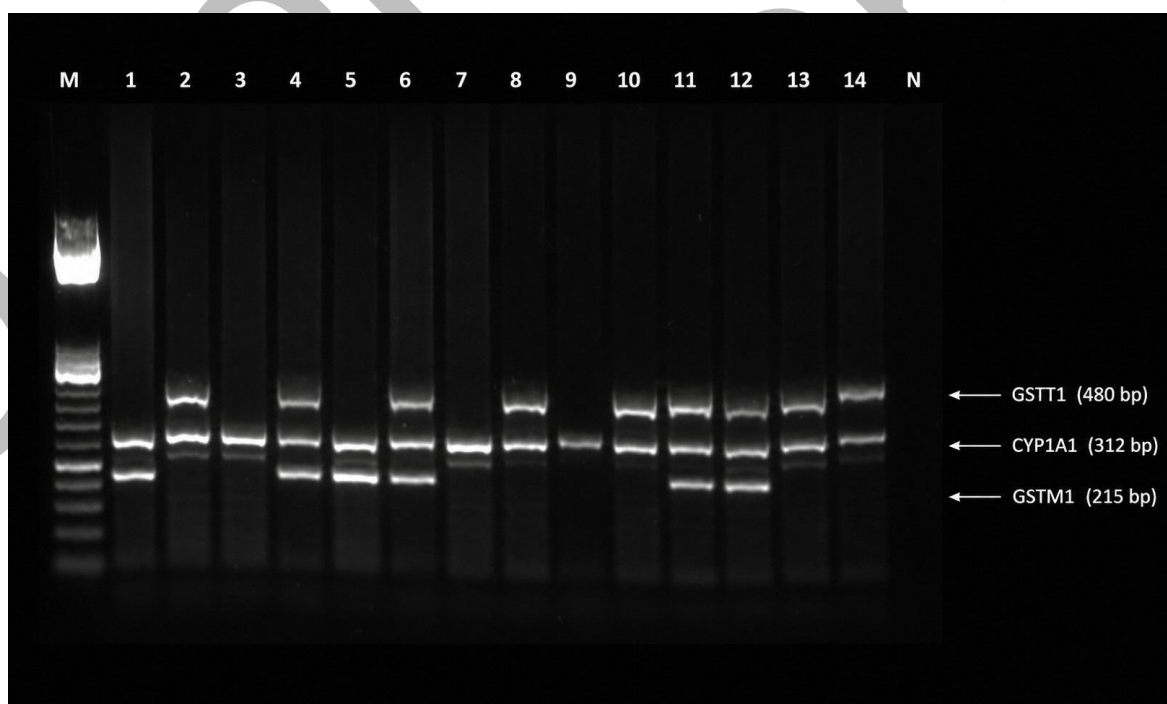
Genotipizacija delecijuskog polimorfizma gena *GSTT1* provedena je metodom višestrukog PCR-a prema [14], uz prilagodbu temperature annealinga. PCR reakcija provedena je u ukupnom volumenu od 50 µL i sadržavala je iste osnovne komponente kao reakcija za *GSTM1*, uključujući unutarnju kontrolu *CYP1A1* radi potvrde uspješnosti reakcije.

Korištene su sljedeće početnice:

- GSTT1 forward: 5'-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3'
- GSTT1 reverse: 5'-TCACGGGATCATGGCCAGCA-3'

PCR je započeo inicijalnom denaturacijom tijekom 4 minute na 94°C. Nakon toga slijedila su 33 ciklusa denaturacije na 94°C tijekom 2 minute, annealinga na 61°C tijekom 1 minute i elongacije na 72°C tijekom 1 minute. Završna elongacija trajala je 6 minuta na 72°C.

PCR produkti razdvojeni su elektroforezom na 1 % agaroznom gelu uz DNA markera r, Thermo Fisher Scientific GeneRuler 100 bp ladder, pri naponu od 150 V tijekom 60 minuta. Fragmenti su vizualizirani bojenjem s etidijevim bromidom. Izostanak *GSTT1*-specifičnog PCR produkta uz prisutan *CYP1A1* fragment upućivao je na *GSTT1*-null genotip. Kao i kod *GSTM1*, metoda je razlikovala present i null genotip, bez razlučivanja heterozigotnog i homozigotnog present stanja. Rezultati višestruke PCR analize gena *GSTT1* i *GSTM1*, uz kontrolni fragment *CYP1A1*, prikazani su na Slici 4. Kontrolna traka od 312 bp potvrđuje uspješnu amplifikaciju, dok trake od 480 bp i 215 bp omogućuju određivanje *GSTT1*-present i *GSTM1*-present genotipa.



Izvor: izrada autorice

Slika 4. Elektroforetski prikaz produkata višestruke PCR analize gena GSTT1 i GSTM1 uz unutarnju kontrolu CYP1A1. Očekivane veličine fragmenata: GSTT1 480 bp, CYP1A1 312 bp i GSTM1 215 bp. M = DNA marker; 1-14 = analizirani uzorci; N = negativna kontrola.

3.4.3. Određivanje polimorfizma gena *GSTA1*

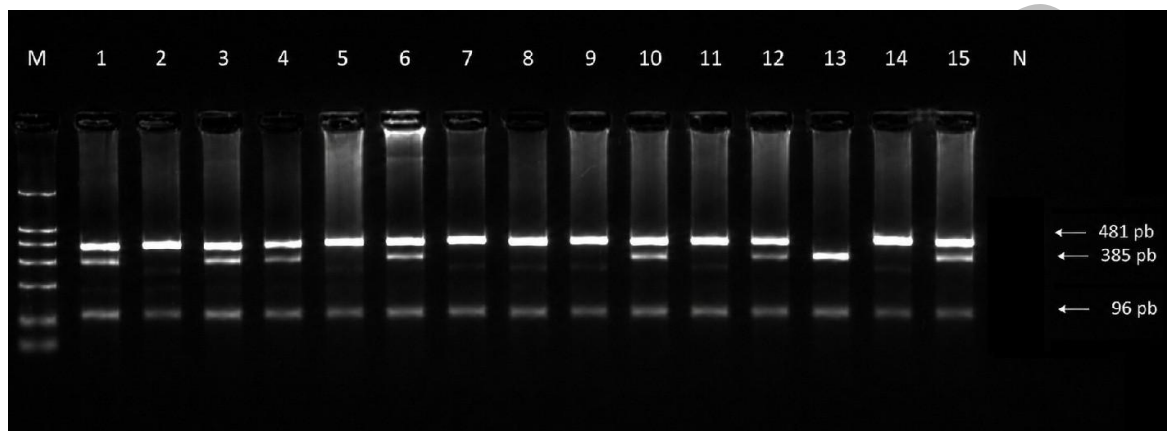
Polimorfizam *GSTA1* C-69T (rs3957357) određen je metodom PCR-RFLP prema [58], uz prilagodbu termocikličkih uvjeta. PCR reakcija provedena je u ukupnom volumenu od 50 µL, a sadržavala je odgovarajući pufer, MgCl₂, dNTP, početnice, Taq DNA polimerazu i 100 ng genomske DNA. PCR je započeo početnom denaturacijom na 95°C tijekom 1 minute. Nakon toga slijedila su 32 ciklusa: denaturacija na 94°C tijekom 50 sekundi, annealing na 62°C tijekom 56 sekundi i elongacija na 72°C tijekom 60 sekundi. Završna elongacija trajala je 7 minuta na 72°C. Amplificirani PCR produkt digestiran je restrikcijskim enzimom EarI preko noći na 37°C, prema preporukama proizvođača, sadržavala je odgovarajući pufer, Amplificirani PCR produkt (480 bp) digestiran je restrikcijskim enzimom EarI (New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA) preko noći na 37°C, prema preporukama proizvođača, uz sljedeće uvjete: 10 µL PCR produkta, 1 µL enzima EarI (20 U/µL), 2 µL 10X NEBuffer-a i 7 µL nuclease-free vode, za ukupni volumen reakcije od 20 µL. Restrikcijski fragmenti razdvojeni su elektroforezom na 2 % agaroznom gelu uz DNA markera, Thermo Fisher Scientific GeneRuler 100 bp ladder, pri 100 V tijekom 45minuta. Fragmenti su vizualizirani bojenjem s Etidijevim bromidom.

Genotip je određen prema obrascu fragmenata:

- *GSTA1* T/T: 481 bp
- *GSTA1* T/C: 481 bp, 385 bp i 96 bp
- *GSTA1* C/C: 385 bp i 96 bp

Uzorci s nepotpunom digestijom ponovljeni su nakon optimizacije uvjeta restrikcije.

Reprezentativni obrasci fragmenata dobiveni PCR-RFLP analizom polimorfizma GSTA1 C-69T prikazani su na Slici 5. Fragmenti veličine 481, 385 i 96 bp omogućuju razlikovanje genotipova T/T, T/C i C/C.



Slika 5. Elektroforetski prikaz PCR-RFLP analize polimorfizma GSTA1 C-69T (rs3957357). Genotip T/T daje fragment od 481 bp, T/C fragmente od 481, 385 i 96 bp, a C/C fragmente od 385 i 96 bp. M = DNA marker; 1-15 = analizirani uzorci; N = negativna kontrola. Izvor: izrada autorice.

3.4.4. Određivanje polimorfizama gena *GSTP1* Ile105Val (rs1695)

SNP polimorfizam *GSTP1* Ile105Val (rs1695) određen je metodom PCR-RFLP prema [15].

Počelnice:

- *GSTP1* rs1695 forward: 5'-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3'
- *GSTP1* rs1695 reverse: 5'-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3'

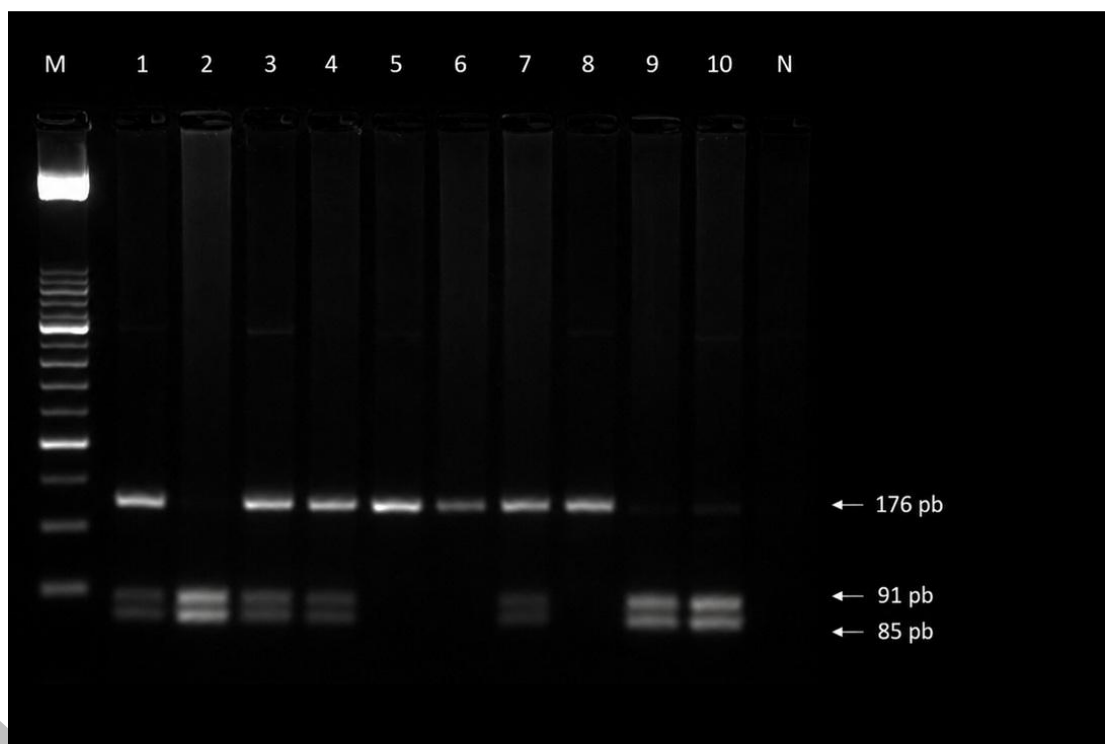
PCR je napravljen u 35 ciklusa uz početnu denaturaciju 2 minute na 94°C, zatim denaturacija (94°C, 30 s), annealing (55°C, 30 s) i elongacija (72°C, 30 s), uz završnu elongaciju 5 minuta na 72°C. Očekivani PCR produkt iznosi 176 bp te je provjeren elektroforezom na 2,5 % agaroznom gelu.

Amplificirani produkt razgrađen je restrikcijskim enzimom Alw26I (2 U) pri 37°C tijekom 16 sati. Restrikcijski fragmenti razdvojeni su na 3 % agaroznom gelu uz DNA marker. Genotip je određen prema obrascu fragmenata:

- Ile/Ile: nedigestirani fragment 176 bp

- Ile/Val: 176 bp + 91 bp + 85 bp
- Val/Val: 91 bp + 85 bp

Ukoliko su trake bile slabe ili je rezolucija bila nedovoljna (osobito za kratke fragmente), elektroforeza je ponavljena uz optimizaciju koncentracije agaroze, vremena i napona. Elektroforetski prikaz produkata PCR-RFLP analize polimorfizma GSTP1 Ile105Val prikazan je na Slici 6. Razlike u obrascu traka omogućuju identifikaciju genotipova Ile/Ile, Ile/Val i Val/Val.



Slika 6. Elektroforetski prikaz PCR-RFLP analize polimorfizma GSTP1 Ile105Val (rs1695). Genotip Ile/Ile daje fragment od 176 bp, Ile/Val fragmente od 176, 91 i 85 bp, a Val/Val fragmente od 91 i 85 bp. M = DNA marker; 1-10 = analizirani uzorci; N = negativna kontrola.

Izvor: izrada autorice.

3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka provedena je nakon zatvaranja baze i provjere potpunosti unosa. Kvalitativne varijable prikazane su apsolutnim i relativnim frekvencijama, a kvantitativne varijable, ovisno o raspodjeli podataka, aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom ili medijanom i interkvartilnim rasponom. Normalnost raspodjele kvantitativnih varijabli procijenjena je Shapiro-Wilkovim testom. Za usporedbu dviju neovisnih skupina za kvantitativne varijable korišten je Studentov t-test kada su bili zadovoljeni preduvjeti normalne raspodjele, a u suprotnom Mann-Whitneyjev U-test. Za usporedbu triju ili više neovisnih skupina korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA) kada su podatci slijedili približno normalnu raspodjelu, a u suprotnom Kruskal-Wallisov test. Kategorijske varijable uspoređivane su hi-kvadrat testom, odnosno Fisherovim egzaktnim testom kada očekivane frekvencije u pojedinim ćelijama nisu zadovoljavale pretpostavke za primjenu hi-kvadrat testa.

U analizi povezanosti polimorfizama gena glutation-S-transferaza s pojavom IgA vaskulitisa uspoređivane su frekvencije genotipova i alela između skupine bolesnika i kontrolne skupine. Za delecijske polimorfizme *GSTM1* i *GSTT1* genotipovi su analizirani kao present i null. Za polimorfizme *GSTA1* i *GSTP1* analizirane su genotipske i alelne frekvencije, a dodatno su procijenjeni dominantni i recesivni modeli nasljeđivanja. Povezanost genotipova s bolešću izražena je omjerom izgleda (OR) i 95 %-tnim intervalom pouzdanosti.

Za SNP varijante *GSTA1* i *GSTP1* u kontrolnoj skupini ispitana je Hardy-Weinbergova ravnoteža hi-kvadrat testom. Odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže uzeto je u obzir pri tumačenju rezultata, osobito za polimorfizme kod kojih je u kontrolnoj skupini utvrđena neravnomjerna raspodjela genotipova. U bolesničkoj skupini analizirana je povezanost genotipova s kliničkim i laboratorijskim obilježjima bolesti. Kliničke varijable uključivale su kožne, zglobove, gastrointestinalne i bubrežne manifestacije, relaps bolesti, podatke o prethodnoj infekciji te primijenjenoj terapiji. Laboratorijske varijable obuhvatile su upalne pokazatelje, parametre kompletne krvne slike, biokemijske pokazatelje bubrežne funkcije, parametre koagulacije i imunološke pokazatelje. Za kategorijske kliničke varijable korišteni su hi-kvadrat test ili Fisherov egzaktni test, a za kvantitativne laboratorijske varijable t-test, ANOVA, Mann-Whitneyjev U-test ili Kruskal-Wallisov test, ovisno o broju uspoređivanih skupina i raspodjeli podataka. Zbog različitog broja dostupnih podataka za pojedine kliničke i laboratorijske varijable, analize su provedene na dostupnim podacima za svaku pojedinu varijablu. Uzorci s neodredivim genotipom ili nedostatnim kliničkim odnosno laboratorijskim

podacima nisu uključivani u pojedinu analizu. Broj ispitanika uključenih u svaku analizu naveden je u odgovarajućim tablicama ili legendama tablica. Sve su statističke analize provedene kao dvosmjerne, a razina statističke značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Statistička obrada podataka provedena je u programu R, verzija 4.4.3 (R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija).

4. REZULTATI

U istraživanje su uključena 293 bolesnika s IgA vaskulitisom i 94 kontrolna ispitanika. U tablici 5 prikazana je dobna i spolna struktura ispitanika uključenih u istraživanje. Svi ispitanici u kontrolnoj skupini bili su starosti 16 ili više godina. U tablici su prikazane i osnovne usporedbe između skupina za dob i spol.

Tablica 5. Demografski i osnovni antropometrijski podaci ispitanika.

Skupina	N ukupno	Potvrđeno ≥ 16 godina, n (%)	Dob (godine), M ± SD	Muški spol, n (%)	Ženski spol, n (%)
Kontrole	94	94 (100,0 %)	27,2 ± 11,3	48 (51,1 %)	46 (48,9 %)
IgAV	293	0 (0,0 %)	6,6 ± 3,1	136 (46,4 %)	157 (53,6 %)
p*			< 0,001	0,431	0,431

N - broj ispitanika; M - aritmetička sredina; SD - standardno raspršenje; *p - p-vrijednost za usporedbu skupina.

Bolesnici s IgA vaskulitisom imali su više srednje vrijednosti eritrocita, leukocita i trombocita u odnosu na kontrolnu skupinu, dok su hemoglobin i hematokrit bili niži u skupini bolesnika (Tablica 6). Za sve prikazane parametre utvrđena je statistički značajna razlika između skupina. Najizraženija razlika zabilježena je za leukocite, što je očekivano s obzirom na upalnu prirodu bolesti i činjenicu da su bolesnici analizirani u kliničkom kontekstu IgA vaskulitisa. Više vrijednosti trombocita u skupini IgAV mogu odražavati reaktivni hematološki odgovor povezan s upalom. Niže vrijednosti hemoglobina i hematokrita u skupini bolesnika treba tumačiti oprezno jer se skupine razlikuju prema dobi, a hematološki parametri ovise o dobi, spolu i fazi bolesti.

Tablica 6. Usporedba dostupnih parametara kompletne krvne slike između bolesnika s IgA vaskulitisom i kontrolne skupine

Parametar	IgAV (n = 124), M ± SD	Kontrole (n = 94), M ± SD	p*
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	4,67 ± 0,41	4,40 ± 0,29	< 0,001
Hemoglobin (g/L)	124,76 ± 10,48	130,04 ± 10,97	< 0,001
Hematokrit	0,36 ± 0,03	0,40 ± 0,04	< 0,001
Leukociti ($\times 10^9/L$)	10,72 ± 3,37	5,45 ± 0,85	< 0,001
Trombociti ($\times 10^9/L$)	353,07 ± 91,01	263,71 ± 60,47	< 0,001

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. IgAV = IgA vaskulitis; M = aritmetička sredina; SD = standardna devijacija. *p-vrijednosti izračunate su Welchovim t-testom za nezavisne uzorke. Usporedba je provedena samo za parametre dostupne u objema skupinama.

U tablici 7 prikazan je broj uspješno genotipiziranih ispitanika za svaki analizirani lokus. Manje razlike u broju genotipiziranih uzoraka posljedica su pojedinačnih neuspjelih očitavanja, ponovljenih analiza ili rezultata koji nisu zadovoljili kriterije za konačno uvrštenje. Genotipizacija je bila uspješna za 292 bolesnika za *GSTT1* i *GSTM1*, za 289 bolesnika za *GSTA1* te za 288 bolesnika za *GSTP1* rs1695. U kontrolnoj skupini genotipizacija je bila uspješna za 92 ispitanika za sve analizirane lokuse, dok je u kontrolnoj bazi bilo ukupno 94 ispitanika. Broj bolesnika prikazan u tablicama s kliničkim i laboratorijskim obilježjima manji je od broja uspješno genotipiziranih bolesnika jer su u te analize uključeni samo ispitanici s istodobno dostupnim genotipskim i kliničkim, odnosno laboratorijskim podacima. Zbog toga su u kasnijim tablicama prikazane manje podskupine ispitanika, ovisno o analiziranom lokusu i dostupnosti pojedine varijable.

Tablica 7. Struktura uzorka i dostupnost genotipova

Skupina	N ukupno u bazi	<i>GSTT1</i> , n	<i>GSTM1</i> , n	<i>GSTA1</i> , n	<i>GSTP1</i> rs1695, n
IgAV	293	292	292	289	288
Kontrole	94	92	92	92	92

IgAV = IgA vaskulitis.

Broj bolesnika prikazan u tablicama s kliničkim i laboratorijskim obilježjima manji je od ukupnog broja uspješno genotipiziranih bolesnika jer su u analize povezanosti uključeni samo ispitanici s dostupnim genotipom i potpunim podacima za točno određenu analiziranu

varijablu. Za dio bolesnika postojala je medicinska dokumentacija, ali pojedini klinički ili laboratorijski podatci nisu bili dostupni u standardiziranom i usporedivom obliku za sve uključene centre i sve ispitanike. Stoga broj bolesnika varira među pojedinim tablicama, ovisno o dostupnosti konkretne varijable, dok tablica 7 prikazuje ukupan broj uspješno genotipiziranih uzoraka.

4.1. Raspodjela alela i genotipova analiziranih varijanti GST

U tablici 8 prikazana je raspodjela genotipova delecijских polimorfizama GSTT1 i GSTM1 između bolesnika s IgA vaskulitisom i kontrola. Nisu utvrđene statistički značajne razlike između skupina ni za GSTT1 ni za GSTM1.

Tablica 8. Raspodjela GSTM1 i GSTT1 genotipova u bolesnika s IgA vaskulitisom i kontrolama

Polimorfizam	Genotip	IgAV	Kontrole	p*
GSTT1	null	68/292 (23,3 %)	18/92 (19,6 %)	0,566
GSTT1	present	224/292 (76,7 %)	74/92 (80,4 %)	
GSTM1	null	154/292 (52,7 %)	49/92 (53,3 %)	1,000
GSTM1	present	138/292 (47,3 %)	43/92 (46,7 %)	

*p-vrijednosti dobivene su Fisherovim egzaktnim testom.

U tablici 9 prikazana je provjera Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini. Za SNP varijantu GSTA1 utvrđeno je odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, dok za GSTP1 rs1695 odstupanje nije utvrđeno. Za delecijske polimorfizme GSTM1 i GSTT1 Hardy-Weinbergova ravnoteža nije analizirana jer genotipizacijska metoda ne omogućuje razlikovanje heterozigotnog i homozigotnog present genotipa.

Za delecijske polimorfizme GSTM1 i GSTT1 Hardy-Weinbergova ravnoteža nije testirana jer korištena metoda razlikuje samo present i null genotip, bez razlučivanja heterozigotnog i homozigotnog present stanja.

Tablica 9. Hardy-Weinbergova ravnoteža u kontrolnoj skupini

Polimorfizam u kontrolama	Genotipske kategorije	Test	p*	Frekvencija alela 1	Frekvencija alela 2
GSTA1 C-69T	CC / CT / TT	$\chi^2 = 7,939$	0,0048	p(C) = 0,652	q(T) = 0,348
GSTP1 Ile105Val (rs1695)	Ile/Ile / Ile/Val / Val/Val	$\chi^2 = 2,934$	0,0867	p(Ile) = 0,696	q(Val) = 0,304
GSTM1	present / null	nije primjenjivo	nije primjenjivo	nije primjenjivo	nije primjenjivo
GSTT1	present / null	nije primjenjivo	nije primjenjivo	nije primjenjivo	nije primjenjivo

*p-vrijednost hi-kvadrat testa.

U tablici 10 prikazana je raspodjela genotipova *GSTA1* u skupini bolesnika i kontrola. U skupini IgAV genotip TT bio je prisutan u 14,5 %, a u kontrolama u 5,4 %. Najizraženija razlika zabilježena je za TT genotip.

Tablica 10. Frekvencija genotipova *GSTA1* u IgAV i kontrolama

GSTA1	IgAV	Kontrole	OR	95 % CI	p*
CC	106 (36,7 %)	33 (35,9 %)	1,00	referentno	—
CT	141 (48,8 %)	54 (58,7 %)	0,81	0,49-1,34	0,450
TT	42 (14,5 %)	5 (5,4 %)	2,62	0,96-7,15	0,061

IgAV = IgA vaskulitis

U tablici 11 prikazana je raspodjela genotipova *GSTP1* rs1695 u skupini bolesnika i kontrola. U skupini IgAV genotip Val/Val bio je prisutan u 7,3 %, a u kontrolama u 13,0 %.

Tablica 11. Frekvencija genotipova *GSTP1* rs1695 u IgAV i kontrolama

GSTP1 rs1695	IgAV	Kontrole	OR	95 % CI	p*
Ile/Ile	144 (50,0 %)	48 (52,2 %)	1,00	referentno	—
Ile/Val	123 (42,7 %)	32 (34,8 %)	1,28	0,77-2,13	0,371
Val/Val	21 (7,3 %)	12 (13,0 %)	0,58	0,27-1,27	0,202

IgAV = IgA vaskulitis, *p-vrijednost hi-kvadrat testa.

U tablici 12 prikazani su dominantni i recesivni modeli za SNP varijante *GSTA1* i *GSTP1* rs1695. Za *GSTA1* dominantni model nije pokazao razliku između skupina. Recesivni model pokazao je da je TT genotip povezan s većim izgledima za IgA vaskulitis u odnosu na nositelje barem jednog C alela. Za *GSTP1* rs1695 nije utvrđena statistički značajna razlika ni u dominantnom ni u recesivnom modelu.

Tablica 12. Modeli nasljeđivanja za SNP varijante (IgAV u odnosu na kontrole)

Model	<i>GSTA1</i> (CT + TT vs CC)	<i>GSTA1</i> (TT vs CC + CT)	<i>GSTP1</i> rs1695 (Ile/Val + Val/Val vs Ile/Ile)	<i>GSTP1</i> rs1695 (Val/Val vs Ile/Ile + Ile/Val)
IgAV: eksponirani	183	42	144	21
IgAV: referentni	106	247	144	267
Kontrole: eksponirani	59	5	44	12
Kontrole: referentni	33	87	48	80
OR	0,97	2,96	1,09	0,52
95 % CI	0,59-1,57	1,13-7,72	0,68-1,75	0,25-1,11
p*	1	0,018	0,721	0,093

IgAV = IgA vaskulitis.

U tablici 13 prikazana je raspodjela genotipova *GSTT1* u skupini bolesnika i kontrola. U skupini IgAV udio *GSTT1* null genotipa iznosio je 23,3 %, a u kontrolama 19,6 %. Nije utvrđena statistički značajna razlika između skupina.

Tablica 13. Frekvencija genotipova *GSTT1* u IgAV i kontrolama

<i>GSTT1</i>	IgAV	Kontrole	OR	95 % CI	p*
prisutan (+)	224 (76,7 %)	74 (80,4 %)	1,25	0,70-2,23	0,566
null (-)	68 (23,3 %)	18 (19,6 %)			

IgAV = IgA vaskulitis.

U tablici 14 prikazana je raspodjela genotipova *GSTM1* u skupini bolesnika i kontrola. U skupini IgAV udio *GSTM1* null genotipa iznosio je 52,7 %, a u kontrolama 53,3 %, što pokazuje

gotovo jednaku raspodjelu između skupina. Za *GSTM1* null genotip nije utvrđena razlika između bolesnika i kontrola.

Tablica 14. Frekvencija genotipova *GSTM1* u IgAV i kontrolama

<i>GSTM1</i>	IgAV	Kontrole	OR	95 % CI	p*
prisutan (+)	138 (47,3 %)	43 (46,7 %)	0,98	0,61-1,57	1,000
null (-)	154 (52,7 %)	49 (53,3 %)			

IgAV = IgA vaskulitis.

4.2. Kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika IgAV prema *GSTA1* genotipu

U tablici 15 prikazani su upalni, hematološki, koagulacijski i osnovni bubrežni pokazatelji prema *GSTA1* genotipu u bolesnika s IgAV. Među genotipovima *GSTA1* izdvajaju se eritrociti, hemoglobin i hematokrit. U TT skupini zabilježene su niže srednje vrijednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita nego u CC i CT skupini. Za ostale upalne, koagulacijske i bubrežne pokazatelje nije nađena statistički potvrđena razlika.

Tablica 15. IgAV: upalni, hematološki, koagulacijski i bubrežni pokazatelji prema *GSTA1* genotipu

Varijabla	CC (n = 47)	CT (n = 53)	TT (n = 21)	p
SE (mm/sat)	21,05 ± 15,67	21,59 ± 15,41	21,38 ± 18,30	0,987
CRP (mg/L)	13,45 ± 17,14	13,80 ± 17,07	19,41 ± 29,14	0,492
Leukociti (×10 ⁹ /L)	11,34 ± 3,57	10,20 ± 3,24	10,23 ± 2,89	0,196
Eritrociti (×10 ¹² /L)	4,75 ± 0,39	4,68 ± 0,40	4,47 ± 0,45	0,035
Hemoglobin (g/L)	125,67 ± 9,50	125,75 ± 10,47	119,38 ± 11,79	0,043
Hematokrit	0,37 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,35 ± 0,02	0,024
Trombociti (×10 ⁹ /L)	365,89 ± 90,45	346,68 ± 99,50	339,62 ± 68,13	0,447
24-satna proteinurija (g/dU)	0,28 ± 0,90	0,18 ± 0,33	0,29 ± 0,38	0,668
Omjer albumin/kreatinin u urinu	45,06 ± 150,20	15,35 ± 32,67	23,05 ± 45,93	0,391
eGFR (mL/min/1,73 m ²)	139,48 ± 29,62	126,64 ± 31,28	145,22 ± 23,40	0,180
Kreatinin (μmol/L)	36,59 ± 9,82	37,89 ± 13,50	34,29 ± 14,10	0,525
Ureja (mmol/L)	4,10 ± 0,96	4,38 ± 1,12	4,18 ± 1,38	0,453
Feritin (μg/L)	72,25 ± 44,91	69,04 ± 40,32	66,82 ± 49,70	0,904
Fibrinogen (g/L)	3,64 ± 1,01	3,67 ± 1,11	3,02 ± 0,83	0,052
D-dimeri (mg/L)	3,53 ± 4,38	4,45 ± 5,14	6,07 ± 10,98	0,323
PV	0,99 ± 0,15	1,02 ± 0,16	1,02 ± 0,14	0,595
APTV (s)	24,70 ± 2,67	24,89 ± 4,60	25,03 ± 7,96	0,964

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. SE = sedimentacija eritrocita; CRP = C-reaktivni protein; eGFR = procijenjena glomerularna filtracija; PV = protrombinsko vrijeme; APTV = aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme. p-vrijednosti dobivene su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA).

U tablici 16 prikazani su biokemijski i imunološki pokazatelji prema *GSTA1* genotipu u bolesnika s IgAV. U tablici 16 nisu zabilježene razlike među genotipovima *GSTA1* u biokemijskim i imunološkim pokazateljima. Najveća raspršenost vidljiva je kod kalprotektina i ukupnog IgE, no bez potvrđene razlike među skupinama.

Tablica 16. IgAV: biokemijski i imunološki pokazatelji prema *GSTA1* genotipu

Varijabla	CC (n = 47)	CT (n = 53)	TT (n = 21)	p
Kalprotektin	157,96 ± 342,27	217,93 ± 452,69	56,33 ± 41,30	0,527
Ukupni proteini (g/L)	68,06 ± 5,10	69,67 ± 7,14	67,47 ± 6,74	0,294
Albumin (g/L)	39,09 ± 4,46	39,66 ± 4,93	38,82 ± 4,75	0,735
A/G omjer	1,29 ± 0,22	1,22 ± 0,29	1,38 ± 0,20	0,225
IgA (g/L)	1,89 ± 0,78	1,79 ± 0,83	1,64 ± 0,73	0,469
IgG (g/L)	10,36 ± 2,87	10,89 ± 2,66	9,39 ± 2,54	0,105
IgM (g/L)	0,97 ± 0,39	1,13 ± 1,17	1,33 ± 1,85	0,470
Ukupni IgE	201,21 ± 683,48	126,62 ± 174,52	147,01 ± 151,55	0,811
AST-O	288,62 ± 290,99	355,86 ± 464,54	219,67 ± 235,93	0,429
CH50	95,04 ± 17,21	96,50 ± 28,00	87,62 ± 23,37	0,639
C3 (g/L)	1,34 ± 0,23	1,32 ± 0,22	1,29 ± 0,31	0,776
C4 (g/L)	0,26 ± 0,08	0,28 ± 0,10	0,23 ± 0,07	0,160

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. A/G = albumin/globulin omjer; AST-O = antistreptolizin O; CH50 = ukupna hemolitička aktivnost komplementa. p-vrijednosti dobivene su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA).

4.3. Kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika IgAV prema *GSTM1* genotipu

U tablici 17 prikazane su kliničke karakteristike prema *GSTM1* genotipu u bolesnika s IgAV. Češća gastrointestinalna zahvaćenost prisutna je u skupini *GSTM1* null (-) nego u skupini *GSTM1* present (+). U skupini *GSTM1* present (+) češće je zabilježen otok skrotuma. Za ostale kliničke pokazatelje nije potvrđena razlika među skupinama.

Tablica 17. IgAV: kliničke karakteristike prema *GSTM1* genotipu

Varijabla	Razina	<i>GSTM1</i> null (-) (n = 68)	<i>GSTM1</i> present (+) (n = 56)	p
Purpura proširena iznad donjih ekstremiteta	da	31 (45,6 %)	25 (44,6 %)	1,000
	ne	37 (54,4 %)	31 (55,4 %)	
Teške kožne promjene (nekroze, ulceracije)	da	3 (4,4 %)	3 (5,4 %)	1,000
	ne	65 (95,6 %)	53 (94,6 %)	
Artritis/artralgije	da	59 (86,8 %)	47 (83,9 %)	0,849
	ne	9 (13,2 %)	9 (16,1 %)	
IgAVN	da	24 (35,3 %)	13 (23,2 %)	0,206
	ne	44 (64,7 %)	43 (76,8 %)	
Spol	M	31 (45,6 %)	26 (46,4 %)	1,000
	Ž	37 (54,4 %)	30 (53,6 %)	
Dob pri dijagnozi (godine)		6,90 ± 3,32	6,29 ± 2,76	0,278
Prvi simptom	akutni skrotum	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)	0,290
	GI	12 (17,9 %)	5 (8,9 %)	
	osip	38 (56,7 %)	31 (55,4 %)	
	zglobovi	17 (25,4 %)	19 (33,9 %)	
Infekcija	da	43 (65,2 %)	42 (75,0 %)	0,326
	ne	23 (34,8 %)	14 (25,0 %)	
Generalizirani osip	da	32 (47,8 %)	25 (44,6 %)	0,870
	ne	35 (52,2 %)	31 (55,4 %)	
Gastrointestinalna zahvaćenost	da	35 (52,2 %)	16 (28,6 %)	0,014
	ne	32 (47,8 %)	40 (71,4 %)	
Zahvaćenost bubrega / nefritis	da	25 (37,3 %)	13 (23,2 %)	0,136
	ne	42 (62,7 %)	43 (76,8 %)	
Otok skrotuma	da	2 (6,7 %)	8 (30,8 %)	0,046
	ne	28 (93,3 %)	18 (69,2 %)	
Perforacija crijeva	da	0 (0,0 %)	1 (1,8 %)	0,928
	ne	67 (100,0 %)	55 (98,2 %)	

Kategorijske varijable prikazane su kao broj i udio. Dob je prikazana kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. IgAVN = IgA vaskulitisni nefritis; GI = gastrointestinalno. p-vrijednosti za kategorijske varijable dobivene su Fisherovim egzaktnim testom, a za dob t-testom za nezavisne uzorke.

U tablici 18 prikazane su terapijske karakteristike, relapsi i raspodjela kožnih promjena prema *GSTM1* genotipu u bolesnika s IgAV te nisu zabilježene razlike u terapiji, broju relapsa ni raspodjeli kožnih promjena prema *GSTM1* genotipu.

Tablica 18. IgAV: terapija, relapsi i raspodjela osipa prema *GSTM1* genotipu

Varijabla	Razina	<i>GSTM1</i> null (-) (n = 68)	<i>GSTM1</i> present (+) (n = 56)	p
NSAID	da	48 (72,7 %)	38 (67,9 %)	0,698
	ne	18 (27,3 %)	18 (32,1 %)	
Kortikosteroidi	da	33 (49,3 %)	21 (37,5 %)	0,260
	ne	34 (50,7 %)	35 (62,5 %)	
Imunosupresivi	da	7 (10,4 %)	2 (3,6 %)	0,267
	ne	60 (89,6 %)	54 (96,4 %)	
Broj relapsa	0	48 (71,6 %)	46 (82,1 %)	0,179
	1	12 (17,9 %)	8 (14,3 %)	
	2	2 (3,0 %)	2 (3,6 %)	
	3	5 (7,5 %)	0 (0,0 %)	
Noge	da	66 (98,5 %)	55 (98,2 %)	1,000
	ne	1 (1,5 %)	1 (1,8 %)	
Trup	da	18 (26,9 %)	17 (30,4 %)	0,821
	ne	49 (73,1 %)	39 (69,6 %)	
Ruke	da	31 (46,3 %)	21 (37,5 %)	0,425
	ne	36 (53,7 %)	35 (62,5 %)	
Lice	da	9 (13,4 %)	3 (5,4 %)	0,231
	ne	58 (86,6 %)	53 (94,6 %)	
Ulceracije	da	3 (4,5 %)	3 (5,4 %)	1,000
	ne	64 (95,5 %)	53 (94,6 %)	
Dugotrajni, recidivirajući osip	da	10 (14,9 %)	7 (12,5 %)	0,900
	ne	57 (85,1 %)	49 (87,5 %)	

Podaci su prikazani kao broj i udio. NSAID = nesteroidni protuupalni lijekovi. p-vrijednosti dobivene su Fisherovim egzaktnim testom.

U tablici 19 prikazani su laboratorijski pokazatelji prema *GSTM1* genotipu u bolesnika s IgAV. Više vrijednosti SE i fibrinogena te niže vrijednosti ureje zabilježene su u skupini *GSTM1* present (+). Većina ostalih laboratorijskih pokazatelja nije se razlikovala među skupinama.

Tablica 19. IgAV: laboratorijski pokazatelji prema *GSTM1* genotipu

Varijabla	<i>GSTM1</i> null (-) (n = 68)	<i>GSTM1</i> present (+) (n = 56)	p
SE (mm/sat)	18,42 ± 12,81	25,17 ± 19,22	0,024
CRP (mg/L)	13,57 ± 20,72	15,69 ± 18,28	0,561
Leukociti (×10 ⁹ /L)	10,50 ± 3,61	10,99 ± 3,06	0,423
Eritrociti (×10 ¹² /L)	4,66 ± 0,46	4,69 ± 0,33	0,626
Hemoglobin (g/L)	124,81 ± 11,64	124,71 ± 8,97	0,962
Hematokrit	0,36 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,994
Trombociti (×10 ⁹ /L)	360,72 ± 96,70	343,79 ± 83,50	0,306
24-satna proteinurija (g/dU)	0,31 ± 0,81	0,15 ± 0,22	0,158
Omjer albumin/kreatinin u urinu	30,57 ± 121,70	22,47 ± 45,76	0,677
eGFR (mL/min/1,73 m ²)	132,00 ± 26,48	137,56 ± 33,63	0,488
Kreatinin (μmol/L)	38,82 ± 14,20	34,61 ± 8,80	0,056
Ureja (mmol/L)	4,56 ± 1,18	3,94 ± 0,98	0,002
Feritin (μg/L)	69,03 ± 47,83	68,44 ± 35,20	0,948
Fibrinogen (g/L)	3,35 ± 0,89	3,76 ± 1,19	0,037
D-dimeri (mg/L)	4,44 ± 5,57	4,35 ± 7,11	0,941
PV	0,99 ± 0,17	1,02 ± 0,14	0,313
APTV (s)	24,88 ± 5,97	24,70 ± 2,51	0,843
Kalprotektin	167,78 ± 327,93	166,63 ± 429,00	0,990
Ukupni proteini (g/L)	68,45 ± 6,18	68,84 ± 6,48	0,731
Albumin (g/L)	39,55 ± 4,90	38,95 ± 4,39	0,481
A/G omjer	1,31 ± 0,19	1,26 ± 0,29	0,512
IgA (g/L)	1,84 ± 0,85	1,76 ± 0,72	0,559
IgG (g/L)	10,35 ± 2,56	10,56 ± 2,98	0,673
IgM (g/L)	1,02 ± 1,03	1,21 ± 1,19	0,325
Ukupni IgE	214,36 ± 568,37	86,46 ± 94,77	0,220
AST-O	330,55 ± 397,81	269,32 ± 334,74	0,441

CH50	97,91 ± 20,17	88,52 ± 25,25	0,115
C3 (g/L)	1,30 ± 0,22	1,34 ± 0,26	0,410
C4 (g/L)	0,25 ± 0,08	0,28 ± 0,10	0,124

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. SE = sedimentacija eritrocita; CRP = C-reaktivni protein; eGFR = procijenjena glomerularna filtracija; PV = protrombinsko vrijeme; APTV = aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; A/G = albumin/globulin omjer; AST-O = antistreptolizin O; CH50 = ukupna hemolitička aktivnost komplementa. p-vrijednosti dobivene su t-testom za nezavisne uzorke.

4.4. Kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika IgAV prema *GSTP1* rs1695 genotipu

U tablici 20 prikazane su kliničke karakteristike prema *GSTP1* rs1695 genotipu u bolesnika s IgAV te se izdvajaju otok skrotuma i perforacija crijeva, no oba nalaza treba tumačiti vrlo oprezno zbog vrlo malog broja bolesnika u pojedinim skupinama.

Tablica 20. IgAV: kliničke karakteristike prema *GSTP1* rs1695 genotipu

Varijabla	Razina	Ile/Ile (n = 58)	Ile/Val (n = 50)	Val/Val (n = 12)	p
Purpura proširena iznad donjih ekstremiteta	da	28 (48,3 %)	19 (38,0 %)	7 (58,3 %)	0,369
	ne	30 (51,7 %)	31 (62,0 %)	5 (41,7 %)	
Teške kožne promjene	da	2 (3,4 %)	3 (6,0 %)	0 (0,0 %)	0,801
	ne	56 (96,6 %)	47 (94,0 %)	12 (100,0 %)	
Artritis/artralgijske	da	49 (84,5 %)	44 (88,0 %)	9 (75,0 %)	0,524
	ne	9 (15,5 %)	6 (12,0 %)	3 (25,0 %)	
IgAVN	da	16 (27,6 %)	18 (36,0 %)	3 (25,0 %)	0,626
	ne	42 (72,4 %)	32 (64,0 %)	9 (75,0 %)	
Spol	M	30 (51,7 %)	21 (42,0 %)	5 (41,7 %)	0,555
	Ž	28 (48,3 %)	29 (58,0 %)	7 (58,3 %)	
Dob pri dijagnozi (godine)		7,36 ± 3,29	5,90 ± 2,82	5,85 ± 2,82	0,035

Prvi simptom	akutni skrotum	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (8,3 %)	0,462
	GI	7 (12,3 %)	8 (16,0 %)	2 (16,7 %)	
	osip	34 (59,6 %)	26 (52,0 %)	6 (50,0 %)	
	zglobovi	16 (28,1 %)	16 (32,0 %)	3 (25,0 %)	
Infekcija*	da	37 (64,9 %)	36 (73,5 %)	9 (75,0 %)	0,623
	ne	20 (35,1 %)	13 (26,5 %)	3 (25,0 %)	
Generalizirani osip	da	28 (49,1 %)	19 (38,0 %)	8 (66,7 %)	0,172
	ne	29 (50,9 %)	31 (62,0 %)	4 (33,3 %)	
Gastrointestinalna zahvaćenost	da	22 (38,6 %)	20 (40,0 %)	7 (58,3 %)	0,504
	ne	35 (61,4 %)	30 (60,0 %)	5 (41,7 %)	
Zahvaćenost bubrega / nefritis	da	17 (29,8 %)	17 (34,0 %)	4 (33,3 %)	0,883
	ne	40 (70,2 %)	33 (66,0 %)	8 (66,7 %)	
Otok skrotuma**	da	5 (17,2 %)	2 (9,5 %)	3 (60,0 %)	0,058
	ne	24 (82,8 %)	19 (90,5 %)	2 (40,0 %)	
Perforacija crijeva	da	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (8,3 %)	0,102
	ne	57 (100,0 %)	50 (100,0 %)	11 (91,7 %)	

** varijabla otok skrotuma analizirana je samo u muškoj podskupini ispitanika, zbog čega je broj bolesnika u toj analizi manji od ukupnog broja ispitanika u pojedinoj genotipskoj skupini.

Kategorijske varijable prikazane su kao broj i udio. Dob je prikazana kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija. IgAVN = IgA vaskulitisni nefritis; GI = gastrointestinalno. p-vrijednosti za kategorijske varijable dobivene su Fisher-Freeman-Haltonovim egzaktnim testom. Dob i p-vrijednost (približno $p = 0,035$) preračunane su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA) iz zaokruženih grupnih sažetaka.

U tablici 21 prikazani su laboratorijski pokazatelji u bolesnika s IgA vaskulitisom prema genotipu *GSTP1* rs1695. Uspoređene su vrijednosti upalnih, hematoloških, bubrežnih, koagulacijskih i biokemijskih pokazatelja između bolesnika s Ile/Ile, Ile/Val i Val/Val genotipom. Statistička razlika utvrđena je za eGFR i D-dimere. Vrijednosti eGFR-a bile su najniže u bolesnika s Val/Val genotipom, dok su vrijednosti D-dimera bile više u skupinama s Ile/Val i Val/Val genotipom u odnosu na Ile/Ile genotip. Za ostale analizirane laboratorijske pokazatelje nije utvrđena razlika među genotipskim skupinama. Navedene nalaze potrebno je tumačiti oprezno zbog manjeg broja bolesnika s Val/Val genotipom.

Tablica 21. IgAV: laboratorijski pokazatelji prema *GSTP1* rs1695 genotipu

Varijabla	Ile/Ile (n = 58)	Ile/Val (n = 50)	Val/Val (n = 12)	p
SE (mm/sat)	22,66 ± 16,99	19,56 ± 16,00	23,17 ± 10,79	0,563
CRP (mg/L)	15,72 ± 24,00	11,02 ± 11,92	24,20 ± 18,99	0,092
Leukociti ($\times 10^9/L$)	10,44 ± 3,61	10,52 ± 3,05	11,81 ± 3,15	0,423
Eritrociti ($\times 10^{12}/L$)	4,67 ± 0,44	4,66 ± 0,40	4,76 ± 0,34	0,741
Hemoglobin (g/L)	125,02 ± 11,63	123,92 ± 9,39	125,83 ± 10,80	0,799
Hematokrit	0,36 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,37 ± 0,03	0,507
Trombociti ($\times 10^9/L$)	351,26 ± 98,18	348,06 ± 88,60	377,25 ± 70,90	0,609
24-satna proteinurija (g/dU)	0,27 ± 0,80	0,25 ± 0,46	0,10 ± 0,09	0,696
Omjer albumin/kreatinin u urinu	39,82 ± 138,76	19,31 ± 37,24	15,06 ± 26,76	0,504
eGFR (mL/min/1,73 m ²)	140,96 ± 32,38	131,38 ± 27,47	114,50 ± 19,43	0,013
Kreatinin ($\mu\text{mol}/L$)	38,56 ± 13,84	34,68 ± 10,65	36,42 ± 10,76	0,267
Ureja (mmol/L)	4,36 ± 1,18	4,16 ± 1,08	4,07 ± 0,93	0,547
Feritin ($\mu\text{g}/L$)	72,59 ± 39,56	67,22 ± 49,24	72,53 ± 31,61	0,800
Fibrinogen (g/L)	3,44 ± 1,09	3,52 ± 0,98	4,14 ± 1,02	0,107
D-dimeri (mg/L)	2,75 ± 2,73	6,02 ± 8,42	5,61 ± 6,89	0,020
PV	1,00 ± 0,16	1,01 ± 0,14	1,04 ± 0,19	0,719
APTV (s)	24,80 ± 2,85	24,50 ± 6,44	26,35 ± 3,64	0,483

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. SE = sedimentacija eritrocita; CRP = C-reaktivni protein; eGFR = procijenjena glomerularna filtracija; PV =

protrombinsko vrijeme; APTV = aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme. p-vrijednosti dobivene su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA).

U tablici 22 prikazani su biokemijski i imunološki pokazatelji prema *GSTP1* rs1695 genotipu u bolesnika s IgAV.

Tablica 22. IgAV: biokemijski i imunološki pokazatelji prema *GSTP1* rs1695 genotipu

Varijabla	Ile/Ile (n = 58)	Ile/Val (n = 50)	Val/Val (n = 12)	p
Kalprotektin	182,04 ± 350,86	189,90 ± 440,90	44,80 ± 26,36	0,468
Ukupni proteini (g/L)	69,24 ± 5,46	68,12 ± 6,63	68,09 ± 9,33	0,629
Albumin (g/L)	39,10 ± 4,13	39,42 ± 5,22	39,77 ± 5,43	0,881
A/G omjer	1,26 ± 0,26	—	1,38 ± 0,34	—
IgA (g/L)	1,94 ± 0,78	1,73 ± 0,81	1,54 ± 0,70	0,180
IgG (g/L)	10,41 ± 2,74	10,39 ± 2,74	10,09 ± 2,53	0,931
IgM (g/L)	1,13 ± 1,12	1,09 ± 1,25	1,06 ± 0,45	0,970
Ukupni IgE	126,67 ± 136,56	190,00 ± 519,92	32,54 ± 27,29	0,332
AST-O	337,96 ± 391,88	307,58 ± 366,64	154,50 ± 212,34	0,294
CH50	88,96 ± 24,35	98,53 ± 18,84	106,50 ± 28,79	0,018
C3 (g/L)	1,30 ± 0,26	1,34 ± 0,21	1,32 ± 0,30	0,722
C4 (g/L)	0,26 ± 0,10	0,26 ± 0,08	0,26 ± 0,12	0,993

Podaci su prikazani kao aritmetička sredina ± standardna devijacija. Znak — označuje da p-vrijednost nije izračunana zbog nedostatnih podataka u pojedinoj skupini. A/G = albumin/globulin omjer; AST-O = antistreptolizin O; CH50 = ukupna hemolitička aktivnost komplemента. p-vrijednosti dobivene su jednosmjernom analizom varijance (ANOVA).

4.5. Kliničke i laboratorijske karakteristike bolesnika IgAV prema *GSTT1* genotipu

U tablici 23 prikazane su kliničke karakteristike prema *GSTT1* genotipu u bolesnika s IgAV te nije uočena razlika među skupinama *GSTT1* null (-) i *GSTT1* present (+) ni za jednu kliničku varijablu.

Tablica 23. IgAV: kliničke karakteristike prema *GSTT1* genotipu

Varijabla	Razina	<i>GSTT1</i> null (-) (n = 34)	<i>GSTT1</i> present (+) (n = 90)	p
Purpura proširena iznad donjih ekstremiteta	da	12 (35,3 %)	44 (48,9 %)	0,248
	ne	22 (64,7 %)	46 (51,1 %)	
Teške kožne promjene	da	2 (5,9 %)	4 (4,4 %)	1,000
	ne	32 (94,1 %)	86 (95,6 %)	
Artritis/artralgijske	da	31 (91,2 %)	75 (83,3 %)	0,412
	ne	3 (8,8 %)	15 (16,7 %)	
IgAVN	da	10 (29,4 %)	27 (30,0 %)	1,000
	ne	24 (70,6 %)	63 (70,0 %)	
Spol	M	13 (38,2 %)	44 (48,9 %)	0,390
	Ž	21 (61,8 %)	46 (51,1 %)	
Dob pri dijagnozi (godine)		6,52 ± 2,87	6,66 ± 3,17	0,816
Prvi simptom	akutni skrotum	0 (0,0 %)	1 (1,1 %)	0,713
	GI	3 (9,1 %)	14 (15,6 %)	
	osip	19 (57,6 %)	50 (55,6 %)	
	zglobovi	11 (33,3 %)	25 (27,8 %)	
Infekcija	da	25 (75,8 %)	60 (67,4 %)	0,504
	ne	8 (24,2 %)	29 (32,6 %)	
Generalizirani osip	da	12 (36,4 %)	45 (50,0 %)	0,254
	ne	21 (63,6 %)	45 (50,0 %)	
Gastrointestinalna zahvaćenost	da	11 (33,3 %)	40 (44,4 %)	0,367
	ne	22 (66,7 %)	50 (55,6 %)	
Zahvaćenost bubrega / nefritis	da	10 (30,3 %)	28 (31,1 %)	1,000
	ne	23 (69,7 %)	62 (68,9 %)	
Otok skrotuma	da	2 (16,7 %)	8 (18,2 %)	1,000
	ne	10 (83,3 %)	36 (81,8 %)	
Perforacija crijeva	da	0 (0,0 %)	1 (1,1 %)	1,000
	ne	33 (100,0 %)	89 (98,9 %)	
NSAID	da	22 (66,7 %)	64 (71,9 %)	0,733
	ne	11 (33,3 %)	25 (28,1 %)	
Kortikosteroidi	da	12 (36,4 %)	42 (46,7 %)	0,415

	ne	21 (63,6 %)	48 (53,3 %)	
Imunosupresivi	da	2 (6,1 %)	7 (7,8 %)	1,000
	ne	31 (93,9 %)	83 (92,2 %)	
Broj relapsa	0	26 (78,8 %)	68 (75,6 %)	0,577
	1	5 (15,2 %)	15 (16,7 %)	
	2	0 (0,0 %)	4 (4,4 %)	
	3	2 (6,1 %)	3 (3,3 %)	
Noge	da	32 (97,0 %)	89 (98,9 %)	1,000
	ne	1 (3,0 %)	1 (1,1 %)	
Trup	da	9 (27,3 %)	26 (28,9 %)	1,000
	ne	24 (72,7 %)	64 (71,1 %)	
Ruke	da	12 (36,4 %)	40 (44,4 %)	0,550
	ne	21 (63,6 %)	50 (55,6 %)	
Lice	da	2 (6,1 %)	10 (11,1 %)	0,622
	ne	31 (93,9 %)	80 (88,9 %)	
Ulceracije	da	2 (6,1 %)	4 (4,4 %)	1,000
	ne	31 (93,9 %)	86 (95,6 %)	
Dugotrajni, recidivirajući osip	da	4 (12,1 %)	13 (14,4 %)	0,971
	ne	29 (87,9 %)	77 (85,6 %)	

Kategorijske varijable prikazane su kao broj i udio. Dob je prikazana kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija. IgAVN = IgA vaskulitisni nefritis; GI = gastrointestinalno; NSAID = nesteroidni protuupalni lijekovi. p-vrijednosti za kategorijske varijable dobivene su Fisherovim egzaktnim testom, a za dob t-testom za nezavisne uzorke.

U tablici 24 prikazani su laboratorijski pokazatelji prema *GSTT1* genotipu u bolesnika s IgAV te je zapažena značajna razlika samo za PV, koji je bio viši u skupini *GSTT1* present (+). U svim ostalim laboratorijskim pokazateljima nije nađena razlika među skupinama.

Tablica 24. IgAV: laboratorijski pokazatelji prema *GSTT1* genotipu

Varijabla	<i>GSTT1</i> null (-) (n = 34)	<i>GSTT1</i> present (+) (n = 90)	p
SE (mm/sat)	21,78 ± 14,78	21,37 ± 16,93	0,903
CRP (mg/L)	12,47 ± 14,15	15,34 ± 21,20	0,487
Leukociti (×10 ⁹ /L)	10,43 ± 3,35	10,84 ± 3,39	0,553
Eritrociti (×10 ¹² /L)	4,75 ± 0,45	4,65 ± 0,39	0,218
Hemoglobin (g/L)	125,36 ± 10,13	124,54 ± 10,64	0,702
Hematokrit	0,37 ± 0,03	0,36 ± 0,03	0,740
Trombociti (×10 ⁹ /L)	336,82 ± 80,56	358,94 ± 94,20	0,233
24-satna proteinurija (g/dU)	0,22 ± 0,37	0,25 ± 0,69	0,805
Omjer albumin/kreatinin u urinu	13,89 ± 21,67	30,94 ± 107,68	0,454
eGFR (mL/min/1,73 m ²)	133,45 ± 34,93	134,67 ± 28,71	0,904
Kreatinin (μmol/L)	37,06 ± 12,29	36,84 ± 12,22	0,931
Ureja (mmol/L)	4,06 ± 1,04	4,36 ± 1,16	0,190
Feritin (μg/L)	59,33 ± 28,51	72,23 ± 47,07	0,193
Fibrinogen (g/L)	3,51 ± 0,99	3,54 ± 1,07	0,879
D-dimeri (mg/L)	4,49 ± 5,21	4,36 ± 6,67	0,926
PV	0,92 ± 0,18	1,04 ± 0,13	<0,001
APTV (s)	25,76 ± 6,40	24,45 ± 3,96	0,190
Kalprotektin	116,31 ± 195,36	180,54 ± 405,28	0,583
Ukupni proteini (g/L)	69,55 ± 4,79	68,29 ± 6,76	0,325
Albumin (g/L)	39,50 ± 4,03	39,19 ± 4,89	0,744
A/G omjer	1,25 ± 0,20	1,30 ± 0,28	0,495
IgA (g/L)	1,84 ± 0,87	1,79 ± 0,76	0,754
IgG (g/L)	10,68 ± 2,14	10,36 ± 2,94	0,567
IgM (g/L)	1,36 ± 1,41	1,01 ± 0,96	0,126
Ukupni IgE	93,34 ± 147,61	178,13 ± 487,36	0,496
AST-O	283,92 ± 278,83	305,15 ± 396,52	0,811
CH50	91,77 ± 22,23	94,62 ± 23,04	0,693
C3 (g/L)	1,26 ± 0,22	1,33 ± 0,24	0,256
C4 (g/L)	0,26 ± 0,06	0,26 ± 0,10	0,931

Legenda: Podaci su prikazani kao aritmetička sredina $\pm$ standardna devijacija. SE = sedimentacija eritrocita; CRP = C-reaktivni protein; eGFR = procijenjena glomerularna filtracija; PV = protrombinsko vrijeme; APTV = aktivirano parcijalno tromboplastinsko vrijeme; A/G = albumin/globulin omjer; AST-O = antistreptolizin O; CH50 = ukupna hemolitička aktivnost komplementa. p-vrijednosti dobivene su t-testom za nezavisne uzorke.

5. RASPRAVA

U provedenom istraživanju analizirana je povezanost polimorfizama gena za glutation S-transferaze s pojavom IgA vaskulitisa i s kliničkim te laboratorijskim obilježjima bolesti u djece iz Republike Hrvatske. Dobiveni rezultati pokazuju da analizirane varijante GST gena nisu imale jednaku povezanost s ukupnim rizikom za bolest i s njezinim kliničkim izražajem. Dok za većinu analiziranih lokusa nije utvrđena jasna povezanost s pojavom bolesti na razini usporedbe bolesnika i kontrola, unutar skupine bolesnika uočene su pojedine povezanosti s organskim manifestacijama i s dijelom laboratorijskih pokazatelja. Takav obrazac upućuje na to da GST varijabilnost u IgA vaskulitisu vjerojatnije sudjeluje u oblikovanju fenotipa bolesti nego u samom nastanku bolesti [2, 18–19, 59–60].

5.1. Povezanost GSTA1 s pojavom bolesti i kliničkim fenotipom IgA vaskulitisa

Raspodjela alela i genotipova GSTA1 između bolesnika s IgA vaskulitisom i kontrola nije pokazala jednoznačnu i stabilnu razliku u svim analizama. Ipak, u genotipskoj raspodjeli zabilježen je signal za TT genotip, koji je bio češći među bolesnicima nego među kontrolama. Takav nalaz može upućivati na moguću povezanost GSTA1 s osjetljivošću za bolest, ali ga treba tumačiti s oprezom jer je u kontrolnoj skupini utvrđeno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže. Zbog toga se ovaj rezultat ne može promatrati kao čvrst dokaz, nego prije kao nalaz koji zahtijeva dodatnu provjeru na drugom uzorku i uz strožu metodološku kontrolu. Takvo tumačenje u skladu je s općim načelima interpretacije genetsko-asocijacijskih studija u IgA vaskulitisu, gdje odstupanje od očekivane genotipske raspodjele može umanjiti uvjerljivost nalaza, osobito u manjim kontrolnim skupinama [19, 59]. Kada su analizirana klinička obilježja bolesti unutar skupine bolesnika, za GSTA1 nisu uočene jasne i dosljedne razlike u glavnim organskim manifestacijama bolesti. Nije utvrđena stabilna povezanost s gastrointestinalnim zahvaćanjem, nefritisom ni recidivima. Time se pokazuje da eventualni učinak ove varijante, ako postoji, nije dovoljno snažan da bi se jasno očitovao kroz najvažnije kliničke ishode bolesti u ovoj kohorti. Takav obrazac nije neočekivan jer se i u drugim imunološki posredovanim bolestima GSTA1 češće povezuje s modulacijom biološkog odgovora, ekspresijom enzima ili odgovorom na terapiju nego s jednostavnom prisutnošću ili odsutnošću bolesti [16, 58, 61–62]. Laboratorijski nalazi prema GSTA1 genotipu bili su donekle zanimljivi, ali bez jasnog i jedinstvenog obrasca. U skupini nositelja TT genotipa zabilježene su niže prosječne vrijednosti eritrocita, hemoglobina i hematokrita u odnosu na

druge genotipske skupine. Takav nalaz nije lako izravno povezati s biološkom funkcijom GSTA1, ali može upućivati na razlike u opterećenju bolesti, u dobi i spolu ispitanika ili na utjecaj drugih kliničkih čimbenika koji nisu bili jednako raspoređeni među podskupinama. Budući da u istim analizama nisu utvrđene stabilne razlike u klasičnim upalnim i koagulacijskim pokazateljima, poput CRP-a, fibrinogena, D-dimera, protrombinskog vremena ili APTV-a, teško je govoriti o jasno izdvojenom laboratorijskom profilu povezanom s GSTA1. Zato rezultate za ovaj lokus treba tumačiti oprezno i bez preširokih zaključaka. U funkcionalnom smislu, GSTA1 varijante mogu djelovati preko promjene ekspresije enzima i time mijenjati kapacitet detoksikacije reaktivnih metabolita, ali takav učinak ne mora nužno dovesti do jasno prepoznatljivog kliničkog fenotipa u svakoj kohorti [7, 16, 58]. Važan detalj jest i razlika u spolnoj raspodjeli među genotipskim skupinama GSTA1. Ako je određeni genotip neravnomjerno raspoređen po spolu, dio razlika u drugim varijablama može barem djelomice biti posredovan spolom, a ne samim genotipom. To je osobito važno u bolesti u kojoj postoji blaga predominacija muškog spola, a dio kliničkih manifestacija vezan je uz spolno specifične organe. Zbog toga bi u budućim analizama GSTA1 bilo korisno uključiti dob i spol kao kovarijate [1–2, 18].

5.2. Povezanost GSTM1 s pojavom bolesti i kliničkim fenotipom IgA vaskulitisa

U usporedbi bolesnika i kontrola za GSTM1 nije utvrđena statistički značajna razlika u raspodjeli genotipova. To znači da GSTM1-null genotip u ovoj kohorti nije bio povezan s time hoće li dijete razviti IgA vaskulitis. Time se GSTM1 ne izdvaja kao lokus koji bi nosio snažniji učinak na samu pojavnost bolesti. Taj je nalaz u skladu s recentnim radom iste istraživačke skupine, u kojem GSTM1 nije pokazao jasnu povezanost s ukupnom osjetljivošću za IgA vaskulitis, ali su uočeni signali na razini pojedinih fenotipskih obilježja bolesti [19].

S druge strane, unutar skupine bolesnika GSTM1 je pokazao povezanost s pojedinim kliničkim manifestacijama. Najizraženiji nalaz odnosio se na gastrointestinalno zahvaćanje, koje je bilo češće među nositeljima GSTM1-null genotipa nego među nositeljima GSTM1-present genotipa. Taj je rezultat fenotipski uvjerljiv jer gastrointestinalne manifestacije u IgA vaskulitisu predstavljaju važan dio akutne kliničke slike i mogu biti povezane s težim tijekom bolesti. U patofiziološkom smislu takva povezanost ima smisla. Crijevna sluznica i pripadna mikrovaskulatura tijekom sistemske upale izložene su pojačanom oksidacijskom i imunološkom opterećenju. Ako je detoksikacijski kapacitet smanjen zbog izostanka aktivnosti

GSTM1, može doći do veće osjetljivosti endotela i lakšeg održavanja upalnog procesa u crijevnom sustavu. Takvo tumačenje podupiru suvremeni prikazi patogeneze IgA vaskulitisa, koji naglašavaju važnost mukoznog imuniteta, endotelne aktivacije, oksidacijskog stresa i mikrovaskularnog oštećenja u razvoju gastrointestinalnih manifestacija bolesti [2, 18, 34, 45]. Općenito, GSTM1-null genotip u drugim je stanjima povezan sa smanjenim kapacitetom konjugacije i većom osjetljivošću na oksidacijsko oštećenje, što dodatno čini ovaj nalaz biološki uvjerljivim [6–7, 63].

Uz gastrointestinalne manifestacije, urogenitalna obilježja dala su dodatnu dimenziju tumačenja. Skrotalni otok bio je češći među nositeljima GSTM1-present genotipa nego među nositeljima GSTM1-null genotipa. Taj nalaz pokazuje da učinak GSTM1 nije jednostavan i linearan. Isti lokus može biti povezan s različitim fenotipskim izražajima bolesti u različitim smjerovima, ovisno o tkivu i lokalnim mehanizmima upale. Zbog toga GSTM1 nije opravdano tumačiti kao lokus koji jednostavno povećava ili smanjuje ukupnu aktivnost bolesti, nego kao čimbenik koji može mijenjati sklonost prema pojedinim manifestacijama. Slično se i u drugim bolestima povezanim s upalom i oksidacijskim opterećenjem GST varijante češće promatraju kao modulatori fenotipa, prognoze ili odgovora na terapiju nego kao jedini ili glavni uzrok bolesti [7, 64–67]. Laboratorijski nalazi prema GSTM1 genotipu pokazali su nekoliko razlika, ali ni ovdje nije utvrđen jedinstven obrazac koji bi se mogao jednostavno svesti na „jaču“ ili „slabiju“ upalu. U skupini nositelja GSTM1-present genotipa sedimentacija eritrocita bila je viša, ureja niža, a fibrinogen viši nego u skupini nositelja GSTM1-null genotipa. Takvi nalazi upućuju na to da GSTM1 može biti povezan s heterogenošću sustavnog odgovora, ali bez jednostavne i dosljedne laboratorijske slike. Na laboratorijske pokazatelje pritom mogu utjecati i vrijeme uzorkovanja, terapija, faza bolesti i interkurentna stanja. Zato laboratorijske razlike za GSTM1 treba promatrati kao pomoćni dio fenotipskog obrasca, a ne kao samostalni dokaz biološkog učinka. Važno je istaknuti da je u djece s IgA vaskulitisom već ranije opisana povezanost oksidacijskog stresa s aktivnošću bolesti i bubrežnim oštećenjem, ali bez jasne i jednostavne veze između pojedinog biomarkera i pojedinog kliničkog ishoda [9–10, 17]. Od svih analiziranih GST lokusa upravo je GSTM1 dao najuvjerljiviji klinički signal, i to kroz povezanost s gastrointestinalnim zahvaćanjem. Taj nalaz opravdava daljnja istraživanja usmjerena na organski fenotip bolesti, umjesto isključivo na usporedbu bolesnika i kontrola [19, 34].

5.3. Povezanost GSTP1 s pojavom bolesti i kliničkim fenotipom IgA vaskulitisa

U početnim analizama raspodjela alela i genotipova GSTP1 rs1695 između bolesnika i kontrola nije pokazala jasnu povezanost s ukupnim rizikom za bolest. Nakon tehničkog usklađivanja heterozigotnih skupina i konačnog objedinjavanja zapisa heterozigota, taj nalaz treba prikazati prema završnoj, očišćenoj bazi podataka. Neovisno o toj korekciji, dosadašnji rezultati ne upućuju na snažnu povezanost GSTP1 rs1695 s pojavom IgA vaskulitisa na razini osnovne usporedbe bolesnika i kontrola. Takav rezultat u skladu je s recentno objavljenim podacima iz iste istraživačke skupine, prema kojima GSTP1 nije bio povezan s ukupnom osjetljivošću za bolest, nego prije s pojedinim fenotipskim obilježjima tijekom kliničkog tijeka [19].

Unutar skupine bolesnika GSTP1 se izdvojio prije svega kroz povezanost s urogenitalnim manifestacijama, osobito sa skrotalnim otokom. Taj nalaz je klinički zanimljiv, ali ga treba tumačiti oprezno. Urogenitalne manifestacije ne pojavljuju se u velikom broju bolesnika, pa su apsolutni brojevi unutar pojedinih genotipskih skupina mali. U takvim okolnostima i mala promjena broja događaja može utjecati na p-vrijednost i na ukupni dojam stabilnosti nalaza. Zato se povezanost GSTP1 s ovim fenotipom ne može smatrati konačno potvrđenom, ali se može opisati kao signal koji zaslužuje provjeru na većem uzorku. Biološka je uvjerljivost takve povezanosti ipak moguća jer GSTP1, osim u detoksikaciji, sudjeluje i u regulaciji signalnih putova povezanih sa staničnim stresom i upalom, pa bi promjena njegove aktivnosti mogla utjecati na lokalni intenzitet vaskularne upale u pojedinim organskim sustavima [6–8].

Laboratorijski nalazi prema GSTP1 genotipu pokazali su nekoliko izdvojenih razlika. Među njima su najviše pozornosti privukli D-dimeri, a nakon korekcije tablica i objedinjavanja heterozigotnih zapisa u konačnoj analizi treba navesti samo one razlike koje ostanu stabilne. D-dimer je zanimljiv pokazatelj jer povezuje upalu, aktivaciju koagulacije i oštećenje mikrovaskulature, što je patofiziološki blisko promjenama koje se javljaju u aktivnoj fazi IgA vaskulitisa. Ako GSTP1 rs1695 mijenja enzimsku učinkovitost u obradi oksidacijskih produkata, moguće je da se to posredno odražava i na intenzitet endotelne aktivacije i koagulacijskog odgovora. Takvo tumačenje uklapa se u današnje razumijevanje bolesti, prema kojem su vaskularna upala, aktivacija komplementa i endotelna disfunkcija usko povezane s kliničkom slikom bolesti [18, 30, 45, 68]. U drugim autoimunim bolestima GSTP1 polimorfizam pokazao je kliničku važnost ponajprije u kontekstu odgovora na ciklofosamid i modifikacije ishoda bolesti, a manje kao univerzalni lokus osjetljivosti, što dodatno podupire oprezno tumačenje dobivenih nalaza [64, 69–71]. Unatoč tome, nalaze za GSTP1 treba tumačiti suzdržano jer su neke genotipske skupine malobrojne, a dio laboratorijskih varijabli podložan

velikoj raspršenosti vrijednosti. To vrijedi i za imunološke pokazatelje, napose za ukupni IgE. Ukupni IgE u dječjoj dobi pokazuje veliku biološku varijabilnost i osjetljiv je na atopiju, alergije, infekcije i druge čimbenike koji nisu nužno vezani uz samu bolest. Uz to, raspodjela takvih podataka često nije normalna, pa aritmetička sredina može biti pod jakim utjecajem ekstremnih vrijednosti. Zbog toga taj nalaz nije prikladno isticati kao čvrst dokaz promijenjenog imunološkog profila povezanog s GSTP1, nego prije kao metodološki osjetljiv rezultat [2, 72]. Za GSTP1 je zato najsigurnije zaključiti da se ovaj lokus u ovoj kohorti nije jasno povezao s ukupnom pojavnosću bolesti, dok su unutar skupine bolesnika uočeni pojedini fenotipski i laboratorijski signali koji trebaju biti potvrđeni nakon konačne korekcije baze i na većem uzorku [19].

5.4. Povezanost GSTT1 s pojavom bolesti i kliničkim fenotipom IgA vaskulitisa

Ni za GSTT1 nije utvrđena statistički značajna razlika između bolesnika i kontrola u osnovnoj raspodjeli genotipova. Time se GSTT1, kao ni GSTM1, ne izdvaja kao lokus povezan s ukupnim rizikom za razvoj bolesti u analiziranoj populaciji. Taj nalaz uklapa se u rezultate vaše osnovne genetske analize i u širi okvir spoznaja prema kojima pojedini GST lokusi nemaju nužno jednak učinak na osjetljivost za bolest i na njezin klinički tijek [7, 19].

Kod analize kliničkih obilježja unutar skupine bolesnika za GSTT1 nisu zabilježene jasne i stabilne povezanosti s glavnim organskim manifestacijama bolesti. Nije utvrđen dosljedan obrazac koji bi upućivao na povezanost s gastrointestinalnim zahvaćanjem, nefritisom ili recidivima. Time rezultati za GSTT1 ostaju slabije izraženi nego za GSTM1. Slično tomu, i u drugim bolestima povezanim s oksidacijskim stresom GSTT1 ponekad pokazuje učinak tek u kombinaciji s drugim GST varijantama ili u specifičnim podskupinama bolesnika, a ne kao samostalan i snažan prediktor fenotipa [63, 65].

Među laboratorijskim pokazateljima kod GSTT1 se izdvojilo protrombinsko vrijeme, odnosno PV/INR. Budući da je riječ o izoliranom nalazu, i njega treba tumačiti oprezno. Protrombinsko vrijeme može biti osjetljivo na niz preanalitičkih i kliničkih čimbenika, uključujući vrijeme uzorkovanja, terapiju i interkurentna stanja. Kada se za neki lokus ne vidi stabilniji signal ni na razini pojavnosti bolesti ni na razini većine kliničkih fenotipova, a izdvoji se samo jedan laboratorijski parametar, razumnije ga je opisati kao mogući trag za daljnju provjeru nego kao pouzdano potvrđen biološki obrazac. Za GSTT1 se stoga može zaključiti da u ovoj kohorti nije

pokazao jasnu povezanost ni s pojavom bolesti ni s glavnim fenotipskim obilježjima IgA vaskulitisa, dok pojedini laboratorijski nalazi ostaju otvoreni za dodatnu provjeru [19, 30].

5.5. Povezanost GST varijanti s nefritisom i recidivima

Bez obzira na analizirani GST lokus, u ovom istraživanju nisu zabilježene jasne i stabilne razlike u učestalosti nefritisa među genotipskim skupinama. Taj je nalaz važan jer pokazuje granice učinka GST varijanti u ovoj kohorti. Premda oksidacijski stres sudjeluje u upalnim procesima, bubrežno zahvaćanje u IgA vaskulitisu očito je određeno složenijim međudjelovanjem imunoloških, upalnih i genetskih mehanizama. U tom okviru GST geni mogu imati modulacijski doprinos, ali ne djeluju kao glavni nositelji rizika za razvoj nefritisa. Takvo je tumačenje u skladu sa suvremenim modelima patogeneze IgA vaskulitisanog nefritisa, u kojima se naglašava važnost galaktozno-deficitarnog IgA1, imunokompleksa, komplementa, glomerularne upale i brojnih drugih imunoloških čimbenika [30, 53, 73–77]. Dodatno, recentni rad o eritrocitnoj GST aktivnosti u djece s IgA vaskulitisom pokazao je da je GST sustav relevantan u kontekstu bubrežnog oštećenja, ali na funkcionalnoj razini aktivnosti enzima, a ne nužno na razini pojedinog genotipa [17]. Suvremena istraživanja pritom sve više ispituju urinarne i druge biomarkere radi procjene bubrežnog zahvaćanja i predviđanja bubrežnih ishoda [78–80].

Slično vrijedi i za recidive bolesti. U tablicama prema svim analiziranim GST lokusima broj recidiva nije pokazao stabilne razlike među genotipskim skupinama. To upućuje na to da GST polimorfizmi u ovom uzorku nisu bili jaki prediktori ponovne aktivnosti bolesti. Takav ishod treba promatrati i u svjetlu načina prikupljanja podataka, jer je recidiv analiziran kategorijski, bez detaljne vremenske dimenzije i bez dublje stratifikacije prema tijeku bolesti. Zbog toga se može zaključiti da u ovom istraživanju nije utvrđena povezanost GST varijanti s recidivima, ali i da samo istraživanje nije bilo usmjereno na detaljnu procjenu vremenske dinamike njihove pojave. U literaturi je i sam recidiv IgA vaskulitisa heterogen ishod, pod utjecajem kliničkih i imunoloških čimbenika koji nisu nužno svedivi na pojedini genetski lokus [3, 81].

5.6. Metodološka ograničenja i značenje dobivenih nalaza

Pri tumačenju rezultata treba uzeti u obzir nekoliko metodoloških ograničenja. Prvo, broj bolesnika prikazan u tablicama s kliničkim i laboratorijskim obilježjima manji je od ukupnog broja uspješno genotipiziranih bolesnika. To ne znači da za ostale bolesnike nije postojala dokumentacija, nego da za sve ispitanike nisu bile dostupne sve unaprijed definirane varijable potrebne za pojedinu analizu. Zbog toga se genotipska baza i kliničko-laboratorijska baza ne preklapaju u potpunosti, što je važno jasno navesti kako ne bi nastao dojam metodološke nedosljednosti. Drugo, dio genotipskih skupina, osobito u analizama GSTP1, bio je malen, pa su pojedini rezultati osjetljivi na promjene u vrlo malom broju događaja. Treće, veći broj paralelnih usporedbi povećava mogućnost da se dio statistički značajnih nalaza pojavi slučajno. Četvrto, za GSTA1 je u kontrolnoj skupini utvrđeno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže, zbog čega nalaze za taj lokus treba tumačiti s pojačanim oprezom. Peto, dio rasprave za GSTP1 mora se konačno uskladiti sa završnim rezultatima nakon objedinjavanja heterozigotnih skupina i ponovne provjere razlika u frekvencijama alela i genotipova. Sva ta ograničenja dobro su poznata u studijama kandidatskih gena u složenim upalnim bolestima, osobito kada se analizira više fenotipskih ishoda u jednoj kohorti [19, 59]. Unatoč tim ograničenjima, ovo istraživanje daje korisne podatke o povezanosti GST varijabilnosti s heterogenošću kliničke slike IgA vaskulitisa u djece. Najizraženiji signal dobiven je za GSTM1 i gastrointestinalno zahvaćanje, dok su za druge lokuse uočene slabije ili parcijalne povezanosti. Time se pokazuje da GST varijante u IgA vaskulitisu vjerojatno imaju više smisla kao modulatori fenotipa nego kao jaki prediktori same pojavnosti bolesti. Takav zaključak dobro se uklapa u suvremeno razumijevanje bolesti kao posljedice međudjelovanja imunoloških, genetskih i okolišnih čimbenika, a ne djelovanja jednog dominantnog lokusa [2, 18, 53].

5.7. Završno tumačenje

Kada se svi rezultati promotre zajedno, stvara se razmjerno dosljedna slika. GSTM1, GSTT1 i GSTP1 rs1695 nisu pokazali jasnu povezanost s ukupnim rizikom za nastanak IgA vaskulitisa u analiziranoj populaciji djece. GSTA1 je pokazao signal koji može upućivati na povezanost s bolešću, ali taj nalaz ostaje otvoren za dodatnu provjeru zbog odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini. Unutar skupine bolesnika pojavile su se povezanosti koje su klinički smisljenije od samih analiza pojavnosti bolesti. Među njima se najviše izdvaja povezanost GSTM1-null genotipa s gastrointestinalnim zahvaćanjem, dok za GSTP1 i GSTT1 laboratorijski i fenotipski nalazi zahtijevaju oprezno i privremeno tumačenje.

Dobiveni rezultati upućuju na to da GST polimorfizme u IgA vaskulitisu nije najkorisnije promatrati samo kroz jednostavnu podjelu na bolesnike i kontrole. Mnogo je korisnije promatrati ih kroz pojedine podfenotipove bolesti i kroz razlike u organskom zahvaćanju. U daljnjim istraživanjima najveću bi vrijednost imalo povezivanje GST podataka s većim i metodološki ujednačenijim kliničkim bazama, s jasno definiranim fenotipskim skupinama i sa strožom provjerom lokusa koji odstupaju od očekivane genotipske raspodjele [7, 19, 59, 82].

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata provedenog istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

1. Polimorfizmi *GSTM1*, *GSTT1* i *GSTP1* rs1695 nisu pokazali povezanost s pojavnošću IgA vaskulitisa u ispitivanoj populaciji djece.
2. Za polimorfizam *GSTA1* C-69T utvrđena je povezanost u recesivnom modelu, uz veću učestalost TT genotipa u bolesnika s IgA vaskulitisom nego u kontrolama, pri čemu taj nalaz zahtijeva oprezno tumačenje zbog odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini.
3. *GSTM1*-null genotip bio je povezan s češćom gastrointestinalnom zahvaćenošću u bolesnika s IgA vaskulitisom.
4. Otok skrotuma pokazao je povezanost s varijantama *GSTM1* i *GSTP1*, što upućuje na moguću povezanost GST varijabilnosti s urogenitalnim fenotipom bolesti.
5. Analizirane GST varijante nisu pokazale jasnu povezanost s nefritisom ni s recidivima bolesti.
6. Pojedini laboratorijski pokazatelji razlikovali su se među genotipskim skupinama, ali bez dosljednog obrasca koji bi upućivao na jedinstven učinak analiziranih GST varijanti na laboratorijski profil bolesti.
7. Rezultati istraživanja upućuju na to da GST varijabilnost u IgA vaskulitisu ima veće značenje u oblikovanju pojedinih kliničkih fenotipova nego u samoj pojavnosti bolesti.

7. LITERATURA

1. Parums DV. A review of IgA vasculitis (Henoch-Schönlein purpura) past, present, and future. *Med Sci Monit.* 2024. doi:10.12659/MSM.943912.
2. Xu L, Li Y, Wu X. IgA vasculitis update: epidemiology, pathogenesis, and biomarkers. *Front Immunol.* 2022;13:921864. doi:10.3389/fimmu.2022.921864.
3. Oni L, Platt C, Marlais M, et al. National recommendations for the management of children and young people with IgA vasculitis. *Arch Dis Child.* 2024;110(1):67-76. doi:10.1136/archdischild-2024-327364.
4. Leung AKC, Barankin B, Leong KF. Henoch-Schönlein purpura in children: an updated review. *Curr Pediatr Rev.* 2020;16(4):265-276. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32384035/>
5. Trnka P. Henoch-Schönlein purpura in children. *J Paediatr Child Health.* 2013;49(12):995-1003. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24134307/>
6. Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases. *Biochem J.* 2001;360:1-16. doi:10.1042/BJ3600001.
7. Mazari AMA, Zhang L, Ye ZW, Zhang J, Tew KD, Townsend DM. The multifaceted role of glutathione S-transferases in health and disease. *Biomolecules.* 2023;13(4):688. doi:10.3390/biom13040688.
8. Strange RC, Spiteri MA, Ramachandran S, Fryer AA. Glutathione-S-transferase family of enzymes. *Mutat Res.* 2001;482(1-2):21-26. doi:10.1016/S0027-5107(01)00206-8.
9. Keskin N, Civilibal M, Elevli M, et al. Elevated plasma advanced oxidation protein products in children with Henoch-Schönlein purpura. *Pediatr Nephrol.* 2011. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21553322/>
10. Ece A, Kelekçi S, Hekimoğlu A, Kocamaz H, Balik H, Yolbaş I, et al. Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and total antioxidant status in children with Henoch-Schönlein purpura. *Clin Rheumatol.* 2008. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18408927/>
11. Demircin G, Oner A, Erdoğan O, et al. Erythrocyte superoxide dismutase activity and plasma malondialdehyde levels in children with Henoch-Schönlein purpura. *Acta Paediatr.* 1998;87(8):848-852. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9736232/>

12. Buyan N, Bek K, Arikan N, et al. Role of free oxygen radicals and prostanoids in the pathogenesis of Henoch-Schönlein purpura. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1998. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9844990/>
13. Erdoğan O, Oner A, Aydın A, et al. Effect of vitamin E treatment on the oxidative damage occurring in Henoch-Schönlein purpura. *Acta Paediatr*. 2003. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12839282/>
14. Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA, Anwar WA, Au WW. A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. *Cancer Lett*. 1996;107(2):229-233. doi:10.1016/0304-3835(96)04832-X.
15. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. *Carcinogenesis*. 1997;18(4):641-644. doi:10.1093/carcin/18.4.641.
16. Ping J, Wang H, Huang M, Liu ZS. Genetic analysis of glutathione S-transferase A1 polymorphism in a Chinese population. *Toxicol Sci*. 2006;89(2):438-443. doi:10.1093/toxsci/kfj037.
17. Frković M, Turčić A, Gagro A, et al. Erythrocyte GST activity as a sensitive marker of kidney function impairment in children with IgA vasculitis. *Int J Mol Sci*. 2024;25(7):3795. doi:10.3390/ijms25073795.
18. Castañeda S, Martínez-Taboada VM, et al. IgA vasculitis (Henoch-Schönlein purpura): an update on pathophysiology and management. *J Clin Med*. 2024;13(21):6621. doi:10.3390/jcm13216621.
19. Juras A, Frković M, Held M, Šestan M, et al. Association of glutathione transferase M1, T1, P1 and A1 gene polymorphism and susceptibility to IgA vasculitis. *Int J Mol Sci*. 2024;25(14):7777. doi:10.3390/ijms25147777.
20. Held M, Stingl Jankovic K, Sestan M, Sapina M, Kifer N, Srsen S, et al. HLA polymorphisms and clinical manifestations in IgA vasculitis. *Int J Mol Sci*. 2024;25(2):882. doi:10.3390/ijms25020882.
21. Gurses D, Parlaz A, Bor-Kucukatay M, Kucukatay V, Erken E. Evaluation of oxidative stress and erythrocyte properties in children with Henoch-Schönlein purpura. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2014;36(3):e151-e155.
22. Zhu Y, et al. Changes of inflammatory mediators and oxidative stress markers in Henoch-Schönlein purpura. *BMC Pediatr*. 2019;19:409.

23. Kısaoğlu H, et al. Interleukin-17 and oxidative stress in children with immunoglobulin A vasculitis. 2022. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34169806/>
24. Söylemez K, et al. Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with Henoch-Schönlein purpura. 2021/2022. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35851226/>
25. Ozen S, Pistorio A, Iusan SM, et al. EULAR/PRINTO/PRES classification criteria for Henoch-Schönlein purpura, childhood polyarteritis nodosa, childhood Wegener granulomatosis and childhood Takayasu arteritis: Ankara 2008. *Ann Rheum Dis*. 2010;69(5):798-806. doi:10.1136/ard.2009.116657.
26. Piram M, Mahr A. Epidemiology of immunoglobulin A vasculitis (Henoch-Schönlein): current state of knowledge. *Curr Opin Rheumatol*. 2013;25(2):171-178. Available from: <https://europepmc.org/article/med/23318735>
27. García-Porrúa C, Calviño MC, Llorca J, Couselo JM, González-Gay MA. Henoch-Schönlein purpura in children and adults: clinical differences in a defined population. *Semin Arthritis Rheum*. 2002;32(3):149-156. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12528079/>
28. Aalberse J, Dolman K, Ramnath G, Pereira RR, Davin JC. Henoch Schonlein purpura in children: an epidemiological study among Dutch paediatricians on incidence and diagnostic criteria. *Ann Rheum Dis*. 2007;66(12):1648-1650. doi:10.1136/ard.2006.069187.
29. Trapani S, Micheli A, Grisolia F, Resti M, Chiappini E, Falcini F, et al. Henoch Schonlein purpura in childhood: epidemiological and clinical analysis of 150 cases over a 5-year period and review of literature. *Semin Arthritis Rheum*. 2005;35(3):143-153. doi:10.1016/j.semarthrit.2005.08.007.
30. Hastings MC, Rizk DV, Kiryluk K, et al. IgA vasculitis with nephritis: update of pathogenesis with clinical implications. *Pediatr Nephrol*. 2022;37:719-733. doi:10.1007/s00467-021-04950-y.
31. Saulsbury FT. Henoch-Schönlein purpura in children: report of 100 patients and review of the literature. *Medicine (Baltimore)*. 1999;78(6):395-409. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10575422/>
32. Basta-Juzbašić A, urednica. *Dermatologija i venerologija*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2018.
33. Mardešić D, urednik. *Pedijatrija*. 8. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2016.

34. Kato S, Gold BD, Kato A. Gastrointestinal manifestations and pathogenesis in childhood immunoglobulin A vasculitis. *Front Pediatr*. 2024;12:1459394. doi:10.3389/fped.2024.1459394.
35. Kawasaki Y. The pathogenesis and treatment of pediatric Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Clin Exp Nephrol*. 2011;15(5):648-657. doi:10.1007/s10157-011-0478-1.
36. Batinić D, Knotek M, urednici. *Nefrologija*. 2. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2014.
37. Jelaković B, Kovačević-Vojtušek I, urednici. *Bolesti bubrega i mokraćnog sustava*. Zagreb: Medicinska naklada; 2014.
38. Stewart M, Savage JM, Bell B, McCord B. Long term renal prognosis of Henoch-Schönlein purpura in an unselected childhood population. *Eur J Pediatr*. 1988;147(2):113-115. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3366130/>
39. Counahan R, Winterborn MH, White RH, Heaton JM, Meadow SR, Bluett NH, et al. Prognosis of Henoch-Schönlein nephritis in children. *Br Med J*. 1977;2(6078):11-14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/871734/>
40. Schärer K, Krmar R, Quersfeld U, Ruder H, Waldherr R, Schaefer F. Clinical outcome of Schönlein-Henoch purpura nephritis in children. *Pediatr Nephrol*. 1999;13(9):816-823. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10603128/>
41. Butani L, Morgenstern BZ. Long-term outcome in children after Henoch-Schönlein purpura glomerulonephritis. *Clin Pediatr (Phila)*. 2007;46(6):505-511. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17579102/>
42. Delbet JD, Hogan J, Aoun B, Salomon R, Lapeyraque AL, Macher MA, et al. Clinical outcomes in children with Henoch-Schönlein purpura nephritis presenting with ISKDC grade II. *Pediatr Nephrol*. 2017;32(11):2061-2068. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28204946/>
43. Bogdanović R. Henoch-Schönlein purpura nephritis in children: risk factors, prevention and treatment. *Acta Paediatr*. 2009;98(12):1882-1889. doi:10.1111/j.1651-2227.2009.01445.x.
44. Jauhola O, Ronkainen J, Koskimies O, Ala-Houhala M, Arikoski P, Hölttä T, et al. Renal manifestations of Henoch-Schönlein purpura in a 6-month prospective study of 223 children. *Arch Dis Child*. 2010;95(11):877-882. doi:10.1136/adc.2009.182394.
45. Held M, Kozmar A, Šestan M, et al. Insight into the interplay of Gd-IgA1, HMGB1, RAGE and PCDH1 in IgA vasculitis. *Int J Mol Sci*. 2024;25(8):4383. doi:10.3390/ijms25084383.

46. Gamulin S, Marušić M, Kovač Z, urednici. Patofiziologija. 7. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.
47. Kaštelan M, Perić M, urednici. Autoimune i upalne bolesti. Zagreb: Medicinska naklada; 2019.
48. Vranešić Bender D, Krznarić Ž, urednici. Klinička imunologija i alergologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2017.
49. Song Y, Huang X, Yu G, Qiao J, Cheng J, Wu J, et al. Pathogenesis of IgA vasculitis: an up-to-date review. *Front Immunol.* 2021;12:771619. doi:10.3389/fimmu.2021.771619.
50. Chen XQ, Tu L, Tang Q, Huang L, Qin YH. An emerging role for neutrophil extracellular traps in IgA vasculitis: a mini-review. *Front Immunol.* 2022;13:912929. doi:10.3389/fimmu.2022.912929.
51. Kiryluk K, Novak J. The genetics and immunobiology of IgA nephropathy. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2325-2332. doi:10.1172/JCI74475.
52. Wyatt RJ, Julian BA. IgA nephropathy. *N Engl J Med.* 2013;368(25):2402-2414. doi:10.1056/NEJMra1206793.
53. Pillebout E. IgA vasculitis and IgA nephropathy: same disease? *J Clin Med.* 2021;10(11):2310. doi:10.3390/jcm10112310.
54. Sanders JT, Wyatt RJ. IgA nephropathy and Henoch-Schönlein purpura nephritis. *Curr Opin Pediatr.* 2008;20(2):163-170. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18332712/>
55. Peruzzi L, Coppo R. IgA vasculitis nephritis in children and adults: one or different entities? *Pediatr Nephrol.* 2021;36(9):2615-2625. doi:10.1007/s00467-020-04818-7.
56. Katrenčíková B, Vaváková M, Paduchová Z, et al. Oxidative stress markers and antioxidant enzymes in children and adolescents with depressive disorder and impact of omega-3 fatty acids in randomised clinical trial. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(8):1256. doi:10.3390/antiox10081256.
57. Marušić M, urednik. *Imunologija.* Zagreb: Medicinska naklada; 2015.
58. Coles BF, Kadlubar FF, et al. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2 expression. *Pharmacogenetics.* 2001;11(8):663-669.
59. López-Mejías R, Castañeda S, Genre F, Remuzgo-Martínez S, Carmona FD, Llorca J, et al. Genetics of immunoglobulin-A vasculitis (Henoch-Schönlein purpura): an

- updated review. *Autoimmun Rev.* 2018;17(3):301-315.
doi:10.1016/j.autrev.2017.11.024.
60. Held M, Juras A, Šestan M, et al. Influence of glutathione S-transferase (GST) polymorphisms in patients with Henoch-Schönlein purpura [conference abstract]. *European Immunology*; 2022. doi:10.1080/27707571.2022.2138037.
 61. Mlakar V, Berginc G, Volavsek M, et al. Functional characterization of genetic polymorphisms in the promoter region of the GSTA1 gene. *Sci Rep.* 2021;11:5092. doi:10.1038/s41598-021-83996-2.
 62. Indrawijaya YYA, et al. GSTA1 gene polymorphisms are associated with cyclophosphamide effectiveness in lupus nephritis patients: a case-control study in Indonesia. 2024. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11731938/>
 63. Hayes JD, Strange RC. Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology.* 2000;61(3):154-166. doi:10.1159/000028396.
 64. Audemard-Verger A, Martin Silva N, Verstuyft C, Costedoat-Chalumeau N, Hummel A, Le Guern V, et al. Glutathione S transferases polymorphisms are independent prognostic factors in lupus nephritis treated with cyclophosphamide. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151696. doi:10.1371/journal.pone.0151696.
 65. Datta SK, et al. Association of glutathione S-transferase M1 and T1 gene polymorphism with oxidative stress in diabetic and nondiabetic chronic kidney disease. *Clin Biochem.* 2010. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20954980/>
 66. Levy RV, et al. Association of GSTM1 deletion with progression of chronic kidney disease in the African American Study of Kidney Disease and Hypertension (AASK). 2021. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9166174/>
 67. Suvakov S, et al. Associations of GSTM10 and GSTA1A genotypes with the risk of cardiovascular mortality in end-stage renal disease patients. *BMC Nephrol.* 2014;15:12. doi:10.1186/1471-2369-15-12.
 68. Včev A, Babić I, urednici. *Klinička patologija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
 69. Hajdinák P, Zubor P, Kapustová I, et al. Genetic polymorphism of GSTP-1 affects cyclophosphamide treatment of autoimmune diseases. *Molecules.* 2020;25(7):1542. doi:10.3390/molecules25071542.
 70. Božina N, Vrhovac B, urednici. *Farmakogenomika i personalizirana terapija*. Zagreb: Medicinska naklada; 2011.

71. Yang X, Zhang X, Li Y, et al. Individualized medication based on pharmacogenomics and treatment progress in children with IgAV nephritis. *Front Pharmacol*. 2022;13:956397. doi:10.3389/fphar.2022.956397.
72. Oni L, Sampath S. Childhood IgA vasculitis (Henoch Schonlein purpura): advances and knowledge gaps. *Front Pediatr*. 2019;7:257. doi:10.3389/fped.2019.00257.
73. Davin JC, Coppo R. Henoch-Schönlein purpura nephritis in children. *Nat Rev Nephrol*. 2014;10(10):563-573. doi:10.1038/nrneph.2014.126.
74. Nüsken E, Weber LT. IgA vasculitis nephritis. *Curr Opin Pediatr*. 2022;34(2):209-216. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35125382/>
75. Suzuki H, Yasutake J, Makita Y, Tanbo Y, Yamasaki K, Sofue T, et al. IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis have a shared feature involving galactose-deficient IgA1-oriented pathogenesis. *Kidney Int*. 2018;93(3):700-705. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29329643/>
76. Nurmi MS, Puras A, Lassila M, et al. Urine complement-related proteins in IgA nephropathy and IgA vasculitis with nephritis. 2024. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40008348/>
77. Taşkın RB, et al. Evaluation of serum complement components in pediatric IgA vasculitis. 2025. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40868541/>
78. Williams CEC, Toner A, Taroni JN, Dillon MJ, Tullus K, Marks SD. A systematic review of urine biomarkers in children with IgA vasculitis nephritis. *Pediatr Nephrol*. 2021;36(10):3033-3044. doi:10.1007/s00467-021-05107-7.
79. Marro J, Yacoub R, Hanna H, et al. Urinary protein array analysis to identify key inflammatory biomarkers in IgA vasculitis nephritis. *Kidney360*. 2022. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35626799/>
80. Williams CEC, et al. Biomarkers to predict kidney outcomes in children with IgA vasculitis nephritis. 2025. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/40131233/>
81. Calvo-Río V, Loricera J, Ortiz-Sanjuán F, Mata C, Martín L, Alvarez L, et al. Recidives in patients with Henoch-Schönlein purpura: analysis of 417 patients from a single center. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(28):e4217. doi:10.1097/MD.0000000000004217.
82. Xu M, Wei Z, Wang L, Liang W, Gao F, Sang S, et al. Advances in multi-omics and therapeutic studies of Henoch-Schönlein purpura. *Ital J Pediatr*. 2026;52:5. doi:10.1186/s13052-025-02174-6.

Ocjena rada
u tijeku!

8. SAŽETAK

IgA vaskulitis najčešći je sistemski vaskulitis dječje dobi i obilježen je izrazitom kliničkom raznolikošću, od blažih oblika bolesti do gastrointestinalnih, bubrežnih i drugih organskih manifestacija koje mogu odrediti težinu i ishod bolesti. U patogenezi bolesti važnu skupinu kandidata čine enzimi glutation-S-transferaze, koji sudjeluju u detoksikaciji reaktivnih metabolita i održavanju redoks ravnoteže tijekom upale. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati povezanost delecijских polimorfizama *GSTM1* i *GSTT1* te SNP varijanti *GSTA1* C-69T (rs3957357) i *GSTP1* Ile105Val (rs1695) s pojavom IgA vaskulitisa i s unaprijed definiranim kliničkim podfenotipovima bolesti u djece iz Republike Hrvatske. Istraživanje je provedeno kao multicentrična studija slučajeva i kontrola u pet tercijarnih pedijatrijskih centara u Republici Hrvatskoj. U analizu su uključena 293 bolesnika s IgA vaskulitisom i 94 kontrolna ispitanika. Genotipizacija delecijских polimorfizama *GSTM1* i *GSTT1* provedena je metodom višestruke lančane reakcije polimerazom, dok su polimorfizmi *GSTA1* i *GSTP1* određeni metodama PCR-RFLP i odgovarajućim pristupima genotipizacije. Uz genotipske podatke analizirane su kliničke, laboratorijske, biokemijske i imunološke varijable te njihova povezanost s pojedinim genotipovima. Rezultati su pokazali da *GSTM1*-null, *GSTT1*-null i *GSTP1* rs1695 nisu bili povezani s pojavom IgA vaskulitisa na razini osnovne usporedbe bolesnika i kontrola. Za *GSTA1* C-69T utvrđena je povezanost u recesivnom modelu, pri čemu je TT genotip bio češći u bolesnika nego u kontrolama, ali taj nalaz treba tumačiti oprezno zbog odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže u kontrolnoj skupini. Unutar skupine bolesnika uočene su povezanosti pojedinih GST varijanti s kliničkom slikom bolesti. Gastrointestinalna zahvaćenost bila je češća u bolesnika s *GSTM1*-null genotipom, dok su urogenitalne manifestacije bile povezane s *GSTM1* i *GSTP1* varijantama. Za nefritis i recidive nije utvrđena stabilna povezanost ni s jednim analiziranim GST lokusom. U laboratorijskim analizama zabilježene su pojedine razlike u hematološkim, upalnim i koagulacijskim pokazateljima među genotipskim skupinama, ali bez jedinstvenog obrasca koji bi upućivao na snažnu i dosljednu biološku povezanost. Dobiveni rezultati upućuju na to da GST polimorfizmi vjerojatno nemaju jednaku važnost u pojavnosti bolesti i u kliničkim manifestacijama bolesti. Njihov doprinos, ako postoji, vjerojatnije se očituje u modulaciji pojedinih manifestacija nego u određivanju ukupnog rizika za razvoj bolesti. Istraživanje pridonosi boljem razumijevanju genetske podloge i fenotipske heterogenosti IgA vaskulitisa u djece te predstavlja osnovu za buduća istraživanja

usmjerena na preciznije definiranje podfenotipova bolesti i njihovo povezivanje s genetskim i biološkim biljezima.

Ključne riječi: IgA vaskulitis, djeca, glutathion-S-transferaze, GSTM1, GSTT1, GSTA1, GSTP1, genetski polimorfizmi, nefritis, gastrointestinalna zahvaćenost

9. SUMMARY

IgA vasculitis is the most common systemic vasculitis in childhood and is characterized by marked clinical heterogeneity, ranging from mild disease to gastrointestinal, renal, and other organ manifestations that may influence disease severity and outcome. Glutathione S-transferases are relevant candidate enzymes in disease pathogenesis because they participate in the detoxification of reactive metabolites and the maintenance of redox balance during inflammation. The aim of this study was to investigate the association of *GSTM1* and *GSTT1* deletion polymorphisms and *GSTA1* C-69T (rs3957357) and *GSTP1* Ile105Val (rs1695) variants with the occurrence of IgA vasculitis and with predefined clinical subphenotypes of the disease in children from Croatia. This multicenter case-control study was conducted in five tertiary pediatric centers in the Republic of Croatia. The analysis included 293 patients with IgA vasculitis and 94 controls. *GSTM1* and *GSTT1* deletion polymorphisms were determined by multiplex polymerase chain reaction, whereas *GSTA1* and *GSTP1* variants were analyzed using PCR-RFLP and corresponding genotyping methods. In addition to genotypic data, clinical, laboratory, biochemical, and immunological variables were evaluated and compared across genotype groups. The results showed that *GSTM1*-null, *GSTT1*-null, and *GSTP1* rs1695 were not associated with the occurrence of IgA vasculitis in the primary comparison between patients and controls. For *GSTA1* C-69T, an association was observed in the recessive model, with the TT genotype more frequent in patients than in controls; however, this finding should be interpreted with caution because deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in the control group. Within the patient group, several GST variants were associated with specific clinical manifestations. Gastrointestinal involvement was more frequent in patients with the *GSTM1*-null genotype, while urogenital manifestations were associated with *GSTM1* and *GSTP1* variants. No consistent association was found between any analyzed GST locus and nephritis or disease relapse. Laboratory analyses revealed selected differences in hematological, inflammatory, and coagulation parameters between genotype groups, but without a consistent pattern indicating a strong biological association. These findings suggest that GST polymorphisms are unlikely to play the same role in overall disease susceptibility and clinical expression. If present, their contribution is more likely reflected in the modulation of individual disease manifestations than in determining the overall risk of disease onset. This study contributes to a better understanding of the genetic background and phenotypic heterogeneity

of childhood IgA vasculitis and provides a basis for future research focused on more precise definition of disease subphenotypes and their relationship with genetic and biological markers.

Keywords: IgA vasculitis, children, glutathione S-transferases, GSTM1, GSTT1, GSTA1, GSTP1, genetic polymorphisms, nephritis, gastrointestinal involvement

10. ŽIVOTOPIS

Ocjena rada
u tisku!