

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Željka Martinović

**Utjecaj imunosupresiva na brzinu
agregacije trombocita u bolesnika s
transplantiranim bubregom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2017.

Istraživanje na kojem se temelji ova doktorska disertacija provedeno je u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju bubrega, Klinike za unutarnje bolesti, KBC Zagreb.

Voditelj rada:

prof. dr. sc. Nikolina Bašić-Jukić

Zavod za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju bubrega

Klinika za unutarnje bolesti

Klinički bolnički centar Zagreb

Zahvaljujem svojoj mentorici koja je sve osmislila i poticala!

Sadržaj

1	Uvod.....	1
1.1	Anatomija i fiziologija bubrega	1
1.2	Kronična bubrežna bolest.....	4
1.2.1	Definicija i klasifikacija	4
1.2.2	Uzroci.....	6
1.2.3	Klinička slika	7
1.2.4	Dijagnostika	9
1.3	Nadomještanje bubrežne funkcije	11
1.3.1	Hemodijaliza	12
1.3.2	Peritonejska dijaliza	13
1.3.3	Transplantacija bubrega	13
1.3.4	Komplikacije	15
1.3.5	Imunosupresivi.....	16
1.4	Bolesnici s transplantiranim bubregom i srčanožilne bolesti.....	22
1.4.1	Tradicionalni čimbenici rizika za razvoj srčanožilnih bolesti	23
1.4.2	Trombociti i srčanožilne bolesti.....	26
1.4.3	Imunosupresijska terapija i rizik za razvoj srčanožilnih bolesti	27
1.4.4	Imunosupresijska terapija i agregacija trombocita kod bolesnika s transplantiranim bubregom	28
1.5	Hemostaza.....	30
1.6	PFA -100 (Analizator funkcije trombocita)	33
2	Hipoteza i ciljevi rada	36
3	Ispitanici i metode	37
3.1	Ispitanici.....	37
3.2	Ispitivanje funkcije trombocita	38
3.3	Statističke metode	39
4	Rezultati	40
4.1	Osobine ispitanika.....	40
4.2	Razlike između ispitivane i kontrolne skupine	40
4.2.1	Razlike između ispitivane i kontrolne skupine - kategorijske varijable	40

4.2.2	Razlike između ispitivane i kontrolne skupine - kvantitativne varijable	44
4.3	Razlike između skupina imunosupresiva	45
4.3.1	Razlike u COL/EPI i COL/ADP vrijednostima između skupina imunosupresiva i kontrole	45
4.3.2	Razlike između ispitivanih skupina s obzirom na dob i vrijeme proteklo od transplantacije	48
4.3.3	Razlike između ispitivanih skupina u promatranim kliničkim laboratorijskim vrijednostima – značajna razlika u broju eritrocita u skupini na terapiji takrolimusom	49
4.3.4	Razlike između ispitivanih skupina imunosupresiva u promatranima kategorijskim varijablama - značajna razlika u broju epizoda akutnog odbacivanja i terapiji statinima	51
4.3.5	Učestalost ispitanika s vrijednostima COL/EPI i COL/ADP testa izvan referentnih vrijednosti – rizičnost skupine.....	54
5	Rasprava	59
5.1	Usporedba brzine nastanka trombocitnog ugruška u ispitivanoj u odnosu na kontrolnu skupinu – brže stvaranje trombocitnog ugruška u ispitivanoj skupini	60
5.2	Razlike u COL/EPI i COL/ADP vrijednostima između skupina imunosupresiva i kontrole – brže stvaranje trombocitnog ugruška u skupini liječenoj takrolimusom i sirolimusom.....	61
5.3	Povezanost vremena proteklog od transplantacije s bržom agregacijom trombocita kod skupine bolesnika liječenih takrolimusom i sirolimusom.....	64
5.4	Povezanost liječenja statinima s agregacijom trombocita kod skupine bolesnika liječenih sirolimusom	66
5.5	Povezanost spola s rezultatima istraživanja	67
6	Zaključci.....	70
7	Sažetak.....	73
8	Summary	75
9	Popis literature	77
10	Popis oznaka i kratica.....	91
11	Životopis.....	94

1 Uvod

1.1 Anatomija i fiziologija bubrega

Glavna uloga bubrega je filtriranje krvi čime se iz organizma odstranjuju štetni proizvodi metabolizma, toksini, lijekovi, višak soli i tekućine. Osim izlučivanja štetnih tvari i viška vode iz organizma, bubreg ima i druge funkcije poput:

- regulacije volumena i sastava tjelesnih tekućina,
- regulacije kiselosti tjelesnih tekućina (acidobazna ravnoteža),
- proizvodnje hormona (eritropoetin, renin, prostaglandini).

U anatomskom smislu u bubregu razlikujemo koru i srž. Urin, koji nastaje u bubrežnim kanalićima, nakuplja se u nakapnici odakle se putem mokraćovoda odvodi do mokraćnog mjehura i dalje putem mokraćne cijevi izlučuje izvan tijela. (1,2)

Funkcionalna jedinica bubrega je nefron kojih u svakom bubregu ima približno milijun. Većina nefrona je svojim većim dijelom ili u cijelosti smještena u kori bubrega. Jukstamedularni nefroni smješteni su na prijelazu kore i srži bubrega. Na mjestu dodirivanja aferentne i eferentne arteriole te distalnog tubula, nalaze se specijalizirane stanice u aferentnoj arterioli i tubulu, koje su osjetljive na promjene u veličini protoka krvi i sastava tubularne tekućine. Imaju važnu ulogu u kontroli protoka krvi i glomerularnoj filtraciji, kao i u kontroli oslobađanja renina. (1,2)

Nefron se sastoji od glomerula, proksimalnog tubula, Henleove petlje, distalnog tubula i sabirne cijevi. Glomerul čini nakupina kapilara unutar Bowmanove kapsule. Protok krvi kroz glomerul osigurava aferentna arteriola, čije grane čine kapilarnu mrežu glomerula. Eferentna arteriola odvodi krv iz glomerula i u svom tijeku oblikuje kapilarnu mrežu oko proksimalnog tubula i Henleove petlje u kori bubrega. (1,2)

Tlak krvi u glomerularnim kapilarama uzrokuje filtraciju tekućine iz kapilara u Bowmanovu kapsulu. Tekućina se filtrira kroz tri sloja: endotel kapilare, bazalnu membranu i epitelni sloj Bowmanove kapsule. Endotelne stanice kapilara perforirane su relativno velikim otvorima (70-100 nm), dok epitelne stanice čvrsto prijanjaju jedna uz drugu ostavljajući relativno male filtracijske pukotine (oko 25 nm). Time je stvorena učinkovita filtracijska membrana koja ne propušta stanice i tvari velike molekularne težine. Zbog svoje specifične građe, glomerularne su kapilare nepropusne za bjelančevine i stanične elemente, stoga ih se niti ne nalazi u

mokraći zdravog čovjeka. Filtracijom plazme u Bowmanovoj kapsuli stvara se glomerularni filtrat.(1,2)

Glomerularna filtracija (GF) je volumen tekućine koji se u jedinici vremena filtrira iz glomerularnih kapilara u Bowmanovu kapsulu. Veličina glomerularne filtracije određena je arterijskim tlakom u bubrežnoj arteriji, odnosom između hidrostatskog i koloidno-osmotskog tlaka u glomerulu te hidrostatskog tlaka u Bowmanovoj kapsuli, kao i autoregulacijskim mehanizmima. Tlak glomerularne filtracije iznosi oko 60 mmHg i normalno čini 60% srednjeg arterijskog tlaka, dok mu protutežu čini koloidno-osmotski tlak plazme koji iznosi oko 25 mm Hg, te renalni intersticijski tlak (oko 10 mmHg). Filtracijski tlak proporcionalan je tlaku u aferentnoj arterioli, dok je obrnuto proporcionalan tlaku eferentne arteriole. Oko 20% ukupnog bubrežnog protoka završi u Bowmanovoj kapsuli kao glomerularni filtrat.(1,2)

Glomerularni filtrat iz Bowmanove kapsule, koji je po svom sastavu gotovo jednak plazmi, prelazi u sustav bubrežnih kanalića gdje mu se mijenja sastav. U proksimalnom bubrežnom tubulu reapsorbira se 65-75% filtriranog Na^+ i vode. Glavna funkcija proksimalnog tubula je reapsorpcija Na^+ , dok se voda reapsorbira gradijentom osmotskog tlaka nastalog zbog reapsorpcije otopljenih tvari. Natrij se aktivno transportira iz stanica proksimalnog tubula na kapilarnoj strani pomoću Na^+/K^+ ATP-aze odnosno natrijske crpke. Posljedično snižena unutarstanična koncentracija Na omogućuje pasivni prolaz Na niz koncentracijski gradijent iz lumena u epitelne stanice proksimalnog tubula. Reapsorpcija Na^+ povezana je s reapsorpcijom drugih otopljenih tvari iz lumena tubula i sa sekrecijom H^+ . Specifični proteinski nosači koriste nisku unutarstaničnu koncentraciju Na^+ za aktivni prijenos glukoze, fosfata i aminokiselina, te se istodobno pospješuje apsorpcija drugih kationa poput K^+ , Ca^{2+} , i Mg^{2+} . Filtrirani bikarbonati vraćaju se u plazmu iz proksimalnog tubula. Kloridi se iz tubula uglavnom reapsorbiraju pasivno, niz koncentracijski gradijent, dok se aktivna reapsorpcija klorida može odvijati se kao rezultat kotransporta s K^+ , te se oba iona na kapilarnoj strani izbacuju iz stanice. Voda se reapsorbira iz proksimalnog tubula pasivnim putem zbog osmotskog gradijenta. (1,3)

Henleova petlja sastoji se od silaznog i uzlaznog dijela. Tanki silazni segment nastavak je proksimalnog tubula i spušta se iz bubrežne kore u medulu. Uzlazni krak Henleove petelje vraća se natrag u bubrežnu koru, a sastoji se od funkcionalno različitih dijelova: tankog uzlaznog dijela, debljeg medularnog uzlaznog dijela i debljeg kortikalnog uzlaznog dijela. Henleova petlja odgovorna je za održavanje hipertoničnosti medularnog intersticija i

indirektno osigurava sabirnim cijevima mogućnost koncentracije urina. Samo 25-35% ultrafiltrata iz Bowmanove kapsule normalno dospije do Henleove petlje. Tu se resorbira 15-20% filtriranog natrija. S iznimkom debljeg dijela uzlaznog kraka, reapsorpcija otopljenih tvari i vode u Henleovoj petlji odvija se pasivnim putem ovisno o koncentraciji i osmotskom tlaku. Silazni krak Henleove petlje kao i tanji dio uzlaznog kraka propusni su za vodu, Na^+ , Cl^- i ureu. U debljem dijelu uzlaznog kraka, natrij i klor reapsorbiraju se u suvišku vode. Reapsorpcija natrija u tom dijelu nefrona izravno je povezana s reapsorpcijom kalija i klora. Aktivna reapsorpcija natrija i nadalje je posljedica aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze na kapilarnoj strani epitelne stanice. Za razliku od silaznog kraka Henleove petlje kao i tanjeg dijela uzlaznog kraka, deblji dio uzlaznog kraka Henleove petlje nije propustan za vodu i ureu, dok se Na^+ i Cl^- reapsorbiraju aktivnim putem, te stoga nastaje osmotski gradijent. Posljedično tome, tubularna tekućina koja izlazi iz Henleove petlje je hipotonična, dok je okolni intersticij hipertoničan. Deblji dio uzlaznog kraka Henleove petlje je važno mjesto reapsorpcije kalcija i magnezija. (1,2,3)

Distalni tubul prima hipotoničnu tekućinu iz Henleove petlje i odgovoran je samo za manje modifikacije u sastavu tubularne tekućine. Relativno je nepropustan za vodu i natrij. Na reapsorpciju natrija u tom dijelu nefrona otpada samo oko 5% filtrirane količine. Energija potiče od aktivnosti Na^+/K^+ ATP-aze na kapilarnoj strani epitelne stanice, dok se na luminalnoj strani natrij reapsorbira pomoću $\text{Na}-\text{Cl}$ izmjenjivača. Distalni tubul je glavno mjesto reapsorpcije kalcija djelovanjem paratiroidnog hormona i vitamina D. Zavinuti dio distalnog tubula također predstavlja mjesto hormonski posredovane reapsorpcije kalcija, te, uz to, sudjeluje i u reapsorpciji natrija pod djelovanjem aldosterona. (1,2,3)

Sabirna cijev može se podijeliti u kortikalni i medularni dio. Odgovorna je za reapsorpciju svega 5-7 % filtrirane količine natrija. U kortikalnom dijelu sabirne cijevi nalazimo dvije vrste stanica: P-stanice (engl. principal cells) koje primarno izlučuju kalij i sudjeluju u aldosteronom posredovanoj reapsorpciji natrija, te I-stanice (engl. intercalated cells) koje su odgovorne za regulaciju acido-bazne ravnoteže. Kako P stanice reapsorbiraju natrij aktivnim putem, istodobno se mora reapsorbirati Cl^- ili izlučiti K^+ kako bi se održala elektroneutralnost stanice. Povećanje koncentracije intracelularnog kalija potiče njegovu sekreciju. Aldosteron pospješuje aktivnost Na^+/K^+ ATP-aze u tom dijelu nefrona, te istodobno potiče aktivnost H^+ -ATP-aze koja pospješuje sekreciju H^+ na luminalnoj strani I-stanica, dok se bikarbonati reapsorbiraju. I-stanice dodatno sadržavaju K^+-H^+ -ATP-azu, crpku koja na luminalnoj strani

stanice reapsorbira K^+ i izlučuje H^+ . Neke I-stanice imaju sposobnost sekrecije bikarbonata kao odgovor na veliko alkalno opterećenje. (1,2,3)

Medularni dio sabirne cijevi spušta se od bubrežne kore kroz hipertoničku medulu te se priključuje sabirnim cijevima iz drugih nefrona kako bi se formirao ureter. Primarno je mjesto djelovanja antidiuretskog hormona (ADH) koji se još naziva i arginin vazopresin (AVP). Propusnost luminalne membrane za vodu izravno ovisi o prisustvu antidiuretskog hormona (ADH). Dehidracija pospješuje sekreciju ADH koji djeluje na luminalnu membranu koja postaje propusna za vodu. Posljedično tome, voda se osmozom reapsorbira iz tubula uz stvaranje koncentriranog urina. Nasuprot tome, dobra hidririranost suprimira sekreciju ADH zbog čega tekućina u sabirnoj cijevi prolazi kroz medulu nepromijenjena i ostaje hipotonična. Kortikalni dio sabirne cijevi propustan je za ureu, za razliku od medularnog dijela, koji je normalno nepropustan za ureu. U prisustvu ADH, voda se resorbira iz sabirnih cijevi zbog čega dolazi do povećanja koncentracije uree. (1,2,3)

1.2 Kronična bubrežna bolest

1.2.1 Definicija i klasifikacija

Kronična bubrežna bolest može se definirati kao oštećenje bubrega u trajanju od 3 mjeseca ili dulje, u smislu morfološkog odstupanja ili patološkog nalaza urina i krvi, sa ili bez smanjenja glomerularne filtracije, odnosno smanjenjem glomerularne filtracije (GFR) na vrijednosti ispod $60\text{ml}/\text{min}/1.73\text{ m}^2$ sa ili bez oštećenja bubrega. (1)

Oštećenje bubrega obično se utvrđuje pokazateljima bubrežnog oštećenja koji uključuju patološki nalaz urina i krvi odnosno promjene u slikovnim prikazima. Glavni biljeg oštećenja bubrega je proteinurija. Ostali pokazatelji uključuju promjene u sedimentu urina, patološki nalaz urina i krvi, te patološka odstupanja u slikovnim prikazima. (1,4)

Najbolje mjerilo cjelokupne funkcije bubrega je veličina glomerularne filtracije. Glomerularna filtracije (GFR, od engl. glomerular filtration rate) može se definirati kao količina urina koja se stvara u jedinici vremena u oba bubrega. Normalne vrijednosti glomerularne filtracije razlikuju se s obzirom na dob, spol i tjelesnu veličinu. Normalna vrijednost GFR kod mladih odraslih osoba je približno $120 - 130\text{ ml}/\text{min}/1.73\text{ m}^2$ i opada s dobi. (5) Vrijednosti GFR ispod $60\text{ ml}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ predstavlja gubitak više od polovice

vrijednosti normalne bubrežne funkcije zdrave odrasle osobe, te ispod te vrijednosti raste učestalost komplikacija kronične bubrežne bolesti.(1)

Bubrežna bolest može napredovati u kronično bubrežno zatajenje kroz nekoliko stadija koji se temelje na veličini glomerularne filtracije, kako je ispod prikazano (3,4):

Stadiji kronične bubrežne bolesti		GFR (ml/min/1.73m ²)
1.	oštećenje bubrega uz normalnu ili povišenu glomerularnu filtraciju	≥ 90
2.	oštećenje bubrega uz blago smanjenje glomerularne filtracije	60-89
3.	umjereno smanjenje glomerularne filtracije	30-59
4.	teško smanjenje glomerularne filtracije	15-29
5.	zatajenje bubrega	< 15

Prilagođeno prema Levey AS, Coresh J, Balk E, et al: National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification, Ann Intern Med 139:137-147, 2003. (3)

Prvi stadij kronične bubrežne bolesti karakterizira oštećenje bubrega uz normalne vrijednosti glomerularne filtracije. Drugi stadij obilježava oštećenje bubrega uz početno smanjenje bubrežne funkcije na vrijednosti od 60-89 ml/min/1.73m². U slijedećim stadijima kronične bubrežne bolesti dovoljna je samo prisutnost smanjene glomerularne filtracije bez znakova oštećenja bubrega. U trećem stadiju kronične bubrežne bolesti glomerularna filtracija smanjena je na vrijednosti od 30-59 ml/min /1.73m², dok je četvrti stadij karakteriziran vrijednostima od 15-29 ml/min /1.73 m². Prema smjernicama zatajenje bubrega definira se smanjenjem glomerularne filtracije ispod vrijednosti od 15 ml/min /1.73m², što je u većini slučajeva praćeno simptomima uremije, ili potrebom za početak liječenja metodama nadomještanja bubrežne funkcije. Za procjenu veličine glomerularne filtracije koriste se formule koje uzimaju u obzir vrijednost serumskog kreatinina, dob, spol i tjelesnu masu. Jedna od formula za procjenu veličine glomerularne filtracije je i MDRD formula (engl. Modification of Diet in Renal Disease) koja glasi (4):

Glomerularna filtracija (ml/min/1, 73m²) = 186 x (kreatinin u serumu, mg/dl) - 1,154 x (dob, godine) - 0,203 x (0,742 za ženski spol) x (1,212 za crnce). Formula ne sadrži tjelesnu masu kao varijablu jer je standardizirana na površinu tijela (1,73m²). Primjena ove formule u svakodnevnom radu nije jednostavna i zato se koriste kompjutorski programi za brzi izračun glomerularne filtracije primjenom ove formule. U uporabi su i različite druge formule kao što su Cockroft-Gaultova te CKD-EPI formula. (3)

Prema smjernicama NKF KDOQI (National Kidney Foundation Kidney Disease Outcomes Quality Initiative) kronična bubrežna bolest može se klasificirati prema uzroku, te prema vrijednostima glomerularne filtracije i albuminurije. (5). Uzrok kronične bubrežne bolesti razlikuje se s obzirom na prisutnost ili odsutnost sistemske bolesti u smislu dijabetesa i hipertenzije, te s obzirom na patoanatomska oštećenja bubrega. (5) Glomerularna filtracija klasificirana je u 5 stadija, dok je veličina albuminurije podijeljena u 3 kategorije i to: normoalbuminurija ($< 30 \text{ mg}/24 \text{ h}$), albuminurija ($30\text{-}300 \text{ mg}/24\text{h}$), te proteinurija ($> 300 \text{ mg}/24\text{h}$).

Albuminurija je važan pokazatelj u progresije bubrežne funkcije. (5) Povećano izlučivanje albumina urinom je osjetljiv pokazatelj kronične bubrežne bolesti u sklopu dijabetesa, glomerularnih bolesti i hipertenzije, dok se povećano izlučivanje globulina niske molekularne težine smatra osjetljivim biljekom nekih tubulointersticijskih bolesti. (4) Više od 30 mg pa sve do 300 mg albumina u urinu na dan, što se definira kao mikroalbuminurija, rani je prediktor progresivnog gubitka bubrežne funkcije kod dijabetesa tipa 1 i tipa 2. U trenutku manifestiranja mikroalbuminurije, vrijednost glomerularne filtracije još je uvijek u granicama normale ili blago snižena, što je pokazatelj kronične bubrežne bolesti prvog odnosno drugog stupnja. Albuminurija u izoliranom uzroku može se izraziti kao koncentracija albumina (mg/L) ili kao omjer albumina i kreatinina (mg/g ili $\text{mg}/\text{mmol}/\text{L}$). Omjer proteina ili albumina i kreatinina u izoliranom uzorku urina zamjenjuje određivanje proteinurije u 24-satnom urinu. (6)

1.2.2 Uzroci

Najčešći uzrok zatajenja bubrega u razvijenim zemljama je dijabetička nefropatija. Rana manifestacija bolesti praćena je pojavom mikroalbuminurije uz normalne ili povišene vrijednosti glomerularne filtracije. Drugi uzroci uključuju glomerularne, vaskularne, tubulointersticijalne i cistične bolesti bubrega. (4)

Etiologija kronične bolesti bubrega ovisi i o dobi bolesnika, geografskom području, te razvijenosti zemlje; tako da se u starijih bolesnika najčešće radi o hipertenzivnoj nefropatiji i opstrukcijskoj uropatiji. U razvijenim zemljama kao najčešći uzrok navode se dijabetes, hipertenzija i glomerulonefritis, dok su u nerazvijenim zemljama bakterijske infekcije, kamenci i parazitarne bolesti najčešće navedeni uzroci kronične bubrežne bolesti. (4)

Prema podacima Hrvatskog registra nadomještanja bubrežne funkcije (HRNBF, 2012.), oko 30% bolesnika razvije završni stadij kronične bubrežne bolesti kao posljedicu šećerne bolesti i to pretežno dijabetesa tipa 2. Drugi najčešći uzrok zatajenja bubrega su vaskularne bolesti bubrega, od kojih je najzastupljenija hipertenzivna nefropatija, slijede glomerulonefritis (11%), pijelonefritis (15%) te policistične bolesti bubrega. (7)

Prema registrima drugih zemalja, dijabetes je glavni uzrok zatajenja bubrega u svijetu u razvijenim zemljama i zemljama u razvoju. To je vodeća dijagnoza koja dovodi do zatajenja bubrežne funkcije u 20-40% bolesnika koji započinju bubrežno nadomjesno liječenje. (8,9)

1.2.3 Klinička slika

Završni stadij kronične bubrežne bolesti je klinički sindrom koji označava progresivno i trajno propadanje nefrona što u konačnici dovodi do zatajenja svih bubrežnih funkcija (10):

1. ekskrecijske (voda, elektroliti, razgradni produkti metabolizma bjelančevina)
2. endokrine (proizvodnja i lučenje eritropoetina, vitamin D3, vazodilatatorni prostaglandini)
3. metaboličke (biološki važne supstance, lijekovi).

Kao posljedica zatajivanja ekskrecijske funkcije bubrega dolazi do nakupljanja vode, elektrolita i razgradnih proizvoda metabolizma bjelančevina što dovodi do poremećaja u sastavu tjelesnih tekućina. Smanjenje endokrine funkcije bubrega očituje se kroz smanjenu sintezu aktivnog metabolita vitamina D3 što uzrokuje promjene u plazmatskoj koncentraciji kalcija i fosfata, dok smanjena sinteza eritropoetina dovodi do anemije. Istodobno smanjena sinteza vazodilatatornih proteina uzrok je pojavi hipertenzije. Metabolička insuficijencija u funkciji bubrega povezana je sa nakupljanjem biološki aktivnih tvari i lijekova u organizmu. (10)

Nakon oštećenja funkcije bubrega uslijed dijabetesa, hipertenzije, glomerulonefritisa, policističke bolesti bubrega ili neke druge primarne bolesti, dolazi do daljnjeg propadanja bubrežne funkcije neovisno o napredovanju ili aktivnosti osnovne bolesti. Tome doprinose isti sekundarni čimbenici kao što su intraglomerularna hipertenzija, glomerularna hipoperfuzija, proteinurija, patološke promjene intersticija, nakupljanje fosfata, metabolička acidoza, anemija i drugo. Kao posljedica konstrikcije eferentne arteriole dolazi do

intraglomerularne hipertenzije koja dovodi do oštećenja glomerula uslijed lučenja citokina i endotelina koji, između ostalog, potiču glomeruloskleroze i intersticijsku fibrozu. Proteinurija ima štetan učinak na funkciju bubrega u smislu toksičnog učinka na tubularne stanice zbog reapsorpcije proteina te uslijed lučenja upalnih stanica i citokina. (10)

Simptomi kronične bubrežne bolesti javljaju se tek kada je oštećeno više od 80% bubrežne funkcije. U prvom i drugom stadiju kronične bubrežne bolesti bolesnici obično nemaju simptoma, odnosno simptomi su vezani uz osnovnu bolest. Daljnjim pogoršanjem bubrežne funkcije, u 3. stadiju bolesti ($GFR < 60 \text{ ml/min/1,73m}^2$), dolazi do zadržavanja dušičnih tvari: ureje, kreatinina i mokraćne kiseline. Javlja se anemija, opća slabost, nikturija zbog gubitka funkcije koncentracije urina, poremećaj metabolizma kalcija i fosfora s posljedičnim razvojem metaboličke bolesti kostiju, poremećaj koncentracije elektrolita (natrij, kalij) odnosno acidobazne ravnoteže. Četvrti i peti stadij kronične bubrežne bolesti ($GFR < 30 \text{ ml/min/1,73m}^2$) karakterizira uznapredovala bubrežna insuficijencija koja se još naziva uremija. Dolazi do pogoršanja anemije, hipertenzije, poremećaja koncentracije elektrolita i acidobazne ravnoteže, uz potrebu nadomjesnog bubrežnog liječenja ($GFR < 15 \text{ ml/min/1,73m}^2$). (1,3)

Bolesnici su najčešće bez simptoma sve dok vrijednost glomerularne filtracije ne padne ispod 25 ml/min. Kronično bubrežno zatajivanje prate brojne komplikacije u vidu anemije, metaboličkih poremećaja, napredovanja ateroskleroze, pothranjenosti, dislipidemije, gastrointestinalnih i neuroloških poremećaja. (1,3)

Anemija se javlja gotovo uvijek kad klirens kreatinina padne ispod 30 ml/min. Koncentracija hemoglobina je snižena te se uobičajeno kreće od 6-8 g/dL. Nedostatno je stvaranje eritropoetina, životni vijek eritrocita se skraćuje sa 120 na 80 dana, kao i životni vijek drugih stanica. Dodatni čimbenici uključuju gubitak krvi kroz gastrointestinalni trakt, hemodiluciju te supresiju koštane srži zbog uremije i učestalih infekcija. (1) Čak i uz transfuziju, teško je održati koncentraciju hemoglobina veću od 9 g/dL. Primjenom eritropoetina anemija se djelomično ispravlja. Kao odgovor na smanjeni kapacitet prijenosa kisika, povisuju se i vrijednosti 2,3 difosfoglicerata, enzima koji pospješuje otpuštanje kisika s hemoglobina. Kod bolesnika sa završnim stadijem KBB oštećena je i funkcija leukocita i trombocita, što se klinički manifestira kao produljeno vrijeme krvarenja i povećana osjetljivost na infekcije. Većina bolesnika ima sniženu aktivnost trombocitnog čimbenika III, kao i smanjenu agregaciju trombocita. (1,3)

Zbog smanjenog kapaciteta za prijenos kisika, povećava se minutni volumen srca kako bi se održala doprema kisika u tkiva. Retencija natrija te poremećaj u sustavu renin-angiotenzin dovode do porasta sistemskog tlaka. Hipertrofija lijevog ventrikula uobičajeni je nalaz kod bolesnika sa završnim stadijem KBB (ZSKBB), kao i ubrzani razvoj periferne vaskularne bolesti odnosno koronarne bolesti. Bolesnici sa ZSKBB ubrzano gube tkivne proteine i razvijaju hipoalbuminemiju i protinsko-energetsku pothranjenost. (1,3)

Metabolički poremećaji uključuju hiperkalemiju, hiperfosfatemiju, hipokalcemiju, hipermagnezemiju, hiperuricemiju te hipoalbuminemiju. Retencija vode i natrija može dovesti do pogoršanja hiponatrijemije i opterećenja izvanstaničnog prostora tekućinom. Hiperkalemija je najsmrtonosnija komplikacija zbog posljedičnih kardijalnih komplikacija. (1) Hiperfosfatemija je posljedica smanjenog izlučivanja fosfata u KBB. Nakupljeni fosfati stimuliraju sintezu paratiroidnog hormona uz istodobno vezanje s kalcijem čime smanjuju koncentraciju ioniziranog kalcija. Nastala hipokalcemija dodatno potiče sintezu i lučenje paratiroidnog hormona. Sekundarni hiperparatiroidizam, smanjena razina vitamina D, metabolička acidoza te gubitak kalcija putem crijeva mogu dovesti do bubrežne osteodistrofije uz pojavu patoloških fraktura i izvanakoštanih kalcifikacija od kojih su klinički najznačajnije vaskularne kalcifikacije zbog povećanja smrtnosti od srčanožilnih bolesti. (10)

Intolerancija glukoze karakteristična je za ZSKBB i smatra se posljedicom periferne rezistencije na inzulin, te stoga takvi bolesnici loše podnose veliko opterećenje glukozom. Poremećaj u metabolizmu lipida dovodi do hipertrigliceridemije i vjerojatno doprinosi ubrzanoj aterosklerozi kod bolesnika sa ZSKBB. (1,3)

Završni stadij kronične bubrežne bolesti obilježen je različitim prokoagulantnim odstupanjima koja dovode do razvoja tromboembolijskih komplikacija uz istodobno poremećenu funkciju trombocita s posljedičnim porastom rizika za nastanak krvarenja. (1,3)

1.2.4 Dijagnostika

Za dijagnozu kronične bubrežne bolesti važni su anamnestički podaci o postojanju simptoma u smislu opće slabosti, malaksalosti, poliurije, nikturije i žeđi dulje od 3 - 6 mjeseci, postojanje bolesti koje mogu dovesti do kronične bubrežne bolesti te podaci o prethodnim bolestima bubrega kao i uzimanju nefrotoksičnih lijekova. Uz to zabilježena anemija i hiperfosfatemija uz hipokalcemiju u laboratorijskim nalazima mogu upućivati na kroničnu

bubrežnu bolest. Potrebno je detaljnim kliničkim pregledom i obradom utvrditi postoje li drugi klinički pokazatelji koji mogu ukazivati na KBB u smislu hipertenzije, promjena na koži, edema, periferne neuropatije, osteodistrofije i drugo. Ultrazvučnom ili radiološkom pretragom može se utvrditi veličina bubrega te postojanje policistoze ili hidronefroze bubrega. Znatno smanjenje oba bubrega ukazuje na moguću kroničnu bubrežnu bolest. (10)

Veličina glomerularne filtracije u kliničkoj praksi temelji se na mjerenju koncentracije kreatinina u serumu ili plazmi, te određivanju vrijednosti klirensa kreatinina. (4,11,12) Kreatinin je razgradni produkt kreatin-fosfata iz skeletnih mišića koji nastaje spontanom neezinmskom dehidracijom. (12) Brzina stvaranja kreatinina ovisi o ukupnoj mišićnoj masi i tjelesnoj težini, tako da je količina kreatinina koja se stvara svakog dana relativno stalna. (4) Dob i spol imaju veliki utjecaj na brzinu stvaranja kreatinina zbog utjecaja udjela mišićne mase, zbog toga, uz istu veličinu glomerularne filtracije, muškarci imaju veću koncentraciju kreatinina u plazmi od žena, a mlađe osobe veću koncentraciju kreatinina od starijih. Utjecaj na količinu kreatinina u tijelu, odnosno na količinu kreatinina koji se izluči urinom, ima i unos određenih vrsta hrane koje sadrže kreatin i proteine. (11).

Klirens kreatinina može se mjeriti sakupljanjem 24-satnog urina u kojem se određuje količina izlučenog kreatinina. Druga je mogućnost izračunavanje klirensa na osnovi vrijednosti serumske koncentracije kreatinina prema različitim formulama kao što su Cockroft-Gaultovoj formula, MDRD formula (Modification of Diet in Renal Disease) te CKD-EPI formula (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) (3).

Cockroft-Gaultovoj formula dobro pokazuje koliko klirens kreatinina ovisi o dobi:

$$\text{Klirens kreatinina (ml/min)} = (140 - \text{dob}(\text{god.})) \times \text{TT (kg)} / \text{kreatinin u plazmi (mg/dL)} \times 72$$

Za izračunavanje glomerularne filtracije iz serumskog kreatinina u odraslih najčešće se koriste formule *MDRD (Modification of Diet in Renal Disease)* i *CKD-EPI formula (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration)* koje glase:

MDRD (Modification of Diet in Renal Disease):

$$\text{Glomerularna filtracija (ml/min/1,73m}^2\text{)} = 186 \times (\text{kreatinin u serumu, mg/dl})^{-1,154} \times (\text{dob, godine})^{-0,203} \times (0,742 \text{ za ženski spol}) \times (1,212 \text{ za crnce}).$$

CKD-EPI formula (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration): Glomerularna filtracija (ml/min/1,73m²) = $141 \times \min(\text{kreatinin u serumu} / \kappa, 1)^\alpha \times \max(\text{kreatinin u serumu} / \kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{dob}} \times 1.018$ [za žene] $\times 1.159$ [za crnce]

u kojoj je:

κ iznosi 61.9 za žene, i 79.6 muškarce,

α iznosi -0.329 za žene i -0.411 za muškarce,

min označava najmanju vrijednost kreatinina u serumu / κ ili 1,

a max označava najvišu vrijednost kreatinina u serumu / κ or 1.

Ove formule ne sadrže tjelesnu masu kao varijablu jer su standarizirane na površinu tijela (eng. standard body surface area; BSA) koja iznosi 1,73m², što je vrijednost koja je prihvaćena kao prosječna vrijednost površine tijela u odraslih osoba. (14,15)

Od laboratorijskih parametara bilježe se povećane vrijednosti serumske koncentracije ureje i kreatinina, fosfata, mokraćne kiseline i kalija, te hipokalcemija, metabolička acidoza, anemija, produljeno vrijeme krvarenja kao i snižena adhezivnost trombocita. Albuminurija je posljedica povećane propusnosti glomerularnih kapilara i rani znak oštećenja bubrežne funkcije. Dostupne su brojne metode za određivanje albuminurije, no najčešće se koristi omjer albumina/kreatinina određen u „spot“ uzroku urina. Povišenim se smatra omjer albumina/kreatinina $\geq 30\text{mg/g}$. (16,17,18)

Liječenjem se može usporiti daljnje napredovanje kronične bubrežne bolesti, a podrazumijeva liječenje sustavne i intraglomerularne hipertenzije, smanjenje proteinurije ACE inhibitorima odnosno inhibitorima receptora angiotenzina II kao i smanjenim unosom proteina hranom, te liječenje anemije, hiperlipoproteinemije i metaboličke acidoze. (10,19)

1.3 Nadomještanje bubrežne funkcije

Završni stadij kronične bubrežne bolesti liječi se nadomještanjem bubrežne funkcije hemodijalizom, peritonejskom dijalizom ili transplantacijom bubrega.

1.3.1 Hemodijaliza

Hemodijalizom se iz krvi odstranjuju razgradni proizvodi metabolizma, te višak vode i elektrolita kod bolesnika u ZSKBB. Provodi se uspostavom izvantjelesnog krvotoka kroz umjetni bubreg (dijalizator) uz pomoć krvne pumpe. Temeljni fizikalni proces hemodijalize je difuzija – kretanje molekula iz otopine s većom koncentracijom kroz polupropusnu membranu u otopinu u kojoj se nalaze u manjoj koncentraciji, uz preduvjet da molekule mogu proći kroz pore u membrani. Ovisi, između ostalog, o koncentracijskom gradijentu tvari s obje strane polupropusne membrane, veličini molekula u odnosu na membranske pore, brzini kretanja molekula odnosno brzini protoka krvi i dijalizata, te građi membrane dijalizatora. Krv se iz cirkulacije odvodi krvnim linijama kroz dijalizator te se potom vraća u cirkulaciju. Potrebno je uspostaviti krvožilni pristup kojim će osigurati protok od 200 – 400 ml krvi u minuti. Kod kroničnih bolesnika koristi se trajni krvožilni pristup u vidu arteriovenske fistule koja podrazumijeva spoj arterije i vene na podlaktici, odnosno centralni venski kateter kada nije moguće konstruirati arteriovensku fistulu. Kapilare dijalizatora građene su od polupropusne membrane, čija građa i debljina uvjetuju njezinu sposobnost popuštanja otopina i vode. Za provođenje hemodijalize potreban je koncentrat za dijalizu te voda očišćena od suvišnih elektrolita, organskih tvari i endotoksina. Koncentrat za hemodijalizu sadrži otopinu bikarbonata i elektrolita, te se u aparatu za hemodijalizu miješa s prethodno očišćenom vodom, kako bi se dobila dijalizna otopina željene koncentracije. Suvremeni centri za dijalizu imaju postrojenja za centralnu primjenu ultračistog dijalizata koji se potom razvodi sustavom crpki do svakog pojedinog aparata za dijalizu. Dijalizna otopina po sastavu je slična plazmi, no koncentracija pojedinih sastojaka je niža, dok neke tvari niti ne sadrži. Dijalizator se sastoji od 2 odjeljka s tekućinom koji su građeni od kapilarnih cijevi ili ploča s polupropusnim membranama. Krv u prvom odjeljku protiče duž jedne strane polupropusne membrane, dok dijalizna otopina teče duž druge strane membrane u suprotnom smjeru, u odvojenom odjeljku. Odjeljak s dijalizatom nalazi se pod negativnim tlakom u odnosu na odjeljak krvi i većeg je osmolaliteta kako bi se onemogućila filtraciju dijalizata u krvotok i uklonio višak tekućine iz pacijenta. Prolaskom krvi kroz dijalizator uklanjaju se tvari, koje mogu proći kroz pore polupropusne membrane iz plazme u otopinu za dijalizu, procesom difuzije. Kako bi se spriječilo zgrušavanje krvi u izvantjelesnom optoku tijekom hemodijalize, provodi se heparinizacija. Kronični program hemodijalize prosječnog je trajanja četiri sata, tri puta tjedno. (10,20)

1.3.2 Peritonejska dijaliza

Peritonejska dijaliza je metoda nadomještanja bubrežne funkcije koja koristi peritoneum kao prirodnu polupropusnu membranu za izmjenu tvari. Peritoneum prekriva organe u trbušnoj šupljini i predstavlja biološku membranu kroz čije pore mogu proći molekule molekularne mase do 100 000 daltona iz krvnih kapila u trbušnu šupljinu i obratno ovisno o koncentracijskom gradijentu. Sadrži brojne nabore te je stoga velike površine kroz koju se može odvijati izmjena tvari.

Postupak podrazumijeva postavljanje peritonejskog katetera u trbušnu šupljinu. Kroz kateter se u peritonealnu šupljinu ulijeva otopina za peritonejsku dijalizu koja sadrži elektrolite i glukozu. Razgradne tvari metabolizma i elektroliti koje je potrebno ukloniti iz organizma prelaze iz krvi u dijalizat procesom difuzije niz koncentracijski gradijent, dok se odstranjivanje viška vode iz organizma odvija procesom osmoze ovisno o koncentraciji osmotski aktivne tvari u dijalizatu. Peritonejska dijaliza je manje fiziološki stresna od hemodijalize, ne zahtijeva vaskularni pristup i može se provoditi u kućnim uvjetima, te time bolesnicima omogućuje mnogo veću fleksibilnost. Peritonejska dijaliza može se provoditi ručno ili uz pomoć aparata. Kontinuirana ambulantna peritonejska dijaliza (CAPD) podrazumijeva izmjenu otopina za dijalizu u trbušnoj šupljini 3-4 puta dnevno uz pomoć sile teže, dok se automatizirana peritonejska dijaliza (APD) provodi uz pomoć aparata, najčešće tijekom noći. Peritonejska dijaliza zahtjeva veću uključenost bolesnika nego pri postupku hemodijalize te pridržavanje sterilnih tehnika. Pri odabiru bolesnika za peritonejsku dijalizu važna je motiviranost za samostalno provođenje postupka, te uz to ne smiju imati priraslice u trbušnoj šupljini kao posljedicu prethodnih kirurških zahvata, kao niti upalne ili maligne bolesti crijeva. U relativne kontraindikacije spadaju trbušne kile, psihološki problemi i socijalne prilike bolesnika, progresivne neurološke bolesti, bolesti kretanja i artritis, kronična opstruktivna bolest pluća te divertikuloza debelog crijeva. Među najčešće komplikacije peritonejske dijalize spada peritonitis. (10,20)

1.3.3 Transplantacija bubrega

Transplantacija je metoda izbora u liječenju bolesnika sa ZSKBB. Karakterizirana je boljim preživljavanjem bolesnika, boljom kvalitetom života te uštedom za društvo u cjelini. Zahtijeva doživotno uzimanje imunosupresivne terapije uz redovite kontrole. (10)

Uspješnost transplantacije uvelike ovisi o dobroj procjeni i odabiru primatelja. Apsolutne kontraindikacije za transplantaciju bubrega u primatelja uključuju kontraindikacije za opću anesteziju ili kirurški zahtvat, odbijanje transplantacije od strane primatelja, aktivne infekcije, pridružene bolesti u smislu metastatske zloćudne bolesti, kardijalne dekompenzacije, kronične respiratorne insuficijencije te uznapredovale koronarne ili cerebrovaskularne bolesti. U relativne kontraindikacije spadaju aktivni virusni hepatitis, neregulirana hipertenzija, psihičke bolesti u smislu psihoze, alkoholizma ili narkomanije kao i mentalna retardacija, te veći perikardijalni ili pleuralni izljevi odnosno ascites. Prije uključivanja potencijalnog primatelja na listu čekanja za transplantaciju s umrlog darovatelja odnosno prije transplantacije sa živog darovatelja, potrebno je izliječiti postojeće pridružene bolesti ili žarišta. (10,21)

Transplantacija bubrega može biti sa živog, srodnog ili nesrodnog darovatelja, odnosno s umrle osobe. Živi darovatelj mora biti psihički i tjelesno zdrav, te se najčešće isključuju darovatelji stariji od 70 godina kao i oni sa sistemskim bolestima koje uključuju zloćudne bolesti, težu hipertenziju, nekontrolirane infekcije, pozitivne markere na hepatitis B, C i HIV, šećernu bolest ili bolesti vezivnog tkiva te prethodnu bubrežnu bolest ili zatajenje bubrega, kao i psihičku nespremnost. Transplantacije sa živog darovatelja, srodnog ili nesrodnog, obuhvaćaju 10-50% transplantacija bubrega ovisno o razvijenosti programa transplantacije s umrlih darovatelja u nekoj zemlji. (10,21)

Više od polovice doniranih bubrega potiče od prethodno zdravih osoba kod kojih je utvrđena moždana smrt. Oko trećine bubrega dolazi od graničnih ili marginalnih darovatelja. (21) Razlog tome je nedovoljan broj organa dostupnih za transplantaciju što je dovelo do odabira darovatelja prema proširenim kriterijima. Takvi organi mogu biti transplantirani, no zbog visoke dobi darovatelja ili drugih kliničkih karakteristika može se očekivati povećani rizik lošije funkcije i kraćeg preživljenja transplantiranog bubrega. (22) Proširenim kriterijima smatra se dob darovatelja veća od 60 godina ili veća od 50 godina uz prisutne dvije od slijedećih karakteristika: arterijska hipertenzija, moždani udar kao uzrok smrti, te serumski kreatinin veći od 1,5 mg/dl (137 μ mol/L). (21) Za što bolju procjenu bubrega kod graničnog darovatelja potrebno je učiniti biopsiju bubrega i patohistološku analizu. Analizira se stupanj glomeruloskleroze, intersticijske fibroze, atrofije tubula te promjene na krvnim žilama. Cilj je izbjeći transplantaciju organa kod kojeg se može očekivati loša i nedovoljna funkcija ili donijeti odluku o transplantaciji oba bubrega jednom primatelju. (10)

S kirurške strane važnu ulogu ima poznavanje uzroka koji je doveo do zatajenja bubrežne funkcije, kako bi se utvrdile potrebne pretrage za procjenu kliničkog stanja primatelja. Važno je procijeniti stanje krvožilnog sustava (ubrzana ateroskleroza; trombozirane krvne žile), uzeti u obzir anamnezu ranije preboljele zloćudne bolesti, pretilost, postojeće vaskularne pristupe za dijalizu, ranije zahvate u maloj zdjelici i drugo. (23)

Bubreg se najčešće kirurškim putem transplantira u zdjelicu ekstraperitonealno, dok se renalna arterija i vena anastomoziraju na vanjsku ilijačnu arteriju, odnosno venu. Ukoliko su anatomske uvjeti takvi da stavljanje bubrega u zdjelicu nije moguće, može se učiniti i ortotopična transplantacija. Vađenje bubrega primatelja obično nije potrebno osim ako se radi o infekciji. Uobičajeno je stavljanje desnog bubrega lijevo i obratno jer se tako, zbog anatomske obilježja (pijelon smješten sprijeda), urološke komplikacije lakše mogu riješiti kirurškim putem. (23)

Odbacivanje transplantata u roku od nekoliko sati nakon zahvata smatra se hiperakutnom reakcijom odbacivanja. Nastaje zbog ranije stvorenih tkivnih aloantitijela na specifične antigene darovatelja i ima za posljedicu gubitak transplantata. Akutna reakcija odbacivanja može se javiti u prvom tjednu nakon zahvata ili u bilo kojem trenutku nakon transplantacije. Posredovana je antitijelima i stanicama, a dokazuje se biopsijom transplantiranog bubrega. Liječi se visokim dozama steroida ili primjenom antitimocitnih globulina. Kroničnom nefropatijom presatka smatra se postupan ispad funkcije transplantiranog bubrega koji se prati tijekom duljeg vremenskog razdoblja. Podrazumijeva poremećenu bubrežnu funkciju kroz više mjeseci ili godina nakon uspješne transplantacije, dok učinkovitog liječenja nema. Dijagnoza se postavlja biopsijom bubrega nakon što su isključene druge bolesti koje mogu uzrokovati gubitak funkcije. (10)

1.3.4 Komplikacije

Komplikacije nakon transplantacije bubrega mogu se podijeliti na kirurške komplikacije i komplikacije kao posljedica imunosupresijske terapije. (10,23)

Kirurške komplikacije uključuju vaskularne i urološke komplikacije, dok se u komplikacije dugotrajne imunosupresijske terapije ubrajaju infekcije, malignomi, dislipidemije, osteopenija, bolesti jetre i hipertenzija.(10,23)

Vaskularne komplikacije uključuju krvarenje, trombozu renalne arterije i vene, stenozu renalne arterije, limfokelu te arterijsko-vensku fistulu i pseudoaneurizmu. (10,23)

Krvarenje se kao komplikacija obično javlja u ranom postoperativnom razdoblju. Ponovna kirurška intervencija potrebna je ako krvarenje svojom veličinom ili položajem ugrožava transplantirani bubreg odnosno bolesnika. (23)

Tromboza renalne arterije ili vene je rijetka komplikacija zbog koje najčešće dolazi do gubitka presatka u ranom postoperativnom razdoblju. U kliničkoj slici bilježi se nagli prekid mokrenja, odnosno kod tromboze vene bolnost presađenog bubrega. Liječi se hitnim kirurškim zahvatom, načešće uz odstranjenje transplantiranog bubrega. (23)

Stenoza bubrežne arterije najčešće se javlja od 3 mjeseca do 2 godine nakon transplantacije. Čest je uzrok posttransplantacijske hipertenzije, a može biti i uzrok slabljenja funkcije presatka. Stenoza može nastati u području anastomoze, kao i proksimalno ili distalno od nje. Liječi se endovaskularnom odnosno kirurškom intervencijom. Urološke komplikacije podrazumijevaju opstrukciju u bilo kojem dijelu kanalnog sustava transplantiranog bubrega te curenje urina. Opstrukcija se najčešće javlja unutar prva 3 mjeseca od operativnog zahvata i to na mjestu anastomoze uretera i mokraćnog mjehura. (23)

U ranom postoperativnom razdoblju prevladavaju bakterijske infekcije, dok su u kasnijem razdoblju zastupljene pretežno virusne infekcije i to najčešće citomegalovirusi, i virusi hepatitisa B i C, odnosno gljivične infekcije. Imunosupresivna terapija povezana je i s povećanim rizikom pojave malignoma, posebice limfoma. (23).

1.3.5 Imunosupresivi

Imunosupresivi su lijekovi koji se koriste u suzbijanju odbacivanja transplantata. Njihovo djelovanje, između ostalog, obuhvaća inhibiciju stvaranja ili djelovanja IL-2 (ciklosporin, takrolimus), inhibiciju ekspresije gena za citokine (kortikosteroidi), te inhibiciju sinteze purina ili pirimidina (mikofenolat mofetil, azatioprin). (24) Primjenjuju se kao induksijska terapija u perioperativnom razdoblju nakon čega se nastavlja trajna terapija održavanja. (23)

U početku je potrebna intenzivna imunosupresivna terapija kako bi se spriječile epizode akutnog odbacivanja, dok se kasnije imunosupresija održava na nižim vrijednostima u cilju smanjenja rizika od infekcije i malignoma. U odabiru lijekova potrebno je uzeti u obzir

procjenu imunološkog rizika, popratne bolesti primatelja, učinkovitost i sigurnost terapije kao i financijski učinak. Imunosupresivna terapija ima ključnu ulogu u uspješnosti transplantacije. (23,25) Temeljna pretpostavka u primjeni imunosupresijske terapije je korištenje više lijekova s različitim mehanizmom djelovanja. Kombiniranjem nekoliko različitih imunosupresivnih lijekova omogućuje se djelovanje na više ključnih koraka u procesu replikacije T-stanica i to pri nižim dozama svakog pojedinačnog lijeka, čime se smanjuje toksičnost samih lijekova. Imunosupresivni protokoli razlikuju se između pojedinih transplantacijskih centara, no najčešće uključuju inhibitor kalcineurina uz još jedan imunosupresiv, s ili bez kortikosteroida. (26) U usporedbi s općom populacijom, bolesnici s transplantiranim bubregom imaju veću stopu smrtnosti. Novi imunosupresivni lijekovi kratkotrajno su značajno produljili preživljenje bolesnika i do 95 % u razdoblju od 1-2 godine nakon transplantacije bubrega, no ti se učinci moraju potvrditi u dugoročnom praćenju. Srčanožilne bolesti najčešći su uzrok smrti u bolesnika s transplantiranim bubregom, i premda se ne mogu izravno povezati sa srčanožilnim događajima, imunosupresivi imaju različite učinke na tradicionalne čimbenike rizika. Kortikosteroidi i ciklosporin su lijekovi s najjačim negativnim učinkom na povećanje tjelesne težine, tlaka i lipida. Takrolimus povećava rizik novonastalog dijabetes melitusa, dok sirolimus i everolimus imaju najveći učinak na hiperlipidemiju u poslijetransplantacijskom razdoblju. Prilagodba imunosupresijske terapije može poboljšati kardiovaskularni profil bolesnika, no mali je broj dokaza koji se mogu povezati s korisnim učincima promjene imunosupresijske terapije na pojavu srčanožilnih bolesti. (27)

S indukcijom terapijom započinje se u perioperativnom razdoblju tj. neposredno prije ili tijekom transplantacije te nastavlja u prvom postoperacijskom tjednu. Podrazumijeva primjenu monoklonalnih ili poliklonalnih protutijela s ciljem jačeg imunosupresivnog djelovanja odnosno smanjenja stope akutnih odbacivanja. U poliklonalna protutijela ubrajamo ATG i timoglobulin, te ATGAM. Imaju dug poluvijek života od nekoliko tjedana, primjenjuju se putem centralnog venskog katetera tijekom najmanje 6 sati uz premedikaciju kortikosteroidima, paracetamolom i antihistaminikom te uz obaveznu profilaksu CMV, oralne kandidijaze i *Pneumocystis jirovecii* infekcije. Poliklonalna protutijela primjenjuju se kod bolesnika s visokim imunološkim rizikom. Monoklonalna protutijela dijele se na deplecijska i nedeplecijska. Deplecijska monoklonalna protutijela obuhvaćaju alemtuzumab i OKT3. Alemtuzumab se ne preporučuje za rutinsku kliničku primjenu, dok se OKT 3 primjenjuje rijetko zbog toksičnosti i visoke cijene, te se više ne proizvodi. Nedeplecijska monoklonalna

protutijela uključuju baziliksimumab i daklizumab. Baziliksimumab se primjenjuje na dan zahvata i četvrti posttransplantacijski dan u dozi do 20 mg dva puta dnevno. Primjena lijeka nije povezana sa značajnijim nuspojavama, te je nakon 6 mjeseci zabilježen značajno manji broj odbacivanja dokazanih biopsijom. Proizvodnja daklizumaba je obustavljena zbog interesa farmaceutske kompanije u drugim područjima medicine. (23)

Terapija održavanja sastoji se najčešće od kortikosteroida u niskim dozama u kombinaciji s dva od slijedećih lijekova: inhibitor kalcineurina (ciklosporin ili takrolimus), mikofenolat mofetil, ili mTOR inhibitor (sirolimus ili everolimus). Postoje različiti imunosupresijski protokoli. (23,25)

Kortikosteroidi (glukokortikoidi) se koriste u prevenciji i liječenju odbacivanja transplantata od ranih 1960-tih. Imaju višestruke učinke što uključuje protuupalno i imunosupresijsko djelovanje.¹¹ (Zhang, Open Journal of clinical transplantation, 2013.) Nakon ulaska u stanicu, vežu se za citoplazmatske receptore i stvaraju komplekse koji se potom pomiču u staničnu jezgru i vežu za odgovarajuće elemente DNA. Rezultat je prevencija ili indukcija transkripcije određenih gena.¹⁰ (Rang: Farmakologija, 2003.) Dolazi do inhibicije stvaranja različitih citokina (IL-1, 2, 3, 6, TNF- α , gamma-interferon) (25). Osim inhibicije stvaranja citokina i imunomodulatora, kortikosteroidi djeluju na stabilizaciju lizosomske membrane, uzrokuju otežanu migraciju leukocita i dovode do smanjenja broja imunskih stanica. (23).

Postoji više kortikosteroidnih lijekova koji se međusobno razlikuju u načinu primjene, duljini djelovanja, doziranju, jačini protuupalnog učinka i drugo. Hidrokortizon je lijek izbora u supstitucijskoj terapiji, dok se u ostalim indikacijama primjenjuju drugi preparati koji imaju minimalno mineralokortikoidno djelovanje ili ga uopće nemaju. U primjeni su prednison (Decortin), metilprednisolon (Medrol, SoluMedrol) i deksametazon. Njihov ekvivalent doza iznosi kako slijedi: prednison/prednisolon 5 mg, metilprednisolon 4 mg i deksametazon 0,75 mg. Prednison je inaktivan oblik lijeka sve dok se u organizmu ne prevede u prednisolon.(24). Srednjedugog su djelovanja, poluvijek u plazmi je oko 60 minuta za prednison i 200 minuta za prednisolon, metaboliziraju se u jetri i izlučuju urinom. (23)

Visoke doze glukokortikoida mogu se dati u perioperativnom razdoblju kao induksijska terapija (metil-prednisolon 250 to 500 mg iv.), nakon čega se nastavlja imunosupresijska terapija oralnim prednisonom (30 to 60 mg/dan). Lijek se titrira u razdoblju od 1 do 3 mjeseca dok se ne postigne doza održavanja od 5-10 mg/dan.¹¹ (25) Kortikosteroidi u visokim dozama (pulsne doze) čine i prvu liniju terapije kod akutnog odbacivanja transplantata. (23)

Nuspojave kortikosteroida uključuju povećanje tjelesne mase, kataraktu, osteoporozu, prijelome, aseptičku nekrozu, intoleranciju glukoze, hiperlipidemiju te hipertenziju. (25)

Mikofenolat

Mikofenolat inhibira sintezu purina te posljedično smanjuje proliferaciju T i B limfocita. Učinak je vezan uz inhibiciju enzima inozin monofosfat dehidrogenaze koji sudjeluje u sintezi purina. Ostala djelovanja uključuju apoptozu aktiviranih limfocita T te inhibiciju proizvodnje protutijela od aktiviranih limfocita B. Kako proliferacija limfocita T i B ovisi o sintezi purina, za razliku od drugih stanica koje mogu koristiti i alternativne puteve, mikofenolat mofetil ima jači citotoksični učinak na limfocite nego na druge stanice. (CellCept SmPC; EMA; www.ema.europa.eu). Postoje dva oblika mikofenolata i to: mikofenolat mofetil i mikofenolat natrij. Mikofenolat mofetil se dobro resorbira nakon peroralne primjene. Aktivni metabolit je mikofenolna kiselina. Uobičajeno se primjenjuje u dozi od 2 g/dan, no mogu se dati i više doze (do 3 g/dan) uz veću mogućnost nuspojava. Nuspojave mikofenolata uključuju gastrointestinalne nuspojave u smislu proljeva, grčeva, mučnine i povraćanja koje su klasificirane kao vrlo česte (28), i ne zahtijevaju prekid terapije. Primjena je povezana s većim rizikom oportunističkih infekcija, te s pojavom citopenije i to anemije, leukopenije i trombocitopenije. Zabilježen je i teratogeni učinak mikofenolata. (23,25)

Azatioprin

Azatioprin je od ranih 1960.-tih u primjeni kao imunosupresivni lijek. Interferira sa sintezom DNA odnosno purinskih nukleotida što ima za posljedicu inhibiciju proliferacije limfocita. Osim toga dovodi do apoptoze aktiviranih limfocita T. Uobičajeno doziranje je 1,5-2 mg/kg jednom dnevno. Najčešće nuspojave uključuju depresiju koštane srži: leukopeniju i trombocitopeniju, gastrointestinalne smetnje u vidu mučnine i povraćanja, pankreatitis i porast jetrenih enzima, te povećanu sklonost infekcijama uz moći učinak i na pojavu malignoma. Mikofenolat je u velikoj mjeri zamijenio azatioprin u terapijskim protokolima. (23,25)

Inhibitori kalcineurina: ciklosporin i takrolimus

U inhibitore kalcineurina ubrajamo ciklosporin i takrolimus. Strukturno su različiti, no imaju sličan mehanizam djelovanja. Čine temelj suvremene imunosupresivne terapije. Ciklosporin je uveden u kliničku primjenu od 1978. godine kod primatelja solidnih organa, čime je značajno smanjena učestalost ranog odbacivanja i poboljšano rano preživljenje presatka. Radi

se o malom cikličkom peptidu koji slobodno prolazi kroz staničnu membranu. Veže se za intracelularni protein ciklofilin i nastaje kompleks koji inhibira kalcineurin fosfatazu sprječavajući stvaranje citokina (IL-2). Ciklosporin se može primijeniti intravenski ili peroralno. Intravenskim putem primjenjuje se prvih nekoliko dana nakon transplantacije i to u dozi od 3 mg na kilogram tjelesne težine infuzijom tijekom 12-24 sata. Potrebno je što prije započeti s peroralnom primjenom s početnom dozom od 5-8 mg/kg podijeljeno u dvije dnevne doze. Lijek se u obliku mikroemulzije miješa s vodom te ima bolju bioraspoloživost nakon oralne primjene, no apsorpcija je varijabilna. (25) Kako se radi o lijeku uske terapijske širine, zbog prilagođavanja doze, potrebno je redovito pratiti koncentraciju lijeka u krvi i provoditi klinički nadzor praćenja nuspojava. Mjeri se koncentracija ciklosporina u krvi 2 sata nakon primjene (tzv. C₂ koncentracija) ili češće, C₀ (prije uzimanja lijeka). Ciljne vrijednosti razine ciklosporina u krvi ovise o vremenu nakon transplantacije i imunosupresijskom protokolu. Uobičajene ciljne vrijednosti tijekom prvog i drugog mjeseca nakon transplantacije iznose 200-300 ng/mL. U razdoblju od 2. - 6. mjeseca ciljne vrijednosti iznose 150-200 ng/mL, dok se u kasnijem razdoblju od 6. do 12. mjeseca smanjuju na vrijednosti od 100 – 200 ng/mL. Nakon više od 12 mjeseci nakon transplantacije ciljne vrijednosti ciklosporina u krvi iznose 80-150 ng/mL. Nuspojave ciklosporina uključuju akutnu i kroničnu nefrotoksičnost, poremećaj elektrolita (hiperkalijemiju, hipomagnezemiju, hiperuricemiju), trombotičku mikrorangiopatiju, hipertenziju, neurotoksičnost (tremor, nesanicu, glavobolju), hipertrofija gingive, dijabetes nakon transplantacije, hiperlipidemija, sklonost zloćudnim bolestima, hirzutizam i ostalo. (23,25,29)

Takrolimus je odobren za primjenu u transplantaciji bubrega od 1997. godine. (25) Njegova primjena sve je više rasla te je sada osnovni lijek suvremenih imunosupresijskih protokola. Veže se za citoplazmatski FK vezni protein (FKBP; od engl. FK binding protein) stvarajući kompleks koji inhibira kalcineurin fosfatazu snažnije od cikloporina i time sprječava stvaranje citokina (IL-2). Uz to inhibira aktivaciju limfocita T. Kao i ciklosporin, takrolimus ima usku terapijsku širinu što zahtijeva redovito praćenje koncentracije lijeka u krvi. Početna doza iznosi 0,07 do 0,1 mg/kg tjelesne težine podijeljeno u dvije doze. Postoji i pripravak s produljenim oslobađanjem koji omogućuje primjenu u jednoj dnevnoj dozi. Ciljne vrijednosti koncentracije u prvih 6 mjeseci najčešće se drže od 8-12 ng/mL, od 6. do 12. mjeseca u razini od 6-10 ng/mL, a nakon više od 12 mjeseci od transplantacije 5-8 ng/mL. Nuspojave takrolimusa slične su onima kod ciklosporina vezano uz akutnu i kroničnu nefrotoksičnost, trombotičku mikrorangiopatiju i poremećaj elektrolita, no takrolimus prati

manja učestalost hipertenzije, hiperlipidemije, kozmetičkih promjena kože i hipertrofija gingive. Učestalija je pojava neurotoksičnosti i novonastalog dijabetesa nakon transplantacije (NODAT). (23,25,29)

mTOR inhibitori: sirolimus i everolimus

Sirolimus je odobren za primjenu u transplantaciji bubrega od 1999. godine. (25) Radi se o makrolidnom antibiotiku koji nastaje fermentacijom bakterije *Streptomyces hygroscopicus*. Djeluje na T limfocite sprječavajući njihovu proliferaciju. mTOR kompleks je proteinaza koja ima ključnu ulogu u signalnoj regulaciji unutarstaničnog ciklusa tako da djeluje kao nosač drugih proteinskih molekula. Uključen je u ciklus staničnog rasta, proizvodnju staničnih proteina te regulaciju stanične morfologije i citoskeleta. Nakon ulaska u stanicu mTOR inhibitor se veže za citoplazmatski protein iz grupe imunofilina. Nastali kompleks inhibira TORC1 i time dolazi do blokade staničnog metabolizma, rasta i proliferacije. Druga djelovanja mTOR inhibitora uključuju smanjivanje migracijske sposobnosti neutrofila, kočenje umnožavanja fibroblasta i glatkih mišićnih stanica, te antitumorski učinak. Sirolimus dolazi u obliku tableta ili oralne suspenzije. Vršne koncentracije postiže za 1-2 sata, dok mu vrijeme poluživota iznosi 60 sati. Everolimus je derivat sirolimusa. Dolazi u obliku tableta, vršne koncentracije postiže za oko 3 sata, dok mu je vrijeme poluživota 16-19 sati. Bolje je topiv u vodi od sirolimusa zbog čega mu je veća bioraspoloživost. Metaboliziraju se u jetri putem jetrenih izoenzima citokroma. Postoji velika varijabilnost u farmakokinetici lijeka zbog čega je teško prilagoditi individualnu terapijsku dozu potrebnu za postizanje imunosupresijskog učinka. Zabilježena je i interakcija s inhibitorima kalcineurina zbog čega je potrebno prilagoditi dozu. Nuspojave mTOR inhibitora uključuju porast proteinurije, pojavu osipa po šakama i prstima ruku, kožne promjene nalik na akne te ulceracije na sluznici usne šupljine, usporeno cijeljenje rana, hiperkolesterolemiju zbog interakcije s metabolizmom lipida, te češće stvaranje limfokela. U najteže nuspojave spadaju pneumonitis i trombocitopenija, leukopenija i anemija. Ne izazivaju nefrotoksičnost, neurotoksičnost, hiperplaziju desni niti rezistentnu hipertenziju. Većina nuspojava ovisna je o koncentraciji lijeka. Preporučuje se njihova primjena u terapiji održavanja kod bolesnika sa stabilnom bubrežnom funkcijom. (23,25,29) U novije se vrijeme koristi kombinacija mTOR inhibitora i inhibitora kalcineurina od same transplantacije, ali uz niže ciljne koncentracije lijeka. (23,25,29) Sirolimus i everolimus razvijeni su kako bi se primjenjivali uz ciklosporin, no primjena u toj kombinaciji povećava nefrotoksičnost, učestalost hemolitičko-uremijskog sindroma te pojavu hipertenzije. Stoga je sirolimus primjenjivan u kombinaciji s

takrolimusom, no kontrolirana klinička ispitivanja pokazala su kako istodobna primjena sirolimusa i takrolimusa dovodi do češće disfunkcije bubrega i hipertenzije nego kombinacija takrolimusa i mikofenolata. To ukazuje na činjenicu da sirolimus pojačava nefrotoksičnost takrolimusa. (29,30) Neka istraživanja ukazuju na mogućnost da sirolimus i everolimu imaju zaštitni učinak na arterije. Zabilježeno je kako prisutnost mTOR inhibitora u samom stentu ima inhibicijski učinak na ponovnu stenozu, dok istodobna primjena mTOR inhibitora s inhibitorima kalcineurina smanjuje učestalost koronarne bolesti grafta nakon transplantacije srca. (29, 31)

1.4 Bolesnici s transplantiranim bubregom i srčanožilne bolesti

Srčanožilne bolesti vodeći su uzrok smrti u bolesnika s transplantiranim bubregom, stoga je pozornost sve više usmjerena na moguće dugoročno štetne učinke imunosupresivnih lijekova koji se koriste u terapiji odbacivanja. Dobra kontrola rizičnih čimbenika za nastanak srčanožilnih bolesti od iznimne je važnosti tijekom dugotrajnog liječenja bolesnika s transplantiranim bubregom. Optimiziranje imunosupresijske terapije podrazumijeva dobru ravnotežu između učinkovitosti i sigurnosti dugotrajne primjene. (32)

Srčanožilne bolesti (CVD) uključuju kongestivno srčano zatajenje, koronarnu bolest, cerebrovaskularne, odnosno periferne vaskularne bolesti. Srčana smrt u bolesnika s transplantiranim bubregom i do je 10 puta viša nego u općoj populaciji, dok je godišnja stopa smrtonosnih odnosno ne-smrtonosnih srčanožilnih događaja 50 puta viša nego u općoj populaciji. Povišeni rizik za nastanka srčanožilnih bolesti u bolesnika s transplaniranim bubregom vjerojatno je posljedica međusobnog djelovanja bubrežne funkcije, dodatnih srčanih čimbenika rizika i učinka imunosupresivnih lijekova, posebice uzevši u obzir činjenicu da je bubrežna funkcija u bolesnika s transplantiranim bubregom i nadalje snižena u odnosu na normalnu populaciju. (32) Najčešći uzroci srčane smrti uključuju srčani zastoj (45%), infarkt miokarda (31%) i aritmije (13%). Iznenađne srčane smrti češće su posljedica aritmija, više nego srčanog infarkta zbog postojećih aterosklerotskih promjena na koronarnim arterijama, što ukazuje na činjenicu da čimbenici poput hipertenzije i dijabetesa samo djelomično doprinose povećanom riziku od srčanožilnih bolesti. (33)

Cerebrovaskularni događaji podrazumijevaju ishemijski i hemoragijski moždani udar te predstavljaju značajan uzrok smrtnosti transplantiranih bolesnika od oko 4,5%. Najčešći je

uzrok smrti ishemijski moždani udar (89%), dok se u ostale uzroke ubrajaju hemoragijski moždani udar i subarahnoidalna krvarenja. (33)

Čimbenici rizika za nastanak srčanožilnih bolesti kod bolesnika s transplantiranim bubregom mogu se podijeliti u tradicionalne i netradicionalne rizične čimbenike. Tradicionalni čimbenici rizika obuhvaćaju hipertenziju, dislipidemiju, dijabetes, sniženje bubrežne funkcije, i hipertrofiju lijeve klijetke, te čimbenike rizika vezane uz način života poput pušenja i nedostatka fizičke aktivnosti (33). Poznati su i netradicionalni čimbenici rizika koji imaju utjecaj na pobol i smrtnost kod bolesnika s transplantiranim bubregom, a uključuju imunosupresivsku terapiju, anemiju, upalu i proteinuriju.

Standardni imunosupresivi koji se koriste u transplantaciji bubrega, posebice kalcineurinski inhibitori i kortikosteroidi, su neselektivni lijekovi koji djeluju na signalne puteve kod različitih tipova stanica, dovodeći do nefrotoksičnih, kardiovaskularnih i metaboličkih nuspojava koje doprinose povećanom riziku za razvoj srčanožilnih bolesti kod transplantiranih bolesnika. (32)

1.4.1 Tradicionalni čimbenici rizika za razvoj srčanožilnih bolesti

Snižena bubrežna funkcija snažan je čimbenik rizika za razvoj srčanožilnih bolesti u općoj populaciji kao i u bolesnika s transplantiranim bubregom. Tijekom vremena kod većine bolesnika s transplantiranim bubregom dolazi do smanjenja funkcije presatka što dugoročno povećava rizik od razvoja srčano žilnih bolesti. (32) Bolesnici sa sniženom glomerularnom filtracijom ($< 44,8 \text{ ml/min/1,73m}^2$) godinu dana nakon transplantacije bubrega, pokazuju značajno viši rizik za nastanak bolesti srca. Klinička ispitivanja pokazala su i značajnu povezanost između razine serumskog kreatinina godinu dana nakon transplantacije i smrtnosti od srčanožilnih bolesti (34).

Snižena bubrežna funkcija dovodi do razvoja hipertenzije, dislipidemije, anemije, hiperglikemije te hipertrofije lijeve klijetke, što su sve poznati rizični čimbenici za razvoj srčanožilnih bolesti. Teško je odvojiti učinke same hipertenzije i snižene bubrežne funkcije; tako snižena bubrežna funkcija dovodi do povećanja volumena, zadržavanja natrija, povišene razine cirkulirajućih vazoaktivnih tvari te učinka na simpatički i renin-angiotensin-aldosteron sustav, čime doprinosi razvoju hipertenzije. Povišene vrijednost krvnog tlaka uzrokuju dodatno oštećenje bubrega i daljnje snižavanje bubrežne funkcije. Uz to, sniženje bubrežne

funkcije i uremija imaju učinak na funkciju lipaza te povećavaju inzulinsku rezistenciju što dovodi do razvoja hiperglikemije. Smanjuju se vrijednosti HDL kolesterola i razvija hipertrigliceridemija. Anemija je također značajno povezana sa sniženom bubrežnom funkcijom nakon transplantacije bubrega, kroz smanjenu sintezu eritropoetina. Anemija je zabilježena u gotovo polovine bolesnika s transplantiranim bubregom i nakon tri godine od transplantacije. (32). Većina bolesnika s transplantiranim bubregom liječena je kalcijneurinskim inhibitorima, ciklosporinom ili takrolimusom. Dobro je poznat nefrotoksični učinak kalcijneurinskih inhibitora kao i činjenica da smanjuju funkciju presatka nakon transplantacije. (32)

Hipertenzija

Povišeni krvni tlak je dobro poznat uzrok za razvoj srčanožilnih bolesti u općoj populaciji. Kod bolesnika s transplantiranim bubregom hipertenzija je česta i javlja se u više od 70% primatelja, dok je kontrola povišenih vrijednosti krvnog tlaka nakon transplantacije loša. Visok sistolički tlak je nezavisni rizični čimbenik povezan s povećanim rizikom smrti od srčanožilnih bolesti u bolesnika s transplantiranim bubregom. (35)

Svakih 10 mmHg porasta vrijednosti sistoličkog tlaka je nezavisno povezan s povišenim rizikom smrti od zatajenja funkcije presatka. (36)

Prema smjernicama „Kidney Disease:Improving Global Outcomes (KDIGO)“ ciljne vrijednosti krvnog tlaka trebale bi biti $\leq 130/80$ mmHg neovisno o prisutnosti proteinurije. (37) United Kingdom Renal Association preporučuje čak i niže vrijednosti krvnog tlaka $\leq 125/75$ mmHg ako je prisutna proteinurija. (38).

Odabir imunosupresiva ima utjecaj i na vrijednost krvnog tlaka. Kalcineurinski inhibitori povezani su razvojem hipertenzije u bolesnika s transplantiranim bubregom te dovode do značajnog porasta krvnog tlaka. Mehanizam koji dovodi do razvoja hipertenzije je složen i uključuje sistemsku i intra-renalnu vazokonstrikciju te zadržavanje natrija. Smatra se da ciklosporin povisuje krvi tlak aktivacijom simpatičkog živčanog sustava i snižavanjem koncentracija snažnih vazodilatatora kao što su prostaglandini i dušični oksid. Prema nekim kliničkim istraživanja zamjena ciklosporina takrolimusom pokazala se učinkovitom kroz sniženje prosječne vrijednosti krvnog tlaka, premda se u konačnici, prema rezultatima meta analiza, nije pokazao koristan učinak. (33).

Dijabetes

Poslije transplantacijski dijabetes ili novonastali dijabetes nakon transplantacije (NODAT) je dobro poznata komplikacija nakon transplantacije burega, te je praćena pogoršanjem funkcije presatka i povećanim pobolom i smrtnošću od srčanožilnih bolesti. (39). Kod bolesnika s transplantiranim bubregom koji se ranije nisu liječili od dijabetesa, pojavnost post-transplantacijskog dijabetesa je u rasponu od 4-25%. Dijabetes se najčešće razvije u ranom post-transplantacijskom razdoblju, te se polovica slučajeva dijagnosticira u prvih 6 mjeseci. Bolesnici s transplantiranim bubregom kod kojih se razvije post-transplantacijski dijabetes imaju povećani rizik za razvoj srčanožilnih bolesti. (33) Bolesnici s prijetransplantacijskim dijabetesom imaju 2-5 puta veći rizik za razvoj srčanožilnih bolesti od transplantiranih bolesnika koji se ranije nisu liječili od dijabetesa. Rizik je sličan i za bolesnike kod kojih se razvije poslijetransplantacijski dijabetes. Novonastali poslijetransplantacijski dijabetes je i rizični čimbenik za gubitak funkcije presatka. (32)

Broji su rizični čimbenici koji doprinose razvoju post-transplantacijskog dijabetesa uključujući visoku životnu dob, pripadnost određenim etničkim skupinama (afroamerikanci, latioamerikanci, južno azijati), pozitivnu obiteljsku anamnezu, visceralnu debljinu, hipomagnezemiju, virusne infekcije (HCV, CMV) te imunosupresivnu terapiju. (33)

Većina najčešće propisivanih imunosupresivnih lijekova ima negativni učinak na metabolizam glukoze što dovodi do smanjene osjetljivosti na inzulin i smanjenog izlučivanja inzulina. Kortikosteroidi dovode do inzulinske rezistencije i posljedično do razvoja post-transplantacijskog dijabetesa u ovisnosti o dozi. Izostavljanje kortikosteroida ili smanjenje doze može smanjiti rizik za razvoj post-transplantacijskog dijabetesa odnosno može ga zaustaviti i vratiti inzulinsku osjetljivost. (40)

Poznat je i učinak kalcineurinskih inhibitora na razvoj posttransplantacijskog dijabetesa. Smanjuju masu beta-stanica gušterače, stvaranje inzulina i sekreciju te mogu utjecati na sintezu glukagona. (40). Poznato je da takrolimus ima jači dijabetogeni učinak od drugih i dovodi do inzulinske rezistencije, prekomjernog stvaranja inzulina i oštećenja beta-stanica. Prema podacima iz kliničkih istraživanja takrolimus je superioran u odnosu na ciklosporin u duljini preživljavanja presatka i sprječavanju akutnog odbacivanja nakon transplantacije, no povećava broj post-transplantacijskog dijabetesa te neuroloških i gastrointestinalnih nuspojava. (33).

Dislipidemija

Dislipidemija je često prisutna kod bolesnika s transplantiranim bubregom te zahvaća i do 74% pacijenata. Bolesnici s transplantiranim bubregom imaju povišene vrijednosti kolesterola (LDL i ukupnog), VLDL lipoproteina i triglicerida. HDL često ostaju na normalnim vrijednostima, no isto tako mogu biti i povišeni. Dislipidemija je povezana s razvojem ateroskleroze u netransplantiranim krvnim žilama kao i u transplantiranim organima, te može dodatno doprinijeti kroničnom zatajenju presatka. (32) Dislipidemija je česta nuspojava imunosupresijske terapije. Kortikosteroidi utječu na ukupni kolesterol (HDL i LDL) i trigliceride, dok kalcineurinski inhibitori imaju jače djelovanje na ukupni i LDL kolesterol. mTOR inhibitori utječu na ukupni kolesterol (HDL i LDL) i trigliceride u ovisnosti o dozi. Općenito porast ukupnog kolesterola i triglicerida zabilježen je već trideset dana nakon transplantacije, s vršnim vrijednostima nakon šest mjeseci, dok se vrijednosti stabiliziraju na kraju prve godine, bez obzira na odabir imunosupresijske terapije. (32)

Ostali čimbenici rizika

U ostale tradicionalne čimbenike rizika mogu se ubrojiti pretilost, pušenje, starija životna dob, muški spol i obiteljska anamneza srčanožilnih bolesti. Osim tradicionalnih čimbenika rizika, u kroničnoj bubrežnoj bolesti prisutni su i neki specifični čimbenici rizika kao što su: hiperhomocisteinemija, C-reaktivni protein, proteinurija, pothranjenost, upala, oksidativni stres, poremećaj elektrolita i drugo. Svi čimbenici rizika dovode do endotelne disfunkcije i posljedične proteinurije. Albuminurija je pretskazatelj pogoršanja bubrežne funkcije i neovisni čimbenik rizika za nastanak srčanožilnih komplikacija. (41,42,43)

1.4.2 Trombociti i srčanožilne bolesti

Trombociti imaju središnju ulogu u patogenezi aterotromboze. Osim što čine glavnu komponentu arterijskog tromba, sudjeluju u svim fazama nastanka ateroskleroze. Aktivirani trombociti potiču koagulaciju na svojoj površini, izlažu medijatore upale te potiču proliferaciju stanica glatke muskulature. Nakon rupture aterosklerotskog plaka dolazi do izlaganja kolagena i von Willebrandovog čimbenika (vWF), koji predstavljaju vezna mjesta za trobocyte čime se pokreće njihova adhezija i aktivacija. Izloženi vWF iz subendotela veže

trombocite iz cirkulacije vežući se na njihov glikoproteinski receptor 1b-IX-V i jača vezanje trombocita na subendotelni kolagen preko glikoproteinskih receptora VI i IIa/Ib. (44,45) Prekomjerno stvaranje tromba može biti posljedica prevelikog broja trombocita ili njihove povećane reaktivnosti. Posebice kod aktiviranih trombocita zabilježena je pojačana adhezija i agregacija unutar aterosklerotskih lezija, zbog čega nastaju okluzivni arterijski trombi koji mogu dovesti do tromboembolijskih bolesti kao što su moždani udar ili infarkt miokarda. (46)

Aktivacija trombocita je jedno od obilježja akutnog koronarnog sindroma. Postoje brojni dokazi koji ukazuju na značajnu ulogu trombocita u patogenezi razvoja i ishoda akutnog koronarnog sindroma. Ispitivanje funkcije trombocita pomoću analizatora funkcije trombocita (PFA-100 uređaja PFA-100 (Simens Healthcare Diagnostics) koji „in vitro“ mjeri vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (CT, eng. closure time) u prisutnosti kolagena i adrenalina (COL/EPI), te kolagena i ADP-a (COL/ADP), kod bolesnika s akutnim srčanim infarktom (STEMI), pokazala su statistički značajno kraće vrijeme okluzije mjereno COL/ADP testom. Vrijednosti COL/ADP testa bile su statistički značajno niže kod ispitanika s infarktom miokarda, posebice kod onih sa STEMI (*eng.* ST-elevation myocardial infarction) u usporedbi s drugim ispitivanim skupinama (nestabilna angina pectoris, stabilna koronarna bolest ili kontrole). COL/ADP test pokazao se kao neovisni predskazatelj težine srčanog infarkta. (47,48) U istraživanju koje je uspoređivalo vrijednosti PFA-100 testova, prije i nakon vježbanja, kod bolesnika sa stabilnom anginom pectoris koji su bili podvrgnuti koronarografiji, zabilježene su niže vrijednosti (10s ili više ispod referentnih vrijednosti) kod bolesnika sa stenozom koronarnih krvnih žila. (49) Trombociti zajedno s drugim stanicama (leukocitima, endotelnim stanicama i glatkim mišićnim stanicama) doprinose upali, razvoju drugih patoloških promjena kao i nastanku ateroskleroze. (50,51,52) U konačnici, uloga trombocita od kritičnog je značaja u procesu normalne hemostaze kao i kod patološkog krvarenja odnosno tromboze.(53)

1.4.3 Imunosupresijska terapija i rizik za razvoj srčanožilnih bolesti

Kortikosteroidi dovode do endotelne disfunkcije, hipertenzije, hiperlipidemije, dijabetes melitusa, te oštećuju fibrinolizu. Primjena kortikosteroida kod transplantiranih bolesnika nije poželjna, ne samo zbog njihovog kardiovaskularnog učinka, već i stoga što dovode do štetnih učinaka u vidu osteoporoze, debljine te atrofije kože i stijenki krvnih žila. Ciklosporin je, uz to što ima iste nuspojave kao kortikosteroidi, i nefrotoksičan. Takrolimus ima manji učinak

na kardiovaskularni sustav od ciklosporina, te je osim toga i manje nefrotoksičan. Nema učinak na krvni tlak niti serumske lipide, no njegov je dijabetogeni učinak izraženiji u razdoblju odmah nakon transplantacije. U dozama održavanja, dijabetogeni učinak takrolimusa usporediv je s onim od ciklosporina. Na dijabetogeni učinak može se utjecati smanjenjem doze takrolimusa i što ranijim izostavljanjem kortikosteroida iz terapije. Antiproliferativni lijekovi azatioprin i mikofenolat mofetil (MMF) imaju mali učinak na kardiovaskularni sustav. Indirektno, dovodeći do anemije, mogu uzrokovati hipertrofiju lijeve klijetke. Mikofenolat mofetil bolji je izbor od azatioprina zbog svoje veće potentnosti i mogućeg manjeg rizika od nastanka malignoma. Sirolimus također dovodi do anemije, no obećava, zbog svog antiproliferativnog učinka. Ne može se sa sigurnošću utvrditi da li hiperlipidemija uzrokovana sirolimusom može umanjiti njegove pozitivne učinke. (40)

1.4.4 Imunosupresijska terapija i agregacija trombocita kod bolesnika s transplantiranim bubregom

Prema dosadašnjim istraživanjima ciklosporin, takrolimus i sirolimus (rapamicin) značajno pojačavaju agregaciju i sekreciju trombocita kod bolesnika s transplantiranim bubregom.

Ciklosporin dovodi do aktivacije trombocita, što je utvrđeno *in vitro* ispitivanjem trombocita zdravih dobrovoljaca i bolesnika s transplantiranim bubregom. Učinak je ovisan o dozi. Dodavanjem ciklosporina u terapijskim koncentracijama pripravku plazme bogate trombocitima (eng. platelet rich plasma, PRP) dobivene od zdravih dobrovoljaca, zabilježeno je povećanje agregacije trombocita u odgovoru na adrenalin, kolagen i ADP. Trombociti bolesnika s transplantiranim bubregom liječenih ciklosporinom, pokazali su pojačanu agregaciju i povećano otpuštanje tromboksana A₂, najizrazitije kod vršnih plazmatskih koncentracija ciklosporina. (54)

Kasnija istraživanja učinka kalcineurinskih inhibitora na funkciju trombocita koje je uključivalo bolesnike s transplantiranim bubregom, pokazalo je da ciklosporin pojačava aktivaciju bez utjecaja na vrijednosti agregacije trombocita. Vrijednosti agregacije trombocita bila su niže u grupi bolesnika liječenih ciklosporinom u odnosu na takrolimus, premda razlika nije bila statistički značajna. U grupi transplantiranih bolesnika liječenih ciklosporinom zabilježene su više vrijednosti P selektina, koji se oslobađa iz trombocitnih granula aktiviranih trombocita, što ukazuje na činjenicu da ciklosporin inducira aktivaciju trombocita

bez ubrzavanja agregacije. Razvoju trombotskih događaja u bolesnika s transplantiranim bubregom doprinosi i oštećenje funkcije endotela. (55,56)

Kronična, slaba aktivacija trombocita isto tako može doprinijeti razvoju ateroskleroze te mogućem kroničnom odbacivanju presatka. Trombociti mogu biti aktivirani brojnim fiziološkim agonistima uključujući ADP, adrenalin, trombin, kolagen, čimbenik aktivacije trombocita, te stimulacijska antitijela usmjerena protiv specifičnih membranskih proteina na trombocitima. Nakon aktivacije, trombociti sintetiziraju tromboksan A2 (koji potencira agregaciju trombocita), trombocitni čimbenik rasta (PDGF, *eng.* platelet-derived growth factor) te TGF- β čimbenik (*eng.* transforming growth factor beta) koji su uključeni u nastanak progresivne bubrežne bolesti. U dosadašnjim istraživanjima zabilježeno je kako i ciklosporin i takrolimus značajno povećavaju agregaciju trombocita i sekreciju kao odgovor na fiziološke agoniste. Učinak agonista na trombocite veći je nakon izlaganja takrolimusu nego nakon izlaganja ciklosporinu. (54,55)

Sirolimus (rapamicin) je noviji imunosupresijski lijek koji je strukturno sličan takrolimusu te se veže na protein iz iste klase veznih proteina kao i takrolimus, FK –vezni protein (*eng.* FKBP, FK –binding protein), no njegov učinak nije povezan s inhibicijom kalcineurina. U istraživanju koje je provedeno na ispranim humanim trombocitima zdravih dobrovoljaca na koje se djelovalo različitim koncentracijama rapamicina, u različitom vremenskom trajanju (1-30 minuta), mjerena je agregacija trombocita nakon izlaganja ADP-u ili ekvivalentu trombina (TRAP -6). Zabilježena je povećana osjetljivost trombocita na ADP, što se očitovalo kroz značajno više vrijednosti agregacije trombocita inducirane ADP-om. Uz to, takvi trombociti pokazali su značajno veću osjetljivost na ekvivalent trombina (TRAP 6), što se očitovalo kroz više vrijednosti agregacije trombocita i jaču granularnu sekreciju. Prema rezultatima istraživanja, rapamicin značajno pojačava agregaciju trombocita i sekreciju, i to u koncentracijama koje se mogu naći kao vršne plazmatske koncentracije. Povećane vrijednosti agregacije trombocita posljedica je izravnog učinka rapamicina na funkciju trombocita.

Premda se rapamicin veže na istu klasu FK veznih proteina (FKBP) kao i takrolimus, kompleks rapamicin-FKBP ne inhibira kalcineurin, što ukazuje na činjenicu da inhibicija kalcineurina nije mehanizam koji je odgovoran za aktivaciju trombocita nakon izlaganja ciklosporinu. (57)

U *in vitro* ispitivanju, pri višim koncentracijama rapamicina zabilježena je pojačana agregacija trombocita u odgovoru na ADP. (58)

1.5 Hemostaza

Hemostaza je proces kojim se održava cjelovitost krvožilnog sustava nakon oštećenja krvne žile. Oštećenje stijenke krvne žile pokreće slijed interakcija s ciljem stvaranja ugruška na mjestu oštećenja. Stvaranje trombocitnog čepa uključuje agregaciju i aktivaciju trombocita te stvaranje trombina i fibrina. (59)

Postoje dva različita i nezavisna puta kojim se može aktivirati stvaranje ugruška na mjestu ozljede:

- jedan je izlaganje subendotelnog kolagena čime se pokreće aktivacija trombocita;
- dok se drugi aktivira tkivnim faktorom koji potječe iz stijenke krvne žile ili cirkulacije, a rezultira stvaranjem trombina. (60)

Poremećaji u funkciji trombocita ili u koagulacijskoj kaskadi uobičajeno dovode do krvarenja, dok hiperaktivnost trombocita i poremećaji u regulatornim mehanizmima mogu dovesti do prekomjernog stvaranja trombina i patološke tromboze. Bolesnici u različitim stadijima kronične bubrežne bolesti pokazuju široki raspon poremećaja u sva tri aspekta hemostaze uz različite kliničke manifestacije: protrombotski učinak koji dovodi do povećanog broja srčanožilnih događaja, te poremećaj funkcije trombocita koji ima za posljedicu povećanu sklonost krvarenju. (59)

Hemostaza uključuje tri procesa koji se odvijaju gotovo istodobno: primarnu hemostazu koja podrazumijeva stvaranje trombocitnog čepa, koagulaciju ili sekundarnu hemostazu uz stvaranje čvrstog fibrinskog ugruška, te fibrinolizu koja obuhvaća razgradnju ugruška i ponovnu uspostavu cirkulacije kroz rekanaliziranu krvnu žilu. (61)

Primarna hemostaza podrazumijeva stvaranje trombocitnog čepa na mjestu oštećenja krvne žile koji privremeno zaustavlja krvarenje do stvaranja ugruška. Započinje odmah nakon oštećenja krvne žile i završava unutar 5 minuta. Obuhvaća refleksnu vazokonstrikciju oštećene krvne žile čime se protok krvi usmjerava dalje od mjesta ozljede te aktivaciju trombocita. (61)

Trombociti su stanice diskoidnog oblika, a nastaju u koštanoj srži fragmentiranjem citoplazme zrelih megakariocita. Životni vijek im je 7-10 dana. Zbog nedostatka stanične jezgre ne mogu sintetizirati proteine. (61,62) Stanična membrana trombocita sadrži receptore za subendotelne

strukture kao što je kolagen, receptore za koagulacijske faktore uključujući fibrinogen i von Willebrandov, te receptore za ADP, adrenalin i serotonin. (61,63)

Nakon oštećenja endotela krvne žile, subendotelne strukture poput kolagena postaju izložene cirkulirajućim trombocitima. Trombociti se u cirkulaciji kreću duž stijenke krvne žile gdje je protok sporiji. Nakon kontakta sa subendotelnim proteinima započinje aktivacija trombocita koja uključuje procese: adhezije trombocita, promjene oblika i otpuštanje medijatora, agregacije, te pojavu površinskih fosfolipida. Brzim odvijanjem tih procesa aktivirani trombociti formiraju hemostatski čep na mjestu ozljede kako bi se spriječio gubitak krvi. (63)

Nakon adhezije na kolagen dolazi do promjene oblika trombocita i pojave površinskih glikoproteinskih receptora od kojih neki olakšavaju adheziju trombocita na kolagen i druge subendotelne strukture, dok drugi omogućuju međusobno povezivanje trombocita odnosno agregaciju. (61)

U vezanju trombocita na kolagen važnu ulogu ima i vWF faktor (von Willebrandov faktor). vWF faktor sintetiziraju endotelne stanice te megakariociti. Nalazi se u endotelnim stanicama, subendotelnom tkivu te u alfa granulama trombocita, dok je u cirkulaciji vezan za koagulacijski faktor VIII. Nakon oštećenja krvne žile i izlaganja subendotelnih struktura cirkulirajućoj krvi, dolazi do vezanja vWF faktora na izloženi kolagen. Trombociti iz cirkulacije vežu se na vWF faktor putem površinskog glikoproteinskog GPIb receptora. (61)

Aktivirani trombociti mijenjaju oblik iz diskoidnog u nepravilni sferoidni oblik. Promjena oblika je u početku reverzibilna, no stalim podražajima dolazi do trajne promijene oblika uz oslobađanje trombocitnih granula. Alfa granule sadrže adhezivne proteine (vWF, fibrinogen, fibronektin), faktore rasta (npr. trombocitni faktor rasta odnosno PDGF) te koagulacijske faktore (V, XI, protein S, protein, inhibitor aktivatora plazminogena), dok se iz gustih granula otpuštaju kalcij, ADP, ATP, serotonin i histamin. (61)

Pojava glikoproteinskih receptora zajedno s promjenom oblika trombocita i otpuštanjem sadržaja granula omogućuje međusobno povezivanje trombocita odnosno agregaciju. Fibrinogen doprinosi rastu i stabilnosti trombocitnog čepa. U prisustvu kalcija veže se na glikoproteinske receptore (GPIIb i GPIIIa) na površini trombocita, te povezuje istodobno više trombocita. Stoga je kompleks GPIIb/IIIa važan je u agregaciji trombocita. U ovom stadiju agregacija trombocita je reverzibilna jer su fibrinogenske veze slabe. ADP koji se oslobađa iz trombocitnih granula pospješuje agregaciju trombocita. (61)

U aktiviranim trombocitima se, iz arahidonske kiseline u fosfolipidnoj membrani, sintetizira prostaglandin tromboxan A₂ (TxA₂). Tromboxan A₂ ima dva hemostatska učinka i to vazokonstrikciju oštećene krvne žile i oslobađanje ADP-a iz trombocita čime potiče daljnju agregaciju trombocita. (61)

Pri aktivaciji trombocita dolazi do premještanja specifičnih fosfolipida na vanjsku stranu membrane trombocita što dovodi do prokoagulantne aktivnosti nazvane trombocitni faktor 3 odnosno PF3. Na te specifične fosfolipide vežu se koagulacijski faktori. (61)

Otpuštanje ADP-a stimulira aktivaciju trombocita putem dva ADP receptora, P2Y₁ i P2Y₁₂ (neki antitrombocitni lijekovi ostvaruju učinak vežući se na te receptore čime blokiraju aktivaciju trombocita posredovanu ADP-om). (60)

Koagulacija je drugi stadij hemostatskog procesa. Uključuje međudjelovanje brojnih koagulacijskih faktora s ciljem nastanka fibrina kako bi se stabilizirao stvoreni trombocitni čep. Klasično se dijeli na vanjski i unutrašnji put ili kaskadu. Nakon oštećenja endotela krvne žile, dolazi do otkrivanja tkivnog faktora koji se nalazi u subendotelnim slojevima. Tkivni faktor veže se na cirkulirajući koagulacijski faktor FVII koji postaje aktivirani kompleks FVIIa/tkivni faktor, a sama aktivacija vjerojatno uključuje i sudjelovanje koagulacijskih faktora FXIIa, FXa, FIXa i trombina. Aktivacija faktora FX moguća je kroz dva odvojena puta. Jedan podrazumijeva izravnu aktivaciju faktora FX kompleksom FVIIa/tkivni faktor, odnosno klasični vanjski koagulacijski put. S druge strane kompleks FVIIa/tkivni faktor može aktivirati FIX, koji zajedno s FVIII i trombocitnim fosfolipidima čini kompleks koji aktivira FX. Taj način odgovara dijelu unutrašnjeg puta koagulacije. (61)

U zajedničkom završnom putu koagulacije, faktor Xa udružen s faktorom Va, fosfolipidima i kalcijem oblikuje veliki kompleks sposoban konvertirati protrombin u trombin. Pretvaranje protrombina u trombin značajno se ubrzava na površini aktiviranih trombocita. Trombin ima višestruke uloge u hemostazi: osim pretvaranja fibrinogena u fibrin, trombin aktivira i koagulacijske faktore V, VIII i XIII, te potiče agregaciju i sekreciju trombocita. Trombin dovodi do aktivacije trombocita vezanjem na trombocitne receptore što dovodi do otpuštanja ADP, serotonina i tromboxana A₂. Kao trombocitni agonisti dovode do aktivacije drugih trombocita i pojačavaju signal za stvaranje ugruška. (61)

Krajnji cilj je stvoriti trombin, koji pretvara fibrinogen u fibrin, ali i aktivirati trombocite vezanjem na njegov receptor (protease- aktivatora receptora-1). (61)

Cijepanjem fibrinogena, trombin dovodi do stvaranja fibrinskih monomera koji se spontano polimeriziraju u netopivi gel. Fibrinski polimeri stabiliziraju se djelovanjem faktora XIII. Pritom se fibrinski lanci križno spajaju stvarajući čvrste kovalentne veze između fibrinskih niti te na taj način nastaje čvrsta fibrinska mrežica unutar trombocitnog čepa. (61)

Proces *fibrinolize* dovodi do razgradnje fibrinskog ugruška i važan je za ponovnu uspostavu normalne cirkulacije. Glavna komponenta fibrinolitičkog sustava je plazmin, fibrinolitički enzim koji razgrađuje fibrinski ugrušak. Nastaje iz plazminogena, inaktivnog proenzima, koji se sintetizira u jetri. Cirkulirajući plazminogen veže se na fibrin, odnosno ugrađuje se u fibrinski ugrušak zajedno s enzimom koji se naziva tkivni aktivator plazminogena. Tkivni aktivator plazminogena (tPA) potiče iz endotelnih stanica krvnih žila. Neki patofiziološki stimulansi, kao što je anoksija, acidoza ili oštećenje endotela, stimuliraju stvaranje tkivnog aktivatora plazminogena (tPA). Nakon vezivanja na fibrin, plazminogen se pretvara u plazmin djelovanjem enzima tkivnog aktivatora plazminogena (tPA). Tkivni aktivator plazminogena neće dovesti do aktivacije plazminogena bez prisustva fibrina, te se na taj način fibrinoliza ograničava na mjesto stvaranja tromba i izbjegava sustavno trošenje fibrinogena. Plazmin razgrađuje fibrinogen i fibrin na manje molekule skupnog naziva fibrin degradacijski produkti (FDP), dok pri razgradnji fibrinskih polimera koji su povezani čvrstim vezama, nastaju D-dimeri. (61,64) Aktivnost plazmina regulira endotel izlučivanjem enzima tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) kao i inhibitora enzima tkivnog aktivatora plazminogena (tPA) koji se nazivaju PAI -1 i PAI-2. (61,64)

1.6 PFA -100 (Analizator funkcije trombocita)

PFA-100/PFA-200 Innovance (Simens Healthcare Diagnostics) je specifični analizator funkcije trombocita koji „in vitro“ mjeri vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (CT, engl. closure time) u prisutnosti kolagena i adrenalina (COL-EPI), te kolagena i ADP-a (COL-ADP). Primjenjuje se za ispitivanje primarne, o trombocitima ovisne, hemostaze. Rad uređaja temelji se na adheziji i agregaciji trombocita, oponašanjem „in vivo“ uvjeta fiziološke brzine protoka krvi u arterijama, u prisutnosti kolagena i adrenalina (COL/EPI), te kolagena i ADP

(COL/ADP). (65) Analizator funkcije trombocita koristi tehnologiju koja radi na principu prolaska krvi kroz kapilarnu cijev malog promjera (200 μm), s vrlo malim otvorom, promjera oko 150 μm . Kapilarna cijev obložena je agonistom koji uzrokuje agregaciju trombocita. Nakon aktivacije, trombociti prijanjaju na otvor i sprječavaju daljnji protok krvi kroz kapilarnu cijev. Uređaj mjeri vrijeme koje je potrebno za zatvaranje otvora, odnosno vrijeme potrebno za nastajanje trombocitnog ugruška. Izražava se kao vrijeme okluzije (engl. *closure time*, CT), a smatra se da predstavlja primarnu hemostazu. Koristi se puna krv, što znači da pacijenti mogu biti testirani na različitim razinama zdravstvene zaštite. (66,67,68)

Za izvođenje testa potrebno je 0,8 ml pune krvi, uz citrat kao antikoagulans, a mjerenje je potrebno provesti unutar 4 sata od uzimanja uzorka. Nakon stavljanja krvi u jednokratni spremnik u samom uređaju, krv se zagrijava na 37 °C i negativnim tlakom uvlači u kapilarnu cijev od nehrđajućeg čelika promjera 200 μm te kroz otvor u nitroceluloznoj membrani promjera 150 μm . Membrana je obložena kolagenom i adrenalinom (CEPI) odnosno kolagenom i ADP-om (CADP). Vrijeme potrebno za zatvaranje otvora naziva se vrijeme nastanka trombocitnog ugruška odnosno vrijeme okluzije (CT, od engl. *closure time*). Maksimalno vrijeme okluzije je 300s. (68, 69,70,71)

Pri vrijednostima većim od 300 s, smatra se da okluzije nema. Istovremeno se testiranje može provesti samo na jednom spremniku. Kao referentne vrijednosti uzima se vrijeme okluzije od 85–165 s za COL/EPI spremnik, dok se za COL/ADP spremnik uzima vrijednosti od 71-118 s. Vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (CT, engl. *closure time*) može biti produljeno kod značajnog smanjenja broja trombocita ili hematokrita. Kod vrijednosti trombocita ispod 50×10^9 vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (CT) je obično produljeno, kao i kod vrijednosti hematokrita ispod 25%. (72, 73, 74)

Primjenom dva različita testa (COL/EPI i COL/ADP) omogućuje se razlikovanje intrinzičkih poremećaja od oštećenja funkcije trombocita (povišene vrijednosti samo COL/ADP testa ili i COL/EPI vrijednosti uz to). (75,76,77) Zabilježeno je kraće vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (CT, engl. *closure time*), kod COL/EPI testa, povezano s povišenim razinama vWF čimbenika, fibrinogena i eritrocita. (78,79)

Dodatno, kraće vrijeme stvaranja trombocitnog ugruška kod COL/EPI testa može ukazati na visoku ostatnu aktivnost trombocita unatoč liječenju aspirinom, te time ukazati na povećani rizik tromboembolijskih događaja. (80,81) Isto tako, istraživanja su pokazala kako je kraće vrijeme stvaranja trombocitnog ugruška kod COL/EPI testa značajan i neovisan predskazatelj

ozbiljnih srčanožilnih događaja u bolesnika s akutnim srčanim infarktom podvrgnutih primarnom postupku PCI. (48,82,83)

Kod svih bolesnika predviđenih za različite elektivne kirurške zahvate, procjena funkcije trombocita pomoću PFA-100 uređaja može dati korisne informacije vezano za procjenu intraoperativnog krvarenja kao i planiranje potrebe postoperativne transfuzije. (84,85,86)

Uloga trombocita od kritičnog je značaja u procesu normalne hemostaze kao i kod patološkog krvarenja odnosno tromboze. (53) Trombociti zajedno s drugim stanicama (leukocitima, endotelnim stanicama i glatkim mišićnim stanicama) doprinose upali, razvoju drugih patoloških promjena kao i nastanku ateroskleroze. (50,51,52)

2 Hipoteza i ciljevi rada

Hipoteza

Agregacija trombocita u bolesnika s transplantiranim bubregom razlikuje se ovisno o vrsti imunosupresiva koji se koristi u prevenciji akutnog odbacivanja i održavanju funkcije presatka.

Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je vidjeti u kojoj mjeri izbor različitih imunosupresiva ima učinak na funkciju trombocita kod bolesnika s transplantiranim bubregom i stabilnom funkcijom presatka, uzimajući u obzir povećani rizik za razvoj srčanožilnih komplikacija kod primjene imunosupresivne terapije, kao i potrebu dugotrajnog liječenja.

Specifični ciljevi:

- Usporedba agregacije trombocita kod bolesnika s transplantiranim bubregom kod primjene četiri različita imunosupresiva (ciklosporin, takrolimus, sirolimus, everolimus) uz kontrolu za potencijale čimbenika utjecaja (dob, spol, komorbiditeti i dr.)
- Usporedba agregacije trombocita kod transplantiranih bolesnika prema kontrolnoj skupini (s urednom bubrežnom funkcijom).

3 Ispitanici i metode

3.1 Ispitanici

U istraživanje su bili uključeni bolesnici s transplantiranim bubregom koji su se redovito kontrolirali u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju, Klinike za unutrašnje bolesti KBC Rebro, u razdoblju od 3 mjeseca. Prema bolničkom protokolu, u terapiji održavanja bolesnici s transplantiranim bubregom uzimaju tzv. “trojnu imunosupresivnu terapiju” koja uključuje kortikosteroid, mikofenolat i treći lijek (takrolimus, ciklosporin, sirolimus, everolimus). Svi ispitanici upoznati su sa svrhom istraživanja i potpisali su informirani pristanak. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC Zagreb.

U istraživanje je bilo uključeno 85 odraslih bolesnika s transplantiranim bubregom, podijeljenih u 4 skupine ovisno o vrsti imunosupresiva koji uzimaju u terapiji odbacivanja: ciklosporin, takrolimus, everolimus ili sirolimus. Kontrolna grupa uključivala je 30 zdravih dobrovoljaca oba spola. Tijekom redovitih kontrolnih pregleda, zajedno s uzrocima za standardne laboratorijske nalaze koji uključuju broj eritrocita, broj leukocita, broj trombocita, vrijednost glukoze u krvi, ureju, kreatinin, kalcij, natrij, kalij, CRP, klirens kreatinina (iz 24-satnog urina) i proteinuriju, uzeta su dodatna 2 ml krvi od svih transplantiranih bolesnika koji su zadovoljili kriterije za uključivanje u istraživanje. Ispitanicima iz kontrolne grupe uzeta su 2 ml krvi za ispitivanje funkcije trombocita, uz anamnestički dobivene podatke o dobi i spolu.

Kriteriji uključivanja bolesnika bili su:

- dob >18 godina;
- terapija bez antiagregacijskih ili antikoagulantnih lijekova;
- terapija bez aspirina ili NSAID u zadnjih 8 dana;
- neuzimanje kontraceptiva ili HNL (hormonskog nadomjesnog liječenja);
- stabilna funkcija presatka tijekom protekla 3 mjeseca;
- potpisan informirani pristanak.

Za kontrolnu grupu kriteriji uključivanja podrazumijevali su:

- dob > 18 godina;
- bez značajnijih bolesti u anamnezi (ASA I i II);
- neuzimanje aspirina ili NSAID u zadnjih 8 dana;

- neuzimanje kontraceptiva ili HNL;
- potpisan informirani pristanak.

Kriteriji isključenja iz istraživanja obuhvatili su terapiju bolusima kortikosteroida zbog akutnog odbacivanja u prethodna 3 mjeseca; uzimanje lijekova koji utječu na koagulaciju i agregaciju trombocita (antikoagulantna terapija; antiagregacijska terapija; oralni kontraceptivi i drugo); anamnestički podatak o tromboembolijskom incidentu; infekciju tijekom protekla 3 mjeseca te bolesnike mlađe od 18 godina.

Drugi potrebni podaci, za bolesnike s transplantiranim bubregom uzeti su iz medicinske dokumentacije Zavoda za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju bubrega, KBC Zagreb, a uključuju: dob, spol, tjelesnu težinu, tjelesnu visinu, osnovnu bubrežna bolest, vrstu dijalize prije transplantacije, vrijeme provedeno na dijalizi prije transplantacije, vrijeme od transplantacije bubrega, broj epizoda akutnog odbacivanja, virusne infekcije (CMV, EBV, BK ili JC virus), te postojanje NODAT (od engl. new onset diabetes after transplantation).

3.2 Ispitivanje funkcije trombocita

Ispitivanje funkcije trombocita provedeno je iz uzorka pune krvi, na analizatoru funkcije trombocita PFA-100 (Simens Healthcare Diagnostics), u ambulantnim uvjetima.

Po ispunjavanju informiranog pristanka, od ispitanika je uzet uzorak krvi (2 ml) u epruvetu za koagulogram s 3,8 % natrijevim citratom. Uzorak krvi uzet je iz antekubitalne vene, te je prema preporukama proizvođača (Simens Healthcare Diagnostics), testiran u vremenu između 30 min i 3 h nakon uzimanja uzorka.

Ispitivanje je provedeno prema preporukama proizvođača (Simens Healthcare Diagnostics), pipetiranjem uzorka 800 μ L pune krvi u spremnik (engl. *cartridge*), nakon čega se spremnik stavlja u uređaj i pritiskom na tipku start započinje mjerenje vremena potrebnog za nastanak trombocitnog ugruška. Postupak se ponavlja sa različitim spremnicima za svaki od dva testa: kolagen i adrenalin (COL/EPI) te kolagen i ADP (COL/ADP).

PFA-100 (Simens Healthcare Diagnostics) je specifični analizator funkcije trombocita koji „*in vitro*“ oponaša fiziološke brzine protoka krvi u arterijama odnosno proces adhezije i agregacije trombocita. Mjeri se vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (CT) u prisutnosti

kolagena i adrenalina (COL/EPI), te kolagena i ADP-a (COL/ADP). Primjenjuje se za ispitivanje primarne, o trombocitima ovisne, hemostaze, odnosno otkriva odgovor trombocita na fiziološke stimulatore agregacije trombocita (kolagen, ADP i adrenalin)¹⁹ (M.Stanojević: Smetnje koagulacije u novorođenačkoj dobi; Paediatr. Croat. 2004; 48: 73-88). Ubraja se u uređaje koji se mogu koristiti uz postelju bolesnika (POC, od engl. *point-of-care*).

Rezultat mjerenja izražava se u sekundama za svaki od dva testa: COL/EPI (vrijednosti povećane kod uzimanja aspirina i nesteroidnih protuupalnih lijekova – NSAID), te COL/ADP (na vrijednost utječe terapija klopidogrelom i poremećaj ADP receptora).

Normalne vrijednosti nalaze se u rasponu od 85–165 s za COL/EPI test, te 71–118 s za COL/ADP test.

3.3 Statističke metode

Za prikaz rezultata i statističku analizu korištena je programska podrška IBM SPSS Statistics verzija 21.0 (www.spss.com).

Podaci su prikazani tablično i grafički. Smirnov-Kolmogorovljev test korišten je u analizi normalnosti raspodjele podataka te su se shodno dobivenim rezultatima u daljnjoj analizi primijenili odgovarajući parametrijski testovi i načini prikaza podataka. U ispitivanju razlika između ispitivanih skupina koje se odnose na kategorijske varijable koristio se X^2 test. Kvantitativni podaci su prikazani kroz medijane i odgovarajuće interkvartilne raspone, dok su se razlike između ispitivanih skupina analizirale Kruskal-Wallisovim testom, odnosno Mann-Whitney U testom kada su se promatrale razlike između ispitivane i kontrolne skupine i kada se koristilo post-hoc testiranje svih međusobnih kombinacija imunosupresiva. Izračunati su Spearmanovi koeficijenti korelacije između COL/EPI i COL/ADP vrijednosti te doze imunosupresiva (za svaki imunosupresiv zasebno). Također, načinjene su međusobne usporedbe COL/EPI i COL/ADP skupina obzirom na njihove referentne vrijednosti za odraslu populaciju. Binarnom logističkom regresijom procijenjena je prediktivna vrijednost pojedinih skupina imunosupresiva te spola i dobi na COL/EPI i COL/ADP vrijednosti.

Sve p vrijednosti manje od 0,05 smatrane su značajnima.

4 Rezultati

4.1 Osobine ispitanika

U istraživanje je bilo uključeno 85 odraslih bolesnika (50 muškaraca i 35 žena) s transplantiranim bubregom, životne dobi od 29-76 godina, podijeljenih u 4 skupine ovisno o vrsti imunosupresiva koji uzimaju u terapiji odbacivanja: ciklosporin, takrolimus, everolimus ili sirolimus. Kontrolna grupa uključivala je 30 zdravih dobrovoljaca oba spola (4 muškarca i 26 žena) s medijanom dobi 42,5 (raspon 25- 61 godinu). Ispitanici su se statistički značajno razlikovali od kontrolne skupine i po dobi ($p < 0,001$) i po spolu ($p < 0,001$).

4.2 Razlike između ispitivane i kontrolne skupine

4.2.1 Razlike između ispitivane i kontrolne skupine - kategorijske varijable

Raspodjela i razlike promatranih kategorijskih varijabli između ispitivane i kontrolne skupine prikazani su u Tablici 1.

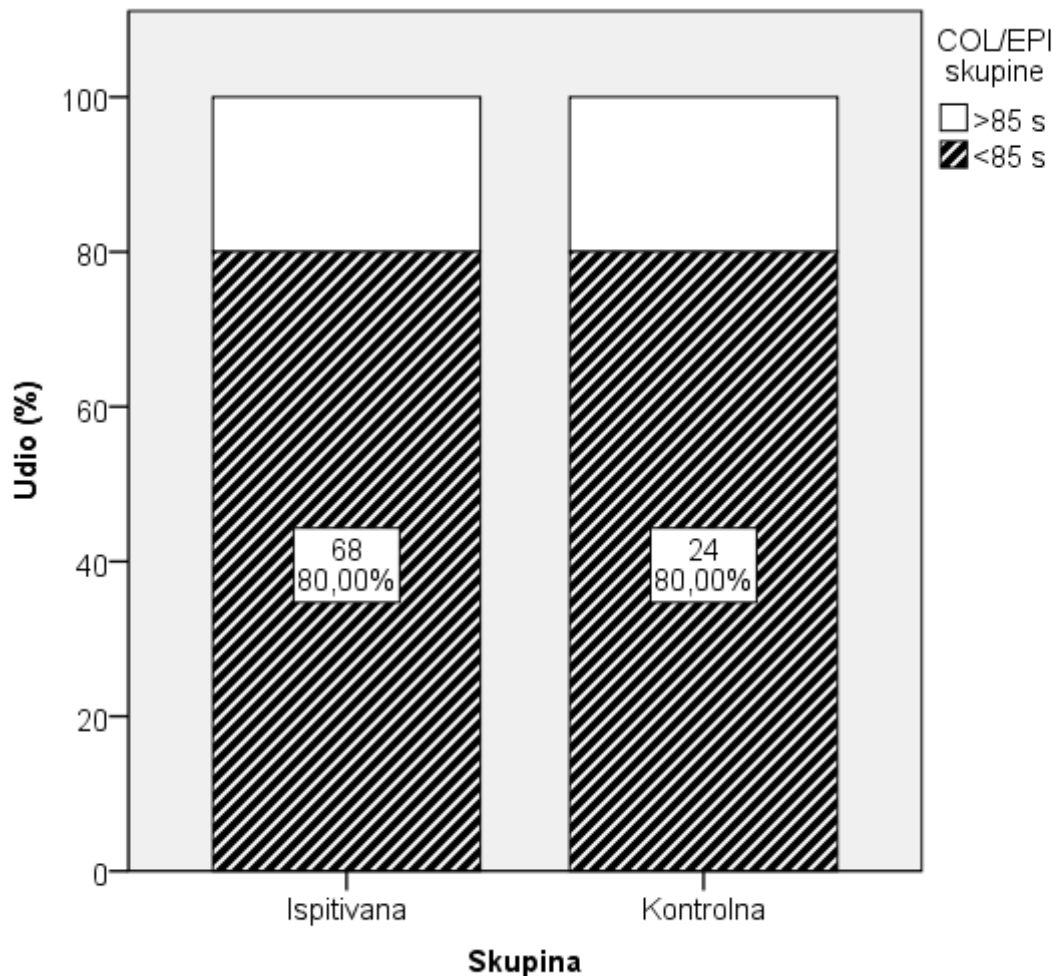
Tablica 1. Raspodjela i razlike promatranih kategorijskih varijabli između ispitivane i kontrolne skupine: χ^2 test

		Skupina				P
		Ispitivana N=85		Kontrolna N=30		
		N	%	N	%	
Spol	Muški	50	58,8%	4	13,3%	<0,001
	Ženski	35	41,2%	26	86,7%	
Osnovna DG	Glomerulopatije	33	38,8%	0	0,0%	NA
	TI nefropatije	9	10,6%	0	0,0%	
	Nasljedne nefropatije	13	15,3%	0	0,0%	
	Hipertenzija	9	10,6%	0	0,0%	
	Vezikouretralni refluks	5	5,9%	0	0,0%	
	Ostalo	16	18,8%	0	0,0%	
Vrsta tx	K	81	95,3%	0	0,0%	NA
	F	4	4,7%	0	0,0%	
Vrsta dijalize	Bez	2	2,4%	0	0,0%	NA
	HD	67	78,8%	0	0,0%	
	PD	16	18,8%	0	0,0%	
Virusne infekcije	Bez virusne infekcije	55	64,7%	0	0,0%	NA
	JC virus	4	4,7%	0	0,0%	
	BK virus	11	12,9%	0	0,0%	
	CMV	3	3,5%	0	0,0%	
	Zoster	5	5,9%	0	0,0%	
	Ostalo	7	8,2%	0	0,0%	
NODAT	Ne	78	91,8%	0	0,0%	NA
	Da	7	8,2%	0	0,0%	
COL/EPI skupine	<85 s	68	80,0%	24	80,0%	1,000
	>85 s	17	20,0%	6	20,0%	
COL/ADP skupine	<71 s	42	49,4%	6	20,0%	0,005
	>71 s	43	50,6%	24	80,0%	
Statin	Ne	55	64,7%	0	0,0%	NA
	Da	30	35,3%	0	0,0%	
Skupina imunosupre siva	Kontrola	0	0,0%	30	100,0%	NA
	Ciklosporin	24	28,2%	0	0,0%	
	Takrolimus	26	30,6%	0	0,0%	
	Everolimus	19	22,4%	0	0,0%	
	Sirolimus	16	18,8%	0	0,0%	

U kontrolnoj skupini bilo je značajno više žena: 26 (86,7%), u odnosu na 35 (41,2%) u ispitivanoj skupini; $p < 0,001$. U ispitivanoj skupini vrijednosti testa COL/ADP <71 sekundu bile su značajno češće: 42 (49,4%) u odnosu na 6 (20,0%) u kontrolnoj skupini; $p = 0,005$. Razlike u vrijednostima COL/EPI testa između skupina nisu bile značajne.

U ispitivanoj skupini najčešća je bila osnovna dijagnoza glomerulopatije (38,8%), njih 78,8% bilo je na hemodijalizi, a u 64,7% bez virusne infekcije.

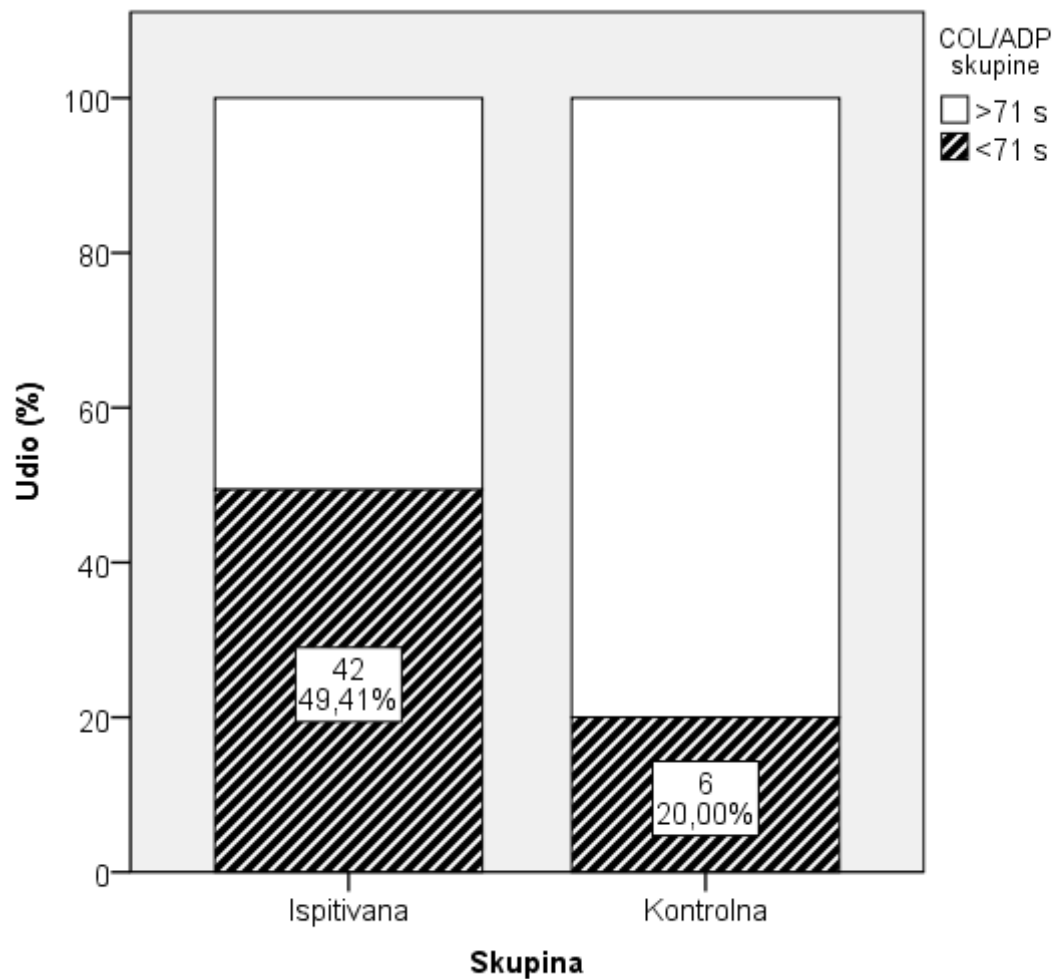
Slika 1. prikazuje neznačajne razlike u COL/EPI skupina (rizična – nerizična skupina) između ispitivane i kontrolne skupine, dok su na Slici 2. prikazane značajne razlike u COL/ADP skupina (rizična – nerizična skupina) između ispitivane i kontrolne skupine ($p=0,005$).



Slika 1. Razlike u COL/EPI skupinama (rizična – nerizična skupina) između ispitivane i kontrolne skupine ($P=1,000$)

Nije zabilježena statistički značajna razlika između ispitivane i kontrolne skupine u broju ispitanika kod kojih su izmjerene vrijednosti COL/EPI testa bile ispod donje referentne vrijednosti (niže od 85 s).

Slika 2. Razlike u COL/ADP skupinama (rizična – nerizična skupina) između ispitivane i kontrolne skupine (P=0,005)



Statistički je značajno više ispitanika ($p = 0,005$) u ispitivanoj skupini imalo vrijednosti COL/ADP testa ispod donje referentne vrijednosti (< 71 s) u usporedbi s kontrolnom grupom, čime bi se mogli svrstati u rizičnu skupinu za nastanak akutnih srčanožilnih komplikacija.

4.2.2 Razlike između ispitivane i kontrolne skupine - kvantitativne varijable

Raspodjela i razlike promatranih kvantitativnih varijabli između ispitivane i kontrolne skupine prikazani su u Tablici 2.

Tablica 2. Raspodjela i razlike promatranih kvantitativnih varijabli između ispitivane i kontrolne skupine: Mann-Whitney U test

	Ispitivana skupina N=85			Kontrolna skupina N=30			P
	Medijan	25. centila	75. centila	Medijan	25. centila	75. centila	
Dob (godine)	57,00	45,00	64,00	42,50	36,00	51,00	<0,001
BMI (kg/m ²)	25,31	22,84	28,73				
Vrijeme od transplantacije/mj	35,00	11,00	83,00				
Trajanje dijal./god	4,00	2,00	7,00				
Broj epizoda akutnog odbacivanja	0,00	0,00	0,00				
COL/EPI (sek)	115,00	93,00	150,00	129,00	107,00	147,00	0,094
COL/ADP (sek)	85,00	71,00	104,00	96,50	86,00	105,00	0,047
E	4,57	4,22	5,04				
Hgb	134,00	125,00	145,00				
Trc	203,00	168,00	243,00				
MPV	8,80	8,20	9,30				
Leu	7,20	6,20	8,60				

Kontrolna skupina bila je značajno mlađa: medijan (interkvartilni raspon) iznosio je 42,5 (36,0-51,0) godina naprema 57,0 (45,0-64,0) godina u ispitivanoj skupini; $p < 0,001$. COL/EPI vrijednosti bile su niže u ispitivanoj skupini, ali ne i značajno niže ($p = 0,094$). Ove razlike bi vjerojatno dobile na značajnosti povećanjem istraživanog uzorka. U ispitivanoj skupini zabilježene su statistički značajno niže vrijednosti COL/ADP testa: 85,0 (71,0-104,0) s naprema 96,5 (86,0-105,0) s; $P = 0,047$.

4.3 Razlike između skupina imunosupresiva

4.3.1 Razlike u COL/EPI i COL/ADP vrijednostima između skupina imunosupresiva i kontrole

Razlike između COL/EPI, COL/ADP između skupina imunosupresiva i kontrole prikazane su u Tablici 3. zajedno s odgovarajućim post-hoc testiranjima.

Tablica 3. Razlike između COL/EPI, COL/ADP između skupina imunosupresiva i kontrole: Kruskal-Wallisov test s odgovarajućim post-hoc usporedbama dobivenim Mann-Whitney U testom

	Skupina imunosupresiva	N	Mini-mum	Maxi-mum	Percentile			P
					25.	Medija n	75.	
COL/EPI (sek)	Kontrola	30	77,00	300,00	107,00	129,00	147,25	0,113
	Ciklosporin	24	75,00	300,00	98,25	123,50	166,00	
	Takrolimus	26	75,00	300,00	89,00	98,50	122,75	
	Everolimus	19	74,00	300,00	91,00	119,00	158,00	
	Sirolimus	16	72,00	300,00	90,75	112,50	149,75	
COL/ADP P (sek)	Kontrola	30	56,00	158,00	85,75	96,50	105,25	0,181
	Ciklosporin	24	65,00	217,00	73,25	86,00	109,00	
	Takrolimus	26	46,00	190,00	69,50	86,00	108,25	
	Everolimus	19	58,00	123,00	66,00	89,00	107,00	
	Sirolimus	16	52,00	129,00	67,25	77,00	87,50	

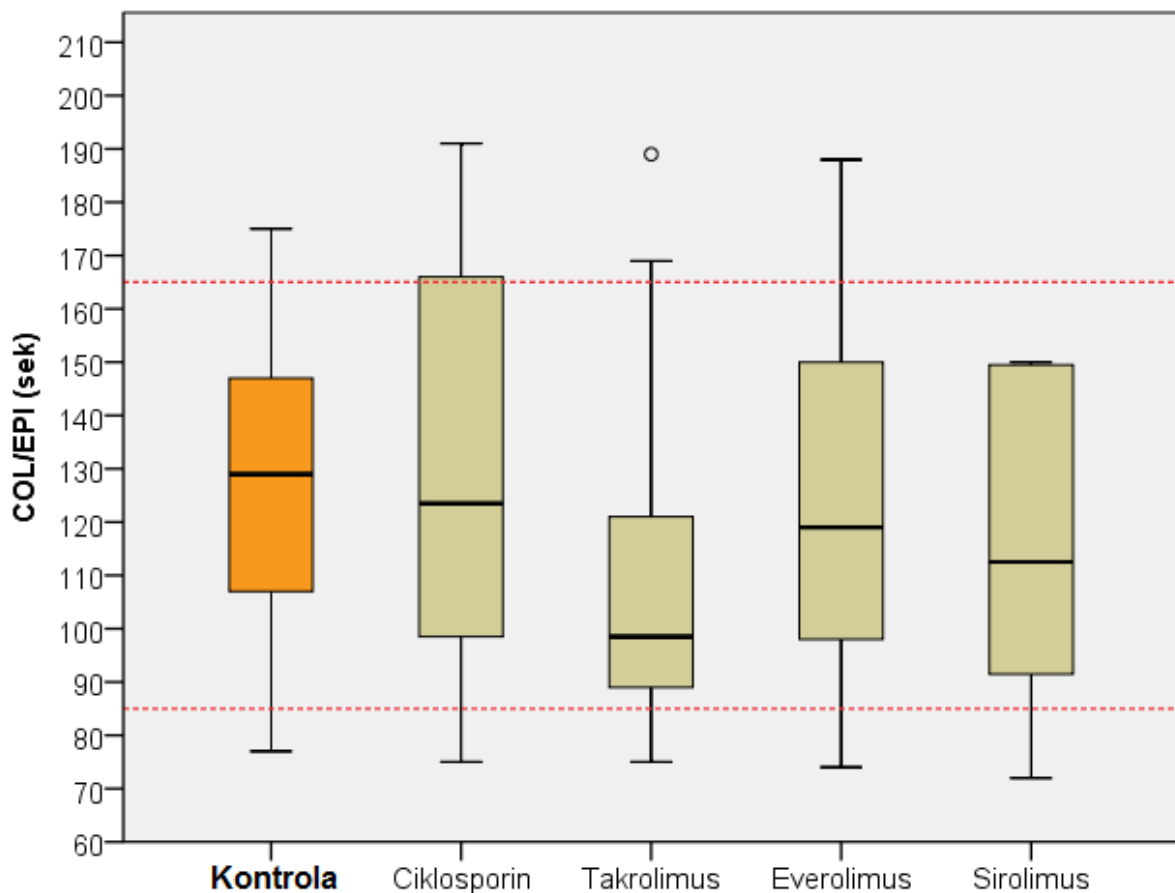
Post-hoc usporedbe	COL/EPI (sek)	COL/ADPI (sek)
	P vrijednost	P vrijednost
Kontrola vs. Ciklosporin	0,774	0,273
Kontrola vs. Takrolimus	0,006	0,227
Kontrola vs. Everolimus	0,389	0,192
Kontrola vs. Sirolimus	0,374	0,010
Ciklosporin vs. Takrolimus	0,031	0,567
Ciklosporin vs. Everolimus	0,565	0,533
Ciklosporin vs. Sirolimus	0,447	0,129
Takrolimus vs. Everolimus	0,223	0,999
Takrolimus vs. Sirolimus	0,445	0,371
Everolimus vs. Sirolimus	0,781	0,385

Iako inicijalno nije bilo značajnih razlika u COL/EPI i COL/ADP vrijednostima između skupina imunosupresiva i kontrole, pojedini međuođnosi između dviju podskupina pokazali su se značajnima:

- kontrola u odnosu na skupinu koja je koristila takrolimus ima značajno veće vrijednosti COL/EPI ($P=0,006$), kao i skupina koja je uzimala ciklosporine u odnosu na skupinu koja je bila na takrolimus ($P=0,031$);
- COL/ADP vrijednosti bile su značajno veće u kontrolnoj skupini u odnosu na skupinu koja je uzimala sirolimus ($P=0,010$).

Razlike su dodatno prikazane na Slikama 3. i 4.

Slika 3. Razlike u dobivenim vrijednostima **COL/EPI testa** između ispitivanih skupina i kontrole. Markirane su referentne vrijednosti.

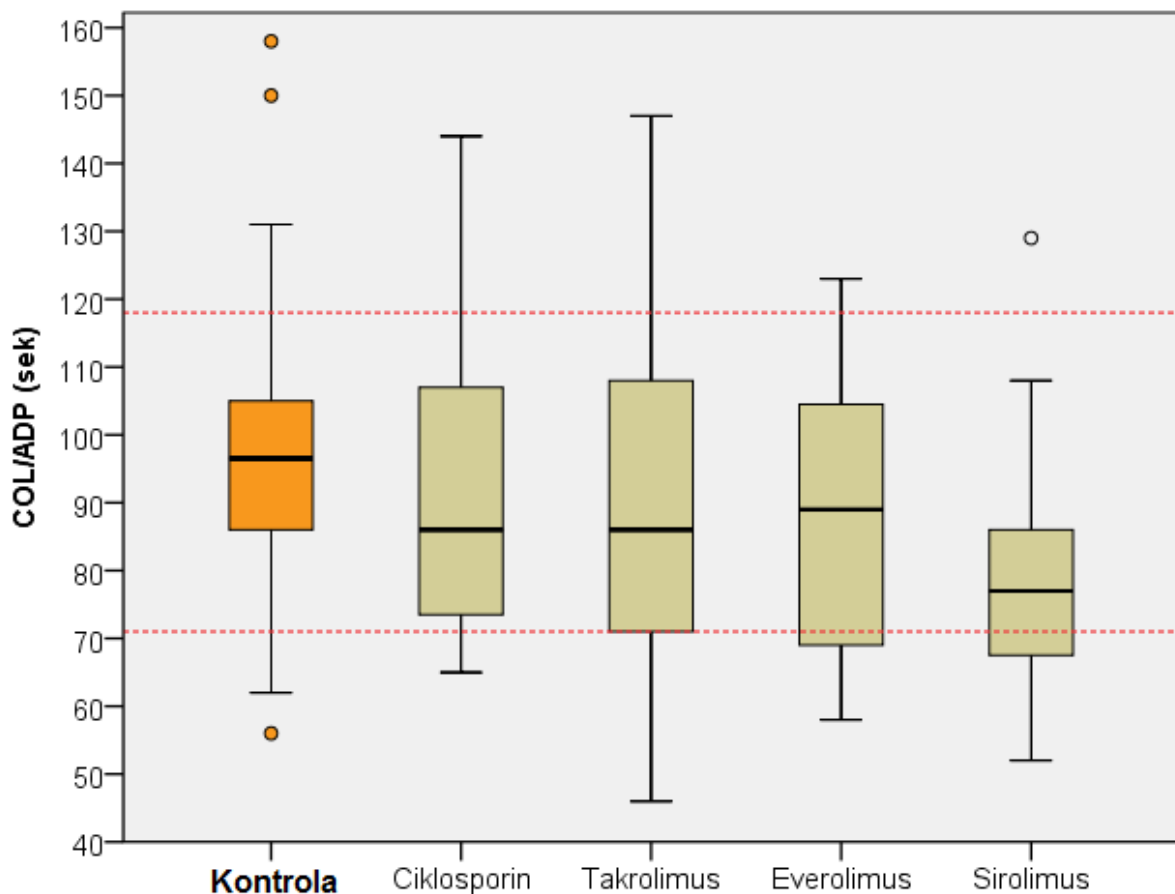


takrolimus vrs kontrola $p=0,006$

takrolimus vrs ciklosporin $p=0,031$

Gledajući vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (s) kod COL/EPI testa, izmjerene vrijednosti bile su većinom unutar referentnih granica, no ispitanici koji su uzimali takrolimus imali su statistički značajno kraće vrijeme nastanka trombocitnog ugruška u odnosu na kontrolu ($p=0,006$), i na ispitanike koji su primali ciklosporin ($p=0,031$).

Slika 4. Razlike u dobivenim vrijednostima **COL/ADP** testa između ispitivanih skupina i kontrole



sirolimus vrs kontrola $p=0,010$

Gledajući vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (s) kod COL/ADP testa, izmjerene vrijednosti bile su većinom unutar referentnih granica, no ispitanici u skupini koja je uzimala sirolimus imali su statistički značajno niže vrijednosti u odnosu na kontrolu ($p=0,010$)

4.3.2 Razlike između ispitivanih skupina s obzirom na dob i vrijeme proteklo od transplantacije

Razlike između ispitivanih skupina imunosupresiva obzirom na dob, BMI, vrijeme od transplantacije i trajanje dijalize prikazane su u Tablici 4. Kako su dob i vrijeme od transplantacije inicijalno bili značajno različiti ($p < 0,001$), načinjene su post-hoc usporedbe kako bi se razlučilo između kojih je skupina imunosupresiva ta razlika najznačajnija.

Tablica 4. Razlike između ispitivanih skupina imunosupresiva obzirom na dob, BMI, vrijeme od transplantacije i trajanje dijalize: Kruskal-Wallisov test

	Skupina imuno-supresiva	N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
Dob (godine)	Ciklosporin	24	30,00	66,00	37,25	50,50	58,00	<0,001
	Takrolimus	26	24,00	66,00	40,00	51,00	61,00	
	Everolimus	19	43,00	76,00	58,00	62,00	67,00	
	Sirolimus	16	20,00	70,00	50,00	63,50	68,75	
BMI (kg/m ²)	Ciklosporin	24	18,96	40,90	23,68	27,11	29,93	0,288
	Takrolimus	26	18,67	35,65	22,03	24,38	26,88	
	Everolimus	19	18,26	35,35	23,42	25,31	29,07	
	Sirolimus	16	19,49	31,23	23,01	25,71	28,94	
Vrijeme od transplantacije/mj	Ciklosporin	24	4,00	300,00	20,75	44,50	96,25	<0,001
	Takrolimus	26	1,00	108,00	3,00	8,00	21,00	
	Everolimus	19	1,00	178,00	17,00	35,00	72,00	
	Sirolimus	16	13,00	206,00	39,00	65,00	114,75	
Trajanje dijal./god	Ciklosporin	24	0,00	18,00	2,00	3,25	6,75	0,147
	Takrolimus	26	0,00	11,00	1,00	2,50	6,50	
	Everolimus	19	3,00	14,00	3,00	5,00	8,00	
	Sirolimus	16	0,00	19,00	2,00	6,50	8,00	

Post-hoc usporedbe	Dob	Vrijeme od transplantacije
	P vrijednost	P vrijednost
Ciklosporin vs. Takrolimus	0,705	<0,001
Ciklosporin vs. Everolimus	<0,001	0,392
Ciklosporin vs. Sirolimus	0,007	0,318
Takrolimus vs. Everolimus	0,001	0,002
Takrolimus vs. Sirolimus	0,012	<0,001
Everolimus vs. Sirolimus	0,806	0,076

Ispitanici koji su uzimali ciklosporin značajno su mlađi u odnosu na one koji su uzimali everolimus ($P < 0,001$) i sirolimus ($P = 0,007$), kao i oni koji su uzimali takrolimus u odnosu na everolimus ($P = 0,001$) i sirolimus ($P = 0,012$). Vrijeme od transplantacije bilo je najduže u skupini koja je uzimala sirolimus: 65,0 (39,0-114,75) mjeseci, dok je najkraće bilo u skupini koja je dobivala takrolimus: 8,0 (3,0-21,0) mjeseci.

4.3.3 Razlike između ispitivanih skupina u promatranim kliničkim laboratorijskim vrijednostima – značajna razlika u broju eritrocita u skupini na terapiji takrolimusom

Razlike u promatranim kliničkim laboratorijskim vrijednostima između ispitivanih skupina imunosupresiva prikazane su u Tablici 5.

Značajne razlike zabilježene su samo u broju eritrocita, a najniže vrijednosti zabilježene u skupini koja je bila na terapiji takrolimusom ($p = 0,001$).

Tablica 5. Razlike u promatranim kliničkim laboratorijskim vrijednostima između ispitivanih skupina imunosupresiva: Kruskal-Wallisov test

	Skupina imunosupresiva	N	Min	Max	Centile			P
					25.	Medijan	75.	
COL/EPI (sek)	Ciklosporin	24	75,00	300,00	98,25	123,50	166,00	0,231
	Takrolimus	26	75,00	300,00	89,00	98,50	122,75	
	Everolimus	19	74,00	300,00	91,00	119,00	158,00	
	Sirolimus	16	72,00	300,00	90,75	112,50	149,75	
COL/ADP (sek)	Ciklosporin	24	65,00	217,00	73,25	86,00	109,00	0,530
	Takrolimus	26	46,00	190,00	69,50	86,00	108,25	
	Everolimus	19	58,00	123,00	66,00	89,00	107,00	
	Sirolimus	16	52,00	129,00	67,25	77,00	87,50	
E	Ciklosporin	24	2,66	5,77	4,24	4,42	4,91	0,001
	Takrolimus	26	2,85	6,71	3,82	4,26	4,63	
	Everolimus	19	2,87	6,27	4,57	4,89	5,46	
	Sirolimus	16	3,81	6,02	4,57	4,86	5,21	
Hgb	Ciklosporin	24	85,00	168,00	122,50	137,50	154,75	0,094
	Takrolimus	26	81,00	161,00	120,50	128,00	140,00	
	Everolimus	19	90,00	164,00	130,00	142,00	149,00	
	Sirolimus	16	111,00	185,00	125,25	130,50	151,75	
Trc	Ciklosporin	24	91,00	374,00	174,25	212,00	279,25	0,411
	Takrolimus	26	112,00	500,00	161,00	197,00	239,75	
	Everolimus	19	113,00	354,00	170,00	203,00	241,00	
	Sirolimus	16	103,00	259,00	164,25	188,50	238,00	
MPV	Ciklosporin	24	7,80	12,00	8,23	8,85	9,35	0,108
	Takrolimus	26	6,60	10,50	8,18	8,80	9,50	
	Everolimus	19	7,40	10,70	7,80	8,40	8,90	
	Sirolimus	16	7,30	10,30	8,53	8,90	9,70	
Leu	Ciklosporin	24	5,20	10,00	6,05	6,95	8,43	0,316
	Takrolimus	26	3,50	12,00	5,95	7,35	9,50	
	Everolimus	19	4,40	11,60	5,70	6,90	8,40	
	Sirolimus	16	4,60	10,40	7,03	7,70	8,85	
Doza imunosupresiva	Ciklosporin	24	50,00	375,00	100,00	150,00	175,00	NA
	Takrolimus	26	0,50	10,50	2,38	3,00	4,63	
	Everolimus	19	0,50	2,25	1,00	1,25	1,50	
	Sirolimus	16	0,50	3,00	1,00	1,00	1,50	

4.3.4 Razlike između ispitivanih skupina imunosupresiva u promatranima kategorijskim varijablama - značajna razlika u broju epizoda akutnog odbacivanja i terapiji statinima

Tablica 6. prikazuje razlike u promatranim kategorijskim vrijednostima između ispitivanih skupina imunosupresiva. Broj epizoda akutnog odbacivanja bio je značajno češći u skupinama koje su dobivale ciklosporin, odnosno takrolimus u odnosu na ostale skupine imunosupresiva ($P=0,021$). Također, značajno veći broj ispitanika na sirolimusu bio je i na terapiji statinima u odnosu na ostale skupine imunosupresiva ($P=0,014$).

Tablica 6. Razlike u promatranim kategorijskim vrijednostima između ispitivanih skupina imunosupresiva: X² test

		Skupina imunosupresiva								P
		Ciklosporin		Takrolimus		Everolimus		Sirolimus		
		N	%	N	%	N	%	N	%	
Spol	Muški	14	58,3%	14	53,8%	14	73,7%	8	50,0%	0,473
	Ženski	10	41,7%	12	46,2%	5	26,3%	8	50,0%	
Osnovna DG	Glomerulopatije	13	54,2%	9	34,6%	7	36,8%	4	25,0%	0,383
	TI nefropatije	2	8,3%	5	19,2%	2	10,5%	0	,0%	
	Nasljedne nefropatije	2	8,3%	3	11,5%	3	15,8%	5	31,3%	
	Hipertenzija	1	4,2%	1	3,8%	4	21,1%	3	18,8%	
	Vezikouretralni refluks	1	4,2%	2	7,7%	1	5,3%	1	6,3%	
	Ostalo	5	20,8%	6	23,1%	2	10,5%	3	18,8%	
Vrsta tx	K	22	91,7%	25	96,2%	19	100,0%	15	93,8%	0,621
	F	2	8,3%	1	3,8%	0	,0%	1	6,3%	
Vrsta dijalize	Bez	1	4,2%	1	3,8%	0	,0%	0	,0%	0,762
	HD	20	83,3%	18	69,2%	16	84,2%	13	81,3%	
	PD	3	12,5%	7	26,9%	3	15,8%	3	18,8%	
Broj epizoda akutnog odbacivanja	0	17	70,8%	18	69,2%	19	100,0%	16	100,0%	0,021
	1	6	25,0%	8	30,8%	0	,0%	0	,0%	
	2	1	4,2%	0	0,0%	0	,0%	0	,0%	
Virusne infekcije	Bez virusne infekcije	14	58,3%	20	76,9%	10	52,6%	11	68,8%	0,152
	JC virus	3	12,5%	0	,0%	1	5,3%	0	,0%	
	BK virus	1	4,2%	4	15,4%	5	26,3%	1	6,3%	
	CMV	0	,0%	0	,0%	2	10,5%	1	6,3%	
	Zoster	3	12,5%	1	3,8%	0	,0%	1	6,3%	
	Ostalo	3	12,5%	1	3,8%	1	5,3%	2	12,5%	
NODAT	Ne	21	87,5%	24	92,3%	18	94,7%	15	93,8%	0,827
	Da	3	12,5%	2	7,7%	1	5,3%	1	6,3%	
Statin	Ne	13	54,2%	23	88,5%	12	63,2%	7	43,8%	0,014
	Da	11	45,8%	3	11,5%	7	36,8%	9	56,3%	

Spearmanovi korelacijski koeficijenti rho između doze imunosupresiva te COL/EPI i COL/ADP vrijednosti za pojedine imunosupresive prikazani su u Tablici 7. Nije bilo značajnih međusobnih korelacija.

Tablica 7. Spearmanovi korelacijski koeficijenti rho između doze imunosupresiva te COL/EPI i COL/ADP vrijednosti za pojedine imunosupresive

Skupina imunosupresiva		Doza imunosupresiva	
Ciklosporin	COL/EPI (sek)	rho	0,093
		P	0,667
		N	24
	COL/ADP (sek)	rho	0,147
		P	0,493
		N	24
Takrolimus	COL/EPI (sek)	rho	0,076
		P	0,713
		N	26
	COL/ADP (sek)	rho	-0,087
		P	0,672
		N	26
Everolimus	COL/EPI (sek)	rho	0,412
		P	0,080
		N	19
	COL/ADP (sek)	rho	0,214
		P	0,380
		N	19
Sirolimus	COL/EPI (sek)	rho	-0,365
		P	0,165
		N	16
	COL/ADP (sek)	rho	-0,341
		P	0,196
		N	16

4.3.5 Učestalost ispitanika s vrijednostima COL/EPI i COL/ADP testa izvan referentnih vrijednosti – rizičnost skupine

Razlika između učestalosti COL/EPI skupina <165 i >165s (gornja referentna vrijednost) u odnosu na ispitivanu i kontrolnu skupinu prikazana je u Tablici 8. Nije bilo značajnih razlika (P=1,000), odnosno učestalosti su bile identične u obje usporedne skupine.

Tablica 8. Razlika između učestalosti COL/EPI skupina <165 i >165s (gornja referentna vrijednost) u odnosu na ispitivanu i kontrolnu skupinu: X² test

		COL/EPI skupine				P
		<165 s		>165 s		
		N	%	N	%	
Skupina	Ispitivana	68	80,0%	17	20,0%	1,000
	Kontrolna	24	80,0%	6	20,0%	

Tablica 9. prikazuje razlike između učestalosti COL/EPI skupina <85 i >85 s (donja referentna vrijednost) u odnosu na ispitivane skupine. Nije bilo značajnih razlika (P=0,653) između ispitivanih skupina.

Tablica 9. Razlika između učestalosti COL/EPI skupina <85 i >85 s (donja referentna vrijednost) u odnosu na ispitivane skupine: X² test

		COL/EPI skupine				P
		<85 s		>85 s		
		N	%	N	%	
Skupina imunosupresiva	Kontrola	24	80,0%	6	20,0%	0,653
	Ciklosporin	17	70,8%	7	29,2%	
	Takrolimus	23	88,5%	3	11,5%	
	Everolimus	15	78,9%	4	21,1%	
	Sirolimus	13	81,3%	3	18,8%	

Tablica 10. prikazuje razlike između učestalosti COL/ADP skupina <118 i >118 s (gornja referentna vrijednost) u odnosu na ispitivane skupine. Nije bilo značajnih razlika (P=0,956) između ispitivanih skupina.

Tablica 10. Razlika između učestalosti COL/ADP skupina <118 i >118 s u odnosu na ispitivane skupine: X² test

		COL/ADP skupine				P
		<118 s		>118 s		
		N	%	N	%	
Skupina	Ispitivana	74	87,1%	11	12,9%	0,956
	Kontrolna	26	86,7%	4	13,3%	

Razlike između učestalosti COL/ADP skupina <71 i >71 s u odnosu na ispitivane skupine imunosupresiva i kontrole prikazane su u Tablici 11.

Tablica 11. Razlika između učestalosti COL/ADP skupina <71 i >71 s u odnosu na ispitivane skupine: X² test

		COL/ADP skupine				P
		<71 s		>71 s		
		N	%	N	%	
Skupina imunosupresiva	Kontrola	6	20,0%	24	80,0%	0,010
	Ciklosporin	10	41,7%	14	58,3%	
	Takrolimus	12	46,2%	14	53,8%	
	Everolimus	8	42,1%	11	57,9%	
	Sirolimus	12	75,0%	4	25,0%	

Ispitanici koji su primili terapiju sirolimusom imali su značajno veću učestalost vrijednosti <71 s u odnosu na ostale skupine i kontrolu.

Razlika između učestalosti COL/EPI skupina <165 i >165s (gornja referentna vrijednost) u odnosu na ispitivane skupine bez kontrole prikazane su u Tablici 12. Nije bilo značajnih razlika.

Tablica 12. Razlika između učestalosti COL/EPI skupina <165 i >165s (gornja referentna vrijednost) u odnosu na ispitivane skupine bez kontrole: X² test

		COL/EPI skupine				P
		<165 s		>165 s		
		N	%	N	%	
Skupina imunosupresiva	Ciklosporin	17	70,8%	7	29,2%	0,484
	Takrolimus	23	88,5%	3	11,5%	
	Everolimus	15	78,9%	4	21,1%	
	Sirolimus	13	81,3%	3	18,8%	
Spol	Muški	38	76,0%	12	24,0%	0,270
	Ženski	30	85,7%	5	14,3%	
Osnovna DG	Glomerulopatije	27	81,8%	6	18,2%	0,178
	TI nefropatije	8	88,9%	1	11,1%	
	Nasljedne nefropatije	12	92,3%	1	7,7%	
	Hipertenzija	5	55,6%	4	44,4%	
	Vezikouretralni refluks	5	100,0%	0	0,0%	
	Ostalo	11	68,8%	5	31,3%	
Vrsta tx	K	65	80,2%	16	19,8%	0,798
	F	3	75,0%	1	25,0%	
Vrsta dijalize	Bez	2	100,0%	0	0,0%	0,760
	HD	53	79,1%	14	20,9%	
	PD	13	81,3%	3	18,8%	
Virusne infekcije	Bez virusne infekcije	43	78,2%	12	21,8%	0,503
	JC virus	3	75,0%	1	25,0%	
	BK virus	10	90,9%	1	9,1%	
	CMV	2	66,7%	1	33,3%	
	Zoster	3	60,0%	2	40,0%	
	Ostalo	7	100,0%	0	0,0%	
NODAT	Ne	63	80,8%	15	19,2%	0,554
	Da	5	71,4%	2	28,6%	
Statin	Ne	45	81,8%	10	18,2%	0,570
	Da	23	76,7%	7	23,3%	

Tablica 13. prikazuje razlike između učestalosti COL/ADP skupina <118 i >118s (gornja referentna vrijednost) u odnosu na ispitivane skupine bez kontrole. Nije bilo značajnih razlika.

Tablica 13. Razlika između učestalosti COL/ADP skupina <118 i >118s (gornja referentna vrijednost) u odnosu na ispitivane skupine bez kontrole: X² test

		COL/ADP skupine				P
		<118 s		>118 s		
		N	%	N	%	
Skupina imunosupresiva	Ciklosporin	19	79,2%	5	20,8%	0,377
	Takrolimus	22	84,6%	4	15,4%	
	Everolimus	18	94,7%	1	5,3%	
	Sirolimus	15	93,8%	1	6,3%	
Spol	Muški	45	90,0%	5	10,0%	0,334
	Ženski	29	82,9%	6	17,1%	
Osnovna DG	Glomerulopatije	25	75,8%	8	24,2%	0,204
	TI nefropatije	8	88,9%	1	11,1%	
	Nasljedne nefropatije	12	92,3%	1	7,7%	
	Hipertenzija	8	88,9%	1	11,1%	
	Vezikouretralni refluks	5	100,0%	0	0,0%	
	Ostalo	16	100,0%	0	0,0%	
Vrsta tx	K	70	86,4%	11	13,6%	0,430
	F	4	100,0%	0	0,0%	
Vrsta dijalize	Bez	2	100,0%	0	0,0%	0,183
	HD	56	83,6%	11	16,4%	
	PD	16	100,0%	0	0,0%	
Virusne infekcije	Bez virusne infekcije	46	83,6%	9	16,4%	0,626
	JC virus	4	100,0%	0	0,0%	
	BK virus	11	100,0%	0	0,0%	
	CMV	3	100,0%	0	0,0%	
	Zoster	4	80,0%	1	20,0%	
	Ostalo	6	85,7%	1	14,3%	
NODAT	Ne	68	87,2%	10	12,8%	0,912
	Da	6	85,7%	1	14,3%	
Statin	Ne	48	87,3%	7	12,7%	0,937
	Da	26	86,7%	4	13,3%	

Tablice 14. i 15. prikazuju multivarijatne regresijske modele predikcije pripadnosti skupinama s vrijednostima COL/EPI <85 s (Tablica 14) i COL/ADP <71 s kao prediktorske varijable korišteni su spol, dob te vrsta imunosupresijske terapije. Kako je vidljivo u Tablici 14, nije bilo značajnih prediktora za vrijednosti COL/EPI <85 s.

Tablica 14. Predikcija pripadnosti skupini s vrijednostima COL/EPI <85 s: binarna logistička regresija

COL/EPI <85s	OR	95% CI		P
		Donji	Gornji	
Dob (godine)	0,98	0,94	1,03	0,374
Muški spol	0,56	0,19	1,61	0,278
Kontrola (referentna skupina)				0,568
Ciklosporini	0,91	0,22	3,69	0,894
Takrolimus	2,93	0,57	15,12	0,200
Everolimus	2,03	0,33	12,61	0,449
Sirolimus	1,97	0,31	12,37	0,469

Značajnost regresijskog modela P=0,611; r²=6%

Tablica 15. Predikcija pripadnosti skupini s vrijednostima COL/ADP <71 s: binarna logistička regresija

COL/ADP <71s	OR	95% CI		P
		Donji	Gornji	
Dob (godine)	0,99	0,96	1,03	0,742
Muški spol	2,63	1,09	6,33	0,031
Kontrola (referentna skupina)				0,058
Ciklosporini	1,95	0,52	7,26	0,321
Takrolimus	2,49	0,69	9,01	0,165
Everolimus	1,86	0,38	9,19	0,445
Sirolimus	10,17	2,06	50,16	0,004

Značajnost regresijskog modela P=0,004; r²=20,3%

U predikciji pripadnosti skupini s vrijednostima COL/ADP <71 s, značajno se izdvaja skupina koja je primala terapiju sirolimusom u odnosu na kontrolnu skupinu (kao referentnu) s OR (omjer vjerojatnosti ili odds ratio) 10,2 (95% CI: 2,1-50,2; P=0,004). To znači da ispitanici na terapiji sirolimusom, u odnosu na kontrolu, imaju 10,2 puta veću vjerojatnost loših ispitivanih vrijednosti (COL/ADP <71 s), kontrolirano i na dob i na spol. Pored toga, muški spol također značajno povećava vjerojatnost loših ispitivanih vrijednosti (COL/ADP <71 s) i to za 2,63 puta.

5 Rasprava

Cilj ovog istraživanja bio je usporediti učinak različitih imunosupresiva na funkciju trombocita kod bolesnika s transplantiranim bubregom i stabilnom funkcijom presatka primjenom analizatora funkcije trombocita (PFA-100) koji “in vitro” simulira process aktivacije i agregacije trombocita.

U istraživanje je bilo uključeno 85 odraslih bolesnika (50 muškaraca i 35 žena) s transplantiranim bubregom, životne dobi od 29-76 godina, podijeljenih u 4 skupine ovisno o vrsti imunosupresiva koji uzimaju u terapiji odbacivanja. Standardna imunosupresijska terapija uključivala je steroid i mikofenolat, te jedan od navedenih imunosupresiva kao treći lijek: ciklosporin, takrolimus, everolimus ili sirolimus. Kontrolna grupa uključivala je 30 zdravih dobrovoljaca oba spola (4 muškarca i 26 žena) s medijanom dobi 42,5 (raspon 25- 61 godinu).

Najčešći uzrok zatajenja bubrega u ispitivanoj skupini bili su kronični glomerulonefritisi. Policistična bolest je bila drugi najčešći uzrok zatajenja bubrega, zabilježena kod trinaest ispitanika (15,3%). Slijedi hipertenzija koja je kao osnovna dijagnoza utvrđena u devet ispitanika (10,6%), kao i kronični pijelonfritis, dok je vezikoureteralni refluks (VUR) doveo do zatajenja bubrega u 5,9% ispitanika. Dijabetička nefropatija, kao najčešći uzrok zatajenja bubrega, zabilježena je u samo dva slučaja. Kod ostalih ispitanika uzrok zatajenja bubrežne funkcije nije bio poznat.

Kod većine ispitanika (95,3%) radilo se o transplantaciji bubrega s umrlog darovatelja, dok su u velikom postotku, prije transplantacije, provodili nadomjesno bubrežno liječenje hemodijalizom (78,8%). Više od polovice ispitanika (64,7%), nakon transplantacije, nije razvilo virusnu infekciju, dok je kod preostalih najčešće zabilježena infekcija BK virusom (12,9%). Infekcija citomegalovirusom (CMV) i herpes zoster virusom zabilježena kod tri (3,5%), odnosno pet (5,9%) ispitanika. Novonastala šećerna bolest (NODAT) zabilježena je samo kod sedam ispitanika (8,2%), dok je statine u terapiji imalo manje od polovice ispitanika s transplantiranim bubregom (35,3%).

5.1 Usporedba brzine nastanka trombotičnog ugruška u ispitivanoj u odnosu na kontrolnu skupinu – brže stvaranje trombotičnog ugruška u ispitivanoj skupini

Ispitanici su se statistički značajno razlikovali od kontrolne skupine i po dobi ($p < 0,001$) i po spolu ($p < 0,001$). Ispitivana skupina bila je značajno starija od kontrolne ($p < 0,001$), dok je u kontrolnoj skupini bilo je značajno više žena ($p < 0,001$).

Pri usporedbi vrijednosti COL/EPI testa između ispitivane i kontrolne skupine, zabilježene su niže vrijednosti u ispitivanoj skupini, no razlike nisu bile statistički značajne ($p = 0,094$). Razlike bi vjerojatno dobile na značajnosti s povećanjem broja ispitanika. Statistički značajna razlika ($p = 0,047$) zabilježena je u vrijednostima COL/ADP testa između ispitivane i kontrolne skupine. U ispitivanoj skupini vrijednosti COL/ADP testa bile su značajno niže u odnosu na kontrolu. Kako se, prema rezultatima dosadašnjih istraživanja, kraće vrijeme nastanka trombotičnog ugruška može povezati s većom vjerojatnošću nastanka akutnih srčanožilnih događaja, time bi se ispitivana skupina mogla smatrati rizičnom.

Dosadašnja istraživanja pokazala su povezanost između aktivacije trombocita i akutnog koronarnog sindroma. U stenoziranim arterijama pri visokim brzinama protoka zabilježena je brža aktivacija trombocita i pojačana funkcija. Frossard i autori u svom su istraživanju, kod bolesnika sa srčanim infarktom (STEMI), pokazali kako postoji povezanost između snižene vrijednosti COL/ADP testa i veličine oštećenja srčanog mišića pri srčanom infarktu; brže stvaranje trombotičnog ugruška (niže vrijednosti COL/ADP testa) bilo je praćeno većim oštećenjem srčanog mišića. Isto tako, pokazali su kako su niže vrijednosti COL/ADP i COL/EPI bile nezavisni prediktor veličine oštećenja srčanog mišića. Kako je niža vrijednost COL/ADP testa dobro korelirala s veličinom oštećenja srčanog mišića, može se smatrati prediktorom težine srčanog infarkta. (47) Isto je dokazano i u istraživanju Huczek i autora, koji su pokazali jaku nezavisnu prognostičku značajnost PFA -100 testa (COL/ADP) u predikciji oštećenja reperfuzije miokarda: vrijednost COL/ADP testa od 73 s ili niže. Isto tako zabilježili su kako je poznat utjecaj liječenja statinima na hemostazu. (87)

Niže vrijednosti COL/EPI testa zabilježene su i u istraživanju koje je uspoređivalo jesu li indeksi aktivacije trombocita povezani sa stabilnošću koronarne bolesti: više bolesnika s nedavno preboljelim srčanim infarktom imalo je niže vrijednosti COL/EPI testa odnosno brže stvaranje trombotičnog ugruška u odnosu na bolesnike bez utvrđene koronarne bolesti. (88)

Statistički značajna razlika ($p = 0,005$), između ispitivane i kontrolne skupine, zabilježena je i u broju ispitanika s vrijednostima COL/ADP testa ispod donjih referentnih vrijednosti čime se isto tako mogu svrstati u rizičnu skupinu za nastanak akutnih srčanožilnih događaja. U ispitivanoj skupini bio je značajno veći broj ispitanika s vrijednošću COL/ADP testa ispod donje referentne vrijednosti ($< 71s$). Dosadašnja istraživanja pokazala su statistički značajno kraće vrijeme nastanka trombocitnog ugruška mjereno COL/ADP testom na analizatoru funkcije trombocita (PFA-100, Simens Healthcare Diagnostics) kod ispitanika s infarktom miokarda. (47,48)

Isto tako, u ispitivanju provedenom na analizatoru funkcije trombocita PFA 100, prije i poslije vježbanja, u bolesnika sa stabilnom anginom pectoris koji su bili podvrgnuti koronarnoj angiografiji, zabilježena je povezanost niže vrijednosti vremena nastanka trombocitnog ugruška (10 s ispod referentne vrijednosti) s prisutnošću stenoze koronarnih krvnih žila. (49,75)

U skladu s rezultatima dosadašnjih istraživanja, brže stvaranje trombocitnog ugruška u ispitivanoj skupini (niže vrijednosti COL/EPI i COL/ADP testova) može se povezati s većom vjerojatnošću nastanka akutnih srčanožilnih događaja, time bi se ispitivana skupina mogla smatrati rizičnom.

5.2 Razlike u COL/EPI i COL/ADP vrijednostima između skupina imunosupresiva i kontrole – brže stvaranje trombocitnog ugruška u skupini liječenoj takrolimusom i sirolimusom

Gledajući vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (s) kod oba testa, COL/EPI i COL/ADP, u našem istraživanju izmjerene vrijednosti bile su većinom unutar referentnih granica. Značajne razlike u brzini nastanka trombocitnog čepa zabilježene su između pojedinih imunosupresiva odnosno kontrole i to: brže stvaranje trombocitnog ugruška u skupini liječenoj takrolimusom u odnosu na ciklosporinsku skupinu i kontrolu, te brže stvaranje trombocitnog ugruška u skupini liječenoj sirolimusom u odnosu na kontrolu.

Kod COL/EPI testa, izmjerene vrijednosti bile su većinom unutar referentnih granica, no brzina agregacije trombocita kod ispitanika koji su uzimali takrolimus bila je statistički značajno kraća u odnosu na kontrolu ($p=0,006$), i na ispitanike koji su liječeni ciklosporinom

($p=0,031$). Skupinu ispitanika na takrolimusu karakteriziraju znatno mlađi ispitanici u odnosu na skupine na sirolimusu i everolimusu, najkraće vrijeme provedeno na dijalizi prije transplantacije (premda vrijednosti nisu bile statistički značajne), te značajno kraće vrijeme proteklo od transplantacije u usporedbi s ostalim skupinama, s medijanom od samo 8 mjeseci ($p<0,001$). Isto tako zabilježena je značajna razlika u broju eritrocita između ispitivanih skupina, s najnižim vrijednostima u skupini na takrolimusu.

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su oprečne rezultate o utjecaju takrolimusa na agregaciju trombocita, no potrebno je uzeti u obzir činjenicu da je većina istraživanja provedena u „in vitro“ uvjetima. Tako su Klein i suradnici zabilježili bržu agregaciju trombocita „in vitro“ nakon izlaganja takrolimusu, što su povezali s povećanom vjerojatnošću nastanka tromboembolijskih komplikacija u bolesnika s transplantiranim bubregom (89), dok su primarna istraživanja na životinjama zabilježila kako takrolimus pokazuje inhibitorški učinak na nastanak tromboze. (90,91)

Zaključke prema kojima i ciklosporin i takrolimus značajno pojačavaju agregaciju trombocita i sekreciju u odgovoru na fiziološke agoniste, pokazala su i ranija istraživanja. Tako je zabilježeno kako ciklosporin povećava agregaciju trombocita u odgovoru na ADP u izoliranim suspenzijama trombocita što ukazuje da ima izravan učinak na funkciju trombocita, neovisno o interakcijama s drugim plazmatskim čimbenicima. (92) Maksimalna agregacija trombocita u odgovoru na ADP zabilježena je nakon razdoblja od sat vremena preinkubacije ciklosporinom, u ovisnosti o dozi. (92)

U kasnijem istraživanju uspoređivali su učinak ciklosporina i takrolimusa na aktivaciju i agregaciju trombocita u odgovoru na ADP stimulaciju, te su utvrdili jaču agregaciju trombocita nakon izlaganja takrolimusu u ekvivalentnim koncentracijama. (93). U usporedbi učinkovitosti i sigurnosti primjene ciklosporina i takrolimusa, zabilježen je jači odgovor trombocita na djelovanje agonista nakon izlaganja takrolimusu u odnosu na ciklosporin. (57, 94).

Nasuprot tome, Jespersen i suradnici (95), u svom su istraživanju zabilježili kako ciklosporin ubrzava agregaciju trombocita u usporedbi s takrolimusom i sirolimusom, inhibirajući učinak ciklooksigenaze COX-2 “in vitro”, koja je u velikoj mjeri odgovorna za sintezu prostaciklina (PGI₂). Prostaciklin (PGI₂) inhibira aktivaciju trombocita i učinkovit je vazodilatator, stoga njegov nedostatak potencira vazokonstrikciju i pojačanu aktivaciju trombocita, odnosno posljedično bržu agregaciju. Smatra se da je selektivna inhibicija stvaranja prostaciklina

(PGI2) odgovorna za povišeni pobol i smrtnost od srčanožilnih bolesti kod bolesnika liječenih selektivnim inhibitorima COX-2. (96,97). U zaključku svog istraživanja navode kako ciklosporin inhibira COX-2 u kulturi glatkih mišićnih stanica krvnih žila „in vitro“, dok takrolimus i sirolimus nisu pokazali takav učinak. Kod bolesnika s transplantiranim bubregom koji su bili liječeni ciklosporinom nije zabilježena inhibicija enzima COX-2. Isto tako bolesnici liječeni takrolimusom i sirolimusom pokazali su značajno sniženu agregaciju trombocita i niže vrijednosti tromboksana u urinu u usporedbi s ciklosporinskom skupinom. (95).

I ranija istraživanja zabilježila su kako ciklosporin ubrzava agregaciju trombocita i povećava otpuštanje tromboksana (TxA2) iz trombocita „in vitro“. (98,99) Sahin i autori u svom istraživanju nisu zabilježili razlike u brzini agregacije trombocita između skupine bolesnika liječenih ciklosporinom u odnosu na skupinu na terapiji takrolimusom. (56) Rezultati kasnijeg istraživanja (55) pokazali su niže vrijednosti agregacije trombocita u skupini bolesnika liječenih ciklosporinom u usporedbi sa skupinom koja je uzimala takrolimus, premda razlika nije bila statistički značajna. U zaključku svog istraživanja ukazuju na mogućnost da ciklosporin inducira aktivaciju trombocita bez učinka na agregaciju. Navedeni podaci ukazuje na činjenicu da je agregacija trombocita bila brža u skupini bolesnika liječenih takrolimusom. (55,56)

Rezultati našeg istraživanja mogu se usporediti s istraživanjima Sahina i autora (55,56) te, s obzirom na činjenicu da su ranija istraživanja provedena u „in vitro“ uvjetima, osnažuju njihove zaključke prema kojima se takrolimus povezuje s bržim stvaranjem trombocitnog čepa odnosno bržom agregacijom trombocita kod bolesnika s transplantiranim bubregom. Time bi se skupina bolesnika liječenih takrolimusom mogla povezati s većom vjerojatnošću nastanka akutnih srčanožilnih komplikacija, odnosno mogla bi se promatrati kao skupina povišenog rizika.

Kod COL/ADP testa, izmjerene vrijednosti bile su većinom unutar referentnih granica, no ispitanici u grupi koja je uzimala sirolimus imali su statistički značajno niže vrijednosti u odnosu na kontrolu ($p=0,010$.), što bi se moglo povezati s bržim stvaranjem trombocitnog ugruška u skupini liječenoj sirolimusom. Time bi se bolesnici u skupini liječenih sirolimusom mogli smatrati povišenog rizika za razvoj srčanožilnih komplikacija.

Skupinu ispitanika liječenih sirolimusom karakteriziraju znatno stariji ispitanici u odnosu na skupine na ciklosporinu i takrolimusu, najdulje vrijeme provedeno na dijalizi prije

transplantacije (medijan 6,5 godina, premda vrijednosti nisu bile statistički značajne), te značajno dulje vrijeme proteklo od transplantacije u usporedbi s ostalim skupinama, s medijanom od 65 mjeseci ($p < 0,001$). Isto tako značajno veći broj ispitanika liječenih sirolimusom bio je i na terapiji statinima u odnosu na ostale skupine.

Rezultati dosadašnjih istraživanja vezano uz učinak sirolimusa na agregaciju trombocita bilježe oprečne zaključke. Zabilježene su niže vrijednosti tromboksana A2 (TxA2) u bolesnika liječenih sirolimusom što je u skladu s podacima kako sirolimus inhibira sintezu COX-1 u zrelih trombocitima „in vitro“.(100) Tromboxan A2, koji potencira agregaciju trombocita, sintetiziraju zreli trombociti nakon aktivacije, stoga se navedeni podatak može povezati sa smanjenom agregacijom trombocita. (95)

Kasnija istraživanja pokazala su u „in vitro“ uvjetima, povezanost viših koncentracija sirolimusa s pojačanom agregacijom trombocita u odgovoru na ADP. (58) Isto tako zabilježena je povećana osjetljivost trombocita na ADP ovisno o dozi, nakon izlaganja djelovanju sirolimusa u „in vitro“ uvjetima. (57) Prema rezultatima navedenog istraživanja (57), sirolimus značajno pojačava agregaciju i sekreciju trombocita ovisno o dozi. Povećane vrijednosti agregacije trombocita posljedica su izravnog učinka sirolimusa na funkciju trombocita. (57)

S obzirom na različita saznanja i oprečne rezultate dosadašnjih kliničkih ispitivanja u „in vitro“ uvjetima, potrebna su daljnja istraživanja koja bi dala dodatna saznanja o mogućem kardioprotektivnom potencijalu različitih imunosupresivnih lijekova.

5.3 Povezanost vremena proteklog od transplantacije s bržom agregacijom trombocita kod skupine bolesnika liječenih takrolimusom i sirolimusom

Pri promatranju rezultata našeg istraživanja potrebno je uzeti u obzir ograničeni broj bolesnika kao i razlike između ispitivanih skupina. Ispitanici su bili podijeljeni u 4 skupine ovisno o vrsti imunosupresiva koji su uzimali u terapiji odbacivanja. U ciklosporinsku skupinu bilo je uključeno je 24 ispitanika, prosječne starosti 48,42 godine te s medijanom dobi 50,5. Skupina koja je uzimala takrolimus imala je 26 ispitanika s medijanom dobi 51, dok je u skupinama ispitanika koji su uzimali everolimus i sirolimus bilo uključeno 19

odnosno 16 ispitanika, s medijalnom dobi 62 odnosno 63,5. Zabilježena je značajna razlika u dobi između ispitivanih skupina ($p < 0,001$); skupine koje su uzimale ciklosporin i takrolimus bile su značajno mlađe. Ispitanici koji su uzimali ciklosporin bili su značajno mlađi u odnosu na one koji su uzimali everolimus ($p < 0,001$) i sirolimus ($p = 0,007$), kao i oni koji su uzimali takrolimus u odnosu na everolimus ($p = 0,001$) i sirolimus ($p = 0,012$).

Ispitivane skupine značajno su se razlikovale u vremenu proteklom od transplantacije ($p < 0,001$). Ispitanici u skupini koja je uzimala takrolimus imali su najkraće vrijeme proteklo od transplantacije, s medijanom od 8 mjeseci (3 -21 mjesec), dok je vrijeme od transplantacije bilo najduže u skupini koja je uzimala sirolimus s medijanom od 65 mjeseci (39-114 mjesec).

Prema dostupnim saznanjima, različite metode nadomještanja bubrežne funkcije u prijetransplantacijskom razdoblju imaju različiti tromboembolijski potencijal; tako bolesnici na peritonejskoj dijalizi pokazuju hiperkoagulabilnost, za razliku od onih na hemodijalizi. (101,102) Vjerojatno je za pretpostaviti kako ti bolesnici zadržavaju isti tromboembolijski potencijal i u ranom poslije transplantacijskom razdoblju. Stoga je važno poznavati metodu nadomještanja bubrežne funkcije u prijetransplantacijskom razdoblju. (103,104)

U našem istraživanju u prijetransplantacijskom razdoblju zabilježeno je nadomještanje bubrežne funkcije najvećim dijelom metodom hemodijalize. Najveći postotak ispitanika kod kojih je bubrežna funkcija u prijetransplantacijskom razdoblju nadomješšana metodom peritonejske dijalize, zabilježena je u skupini bolesnika liječenih takrolimusom, premda razlika nije bila statistički značajna.

Unatoč oskudnim saznanjima o učinku mTOR inhibitora na funkciju trombocita, podaci dostupni u literaturi su kontroverzni. Nedavno istraživanje pokazalo je kako primjena sirolimusa tijekom duljeg vremenskog razdoblja može izmijeniti ulazak kalcija u stanicu, što je posebice zabilježeno kod primjene sirolimusa u trajanju od 24-36 mjeseci. Rezultati istraživanja ukazali su na činjenicu da dugotrajno liječenje sirolimusom mijenja homeostazu kalcija i funkciju trombocita u bolesnika s transplantiranim bubregom. (105)

Nije zabilježena statistički značajna razlika u indeksu tjelesne mase (BMI, eng. body mass index) niti trajanju dijalize prije transplantacije, premda su ispitanici u grupi ispitanika na takrolimusu bili kraće vrijeme dijalizirani od ostalih grupa s medijanom od 2,5 godine, u usporedbi s ispitanicima na everolimusu i sirolimusu koji su prije transplantacije dijalizirani dulje vrijeme; medijan 5 godina za everolimus, odnosno 6 godina za sirolimus.

U promatranim kliničkim laboratorijskim vrijednostima, nije bilo značajne razlike u vrijednostima hemoglobina niti broju trombocita i leukocita, dok je statistički značajna razlika zabilježena u broju eritrocita, koji je bio najniži u grupi ispitanika na takrolimusu.

Usporedbom s rezultatima dostupnih kliničkih istraživanja nismo mogli utvrditi povezanost vremena proteklog od transplantacije kao niti povezanost kraćeg trajanja dijalize u prijetransplantacijskom razdoblju s bržom agregacijom trombocita u skupinama liječenim takrolimusom i sirolimusom. Posebice s obzirom na činjenice kako je u skupini liječenoj takrolimusom zabilježeno najkraće vrijeme proteklo od transplantacije i najkraće trajanje dijalize u prijetransplantacijskom razdoblju, dok su u skupini liječenoj sirolimusom ispitanici bile najdulje dijalizirani uz nadulje vrijeme proteklo od same transplantacije. Isto tako nismo mogli utvrditi povezanost smanjenog broja eritrocita u skupini bolesnika liječenih takrolimusom s bržom agregacijom trombocita. Stoga se može zaključiti da je brža agregacija trombocita povezana upravo sa samim djelovanjem tih lijekova.

5.4 Povezanost liječenja statinima s agregacijom trombocita kod skupine bolesnika liječenih sirolimusom

Značajno veći broj ispitanika liječenih sirolimusom, u odnosu na ostale ispitivane skupine, bio je istodobno i na terapiji statinima. Dosadašnja istraživanja pokazala su značajno sporiju agregaciju trombocita u odgovoru na ADP, bez obzira na vrstu statina koji se koristio u liječenju hiperlipidemije. (106,107) Takav rezultat pokazalo je i istraživanje o učinku atorvastatina na agregaciju trombocita kod bolesnika s koronarnom bolešću, u kojem je zabilježena značajno sporija agregacija trombocita povezana s terapijom atorvastatinom. (107) Zabilježen je pozitivan učinak statina na trombotske vaskularne događaje zbog njihovog djelovanja na trombocite u smislu smanjene aktivnosti. (108)

Isto tako istraživanja ukazuju na izravan antitrombotski učinak atorvastatina koji doprinosi učinkovitosti prevencije srčanožilnih događaja. Bolje karakteristike krvnog protoka dodatno objašnjavaju koristan učinak atorvastatina na rizik srčanožilnih događaja u bolesnika s hiperkolesterolemijom i aterosklerotičkom bolešću. (109).

Uzimajući u obzir rezultate dostupnih kliničkih istraživanja, prema kojima statini pokazuju upravo suprotan učinak na agregaciju trombocita u smislu sporije agregacije i povoljnog učinka na srčanožilne događaje, nismo mogli utvrditi povezanost učinka terapije statinima na brže stvaranje trombocitnog ugruška u skupini ispitanika liječenih sirolimusom.

Suprotno očekivanom učinku statina, naši rezultati ukazuju na brže stvaranje trombocitnog ugruška u ispitivanoj skupini liječenoj sirolimusom unatoč istodobno značajno većem broju ispitanika na terapiji statinima. Stoga bi se moglo zaključiti da je brža agregacija trombocita u skupini ispitanika liječenih sirolimusom posljedica izravnog učinka samog lijeka.

5.5 Povezanost spola s rezultatima istraživanja

Prema rezultatima našeg istraživanja, ispitanici na terapiji sirolimusom, u odnosu na kontrolu, imaju 10,2 puta veću vjerojatnost loših ispitivanih vrijednosti (COL/ADP < 71s), kontrolirano i na dob i na spol. Ženski spol smanjuje vjerojatnost loših ispitivanih vrijednosti u odnosu na kontrolu, dok muški spol značajno povećava vjerojatnost loših ispitivanih vrijednosti (COL/ADP < 71s) i to za 2,63 puta, drugim riječima muškarci imaju 2,63 puta veću vjerojatnost za niže vrijednosti COL/ADP testa, odnosno vrijednosti ispod donje granice od 71s. Ovim statističkim modelom objašnjeno je samo 20% rezultata, stoga se može zaključiti da postoji veliki broj drugih čimbenika koji utječu na rezultat.

Opći čimbenici koji doprinose kardiovaskularnom riziku uključuju stariju životnu dob, muški spol, hiperlipidemiju, pušenje, prekomjernu tjelesnu težinu, manjak kretanja, hiperglikemija i hiperhomocisteinemija. (110) Premda transplantacija uklanja čimbenike rizika za nastanak srčanožilnih bolesti obnavljanjem funkcije bubrega, dovodi do razvoja novih rizika koji su djelomice vezani uz primjenu imunosupresijske terapije. Stoga je čimbenike rizika za razvoj srčanožilnih bolesti potrebno prepoznati i intenzivno liječiti prije same transplantacije, te potom prilagoditi imunosupresijske protokole i individualizirati terapiju za svakog pojedinog bolesnika kako bi se smanjio pobol i smrtnost od srčanožilnih bolesti u rizičnoj populaciji bolesnika s transplantiranim bubregom. (111)

Vezano uz utjecaj spola na agregaciju trombocita, dosadašnja istraživanja zabilježila su oprečne rezultate. Tvrdnje o povezanosti spola s funkcijom trombocita prvi put su zabilježena u istraživanjima prije više od 30 godina. (112) Biološke razlike u građi stijenci krvnih žila između muškaraca i žena, kao i izravan utjecaj hormona (estrogena, progesterona, androgena) na trombocite odnosno njihovog indirektnog učinka na krvne žile, činile su temelj ovih pretpostavki s fiziološkog stanovišta. (113,114)

Zabilježena je jača aktivnost trombocita kod žena, dok je odgovor na terapiju aspirinom bio sličan ili čak jači kod žena u usporedbi s muškim ispitanicima. (115,116) Isto tako, istraživanje ovisnosti spola o učinkovitosti antitrombotske terapije pokazalo je jaču aktivnost trombocita kod žena, no apsolutna razlika između spolova bila je mala te stoga vjerojatnost lošije prognoze kod žena nije bila značajna. (117) Slični rezultati zabilježeni su i kod ispitivanja agregacije trombocita u zdravih dobrovoljaca, kada je utvrđena jača agregabilnost trombocita kod ženskih ispitanika. (118)

Iako su dosadašnja istraživanja zabilježila jaču aktivnost trombocita kod žena, u istraživanju utjecaja različitosti spola na agregaciju trombocita u zdravih dobrovoljaca mjereno optičkom metodom, nije zabilježena značajna razlika u agregaciji trombocita između muških i ženskih ispitanika. Zaključeno je kako razlika u spolu nema utjecaja na agregaciju trombocita. (119)

Novija istraživanja o utjecaju spola i vrste tkiva na promjene u mTOR signalnim putu vezano uz dob, pokazala su kako starenje nema izravan utjecaj na pojačavanje mTOR signalnog puta, te se stoga rapamicin kao mTOR inhibitor ne može povezati s duljim životnim vijekom zbog poništavanja tog učinka. Naime ranije pretpostavke upućivala su na povezanost sirolimusa, kao inhibitora mTOR signalnog puta, s duljim životnim vijekom ženki miševa. (120)

I druga istraživanja zabilježila su različit učinak sirolimusa na mužjake i ženke miševa. Prema dostupnim podacima, sirolimus produljuje životni vijek miševa ovisno o spolu. Isto tako proteini mTOR signalnog puta pokazuju značajnije promjene u tkivu ženki u usporedbi s tkivom mužjaka. (121)

Rezultati našeg istraživanja bilježe, kod ispitanika na terapiji sirolimusom, povećani rizik brže agregacije trombocita vezan uz muški spol u odnosu na kontrolu. Podaci iz dostupnih kliničkih istraživanja ukazuju na različiti učinak sirolimusa ovisno o vrsti tkiva odnosno spolu. Isto tako proturječni su podaci vezani uz utjecaj spola na agregaciju trombocita, tako je

zabilježeno kako je ženski spol povezan s bržom agregacijom trombocita, dok je isto tako muški spol naveden kao rizičan za nastanak srčanožilnih događaja.

Vezano uz naše istraživanje, obzirom na značajno veći broj žena u kontrolnoj skupini, ne možemo se složiti s dostupnim podacima koji ukazuju na povezanost ženskog spola s bržom agregacijom trombocita. Stoga se može zaključiti da je brža agregacija trombocita u skupini ispitanika liječenih sirolimusom povezana upravo sa samim učinkom lijeka, dok je utjecaj sirolimusa na agregaciju trombocita kod muškog spola potrebno dodatno istražiti.

6 Zaključci

U skladu s rezultatima našeg istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

1. U skupini ispitanika liječenih imunosupresijskom terapijom zabilježene su niže vrijednosti COL/EPI i COL/ADP testa, odnosno brže stvaranje trombocitnog ugruška u odnosu na kontrolu. Stoga bi se imunosupresijska terapija mogla bi se smatrati jednim od rizika za nastanak akutnih srčanožilnih događaja.
2. Statistički je značajno više ispitanika liječenih imunosupresijskom terapijom imalo vrijednosti COL/ADP testa ispod donje referentne vrijednosti (<71s) u usporedbi s kontrolom, čime bi se mogli svrstati u rizičnu skupinu za nastanak akutnih srčanožilnih događaja. Time bi se ispitivana skupina mogla smatrati rizičnom.
3. Gledajući vrijeme nastanka trombocitnog ugruška u oba testa, COL/EPI i COL/ADP, u našem istraživanju izmjerene vrijednosti bile su većinom unutar referentnih granica. Značajne razlike u brzini nastanka trombocitnog ugruška zabilježene su između pojedinih skupina ispitanika koji su liječeni različitim imunosupresijskim lijekovima, odnosno kontrole i to: brže stvaranje trombocitnog ugruška u skupini liječenoj takrolimusom u odnosu na ciklosporinsku skupinu i kontrolu, te brže stvaranje trombocitnog ugruška u skupini liječenoj sirolimusom u odnosu na kontrolu.
4. Liječenje takrolimusom i sirolimusom moglo bi se povezati s bržim stvaranjem trombocitnog ugruška odnosno bržom agregacijom trombocita kod bolesnika s transplantiranim bubregom. Time bi se liječenje takrolimusom odnosno sirolimusom moglo povezati s većom vjerojatnošću nastanka akutnih srčanožilnih događaja, odnosno moglo bi se promatrati kao jedan od čimbenika rizika.
5. Ispitanici u skupini koja je uzimala takrolimus imali su najkraće vrijeme proteklo od transplantacije, dok je vrijeme od transplantacije bilo najduže u skupini koja je uzimala sirolimus. Usporedbom s rezultatima dostupnih kliničkih istraživanja nismo mogli utvrditi povezanost vremena proteklog od transplantacije kao niti povezanost kraćeg trajanja dijalize u prijetransplantacijskom razdoblju s bržom agregacijom trombocita u skupinama liječenim takrolimusom i sirolimusom.
6. Isto tako, nismo mogli utvrditi povezanost smanjenog broja eritrocita u skupini bolesnika liječenih takrolimusom s bržom agregacijom trombocita. Stoga se može zaključiti da je

brža agregacija trombocita povezana upravo sa samim djelovanjem takrolimusa odnosno sirolimusa.

7. Značajno veći broj ispitanika liječenih sirolimusom, u odnosu na ostale ispitivane skupine, bio je istodobno i na terapiji statinima. Uzimajući u obzir rezultate dostupnih kliničkih istraživanja, prema kojima statini pokazuju upravo suprotan učinak na agregaciju trombocita u smislu sporije agregacije i povoljnog učinka na srčanožilne događaje, nismo mogli utvrditi povezanost učinka terapije statinima na brže stvaranje trombocitnog ugruška u skupini ispitanika liječenih sirolimusom. Suprotno očekivanom učinku statina, naši rezultati ukazuju na brže stvaranje trombocitnog ugruška u ispitivanoj skupini liječenoj sirolimusom unatoč istodobno značajno većem broju ispitanika na terapiji statinima. Stoga bi se moglo zaključiti da je brža agregacija trombocita u skupini ispitanika liječenih sirolimusom posljedica izravnog učinka samog lijeka.
8. Prema rezultatima našeg istraživanja, ispitanici na terapiji sirolimusom, u odnosu na kontrolu, imaju 10,2 puta veću vjerojatnost loših ispitivanih vrijednosti (COL/ADP < 71s), kontrolirano i na dob i na spol. Osim toga, muški spol značajno povećava vjerojatnost loših ispitivanih vrijednosti (COL/ADP < 71s) i to za 2,63 puta, drugim riječima muškarci imaju 2,63 puta veću vjerojatnost za niže vrijednosti COL/ADP testa odnosno brže stvaranje trombocitnog ugruška.
9. Vežano uz utjecaj spola na agregaciju trombocita, dosadašnja istraživanja zabilježila su proturječne rezultate: od brže agregabilnost trombocita kod žena, do toga da razlika u spolu nema utjecaja na agregaciju trombocita. Suprotno očekivanom, rezultati našeg istraživanja ukazuju kako je rizik bržeg stvaranja trombocitnog ugruška kod ispitanika liječenih sirolimusom povezan s muškim spolom.
10. Podaci iz dostupnih kliničkih istraživanja upućuju na mogući različiti učinak sirolimusa ovisno o vrsti tkiva odnosno spolu, vezano uz promjene u mTOR signalnom putu, stoga je povezanost učinka sirolimusa na agregaciju trombocita kod muškog spola potrebno dodatno istražiti.
11. U skupini ispitanika koji su liječeni everolimusom vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (s) kod COL/EPI i COL/ADP testa, bilo je unutar referentnih granica bez zabilježenog značajnijeg odstupanja u odnosu na druge ispitivane skupine kao niti na kontrolu.

12. Teško je procijeniti koliki je doprinos brže agregacije trombocita, u sklopu terapije pojedinim imunosupresivima, na pobol i smrtnost od srčanožilnih bolesti kod bolesnika s transplantiranim bubregom, u odnosu na utjecaj tradicionalnih i ostalih čimbenika rizika.
13. Rezultati našeg istraživanja mogli bi imati kliničku vrijednost kroz individualizaciju imunosupresijskih protokola prema čimbenicima rizika svakog pojedinog bolesnika, no osjetljivost testa i klinički značaj rezultata ovog istraživanja potrebno je upotpuniti dodatnim kliničkim ispitivanjima.

7 Sažetak

Utjecaj imunosupresiva na brzinu agregacije trombocita u bolesnika s transplantiranim bubregom

Uvod Transplantacija bubrega je metoda izbora u liječenju bolesnika sa završnim stadijem kronične bubrežne bolesti. Karakterizirana je boljim preživljavanjem bolesnika i boljom kvalitetom života. Uspjeh transplantacije uvelike ovisi o imunosupresivskoj terapiji. Zlatni standard u liječenju čini trojna imunosupresivska terapija koja uključuje steroid, inhibitor kalcineurina i antiproliferativni lijek, uz indukciju protutijelima. Imunosupresivska terapija povezana je s povećanim rizikom razvoja tromboembolijskih komplikacija i sveukupnim povećanim rizikom za razvoj srčanožilnih bolesti. Kako su srčanožilne bolesti vodeći uzrok smrti u bolesnika s transplantiranim bubregom, pozornost je sve više usmjerena na moguće dugoročno štetne učinke imunosupresivnih lijekova koji se koriste u terapiji odbacivanja. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj različitih imunosupresiva na agregaciju trombocita u bolesnika s transplantiranim bubregom i stabilnom funkcijom presatka. **Materijali i metode** U istraživanje su bili uključeni bolesnici s transplantiranim bubregom koji su se redovito kontrolirali u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju, Klinike za unutrašnje bolesti KBC Rebro, u razdoblju od 3 mjeseca. Prema bolničkom protokolu, u terapiji održavanja, bolesnici s transplantiranim bubregom uzimali su tzv. "trojnu imunosupresivsku terapiju" koja uključuje kortikosteroid, inhibitor kalcineurina i antiproliferativni lijek. Svi ispitanici bili su upoznati sa svrhom istraživanja i potpisali su informirani pristanak. Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC Zagreb. Tijekom redovitih kontrolnih pregleda, zajedno s uzrocima za standardne laboratorijske nalaze, uzeta su dodatna 2 ml krvi od svih transplantiranih bolesnika koji su zadovoljili kriterije za uključivanje u istraživanje. Ispitanicima iz kontrolne grupe uzeta su 2 ml krvi za ispitivanje funkcije trombocita, uz anamnestički dobivene podatke o dobi i spolu. Ispitivanje funkcije trombocita provedeno je iz uzorka pune krvi, na analizatoru funkcije trombocita PFA-200 (Simens Healthcare Diagnostics), u ambulantnim uvjetima. PFA-200 je specifični analizator funkcije trombocita koji „in vitro“ oponaša fiziološke brzine protoka krvi u arterijama odnosno proces adhezije i agregacije trombocita. Primjenjuje se za ispitivanje primarne, o trombocitima ovisne, hemostaze. Mjeri se vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (CT, eng. *closure time*) u prisutnosti kolagena i adrenalina (COL/EPI), te kolagena i ADP-a (COL/ADP). Normalne vrijednosti nalaze se u rasponu od 85–165 s za COL/EPI test, te 71–

118 s za COL/ADP test. Drugi potrebni podaci, za bolesnike s transplantiranim bubregom uzeti su iz medicinske dokumentacije. Kontrolna skupina uključivala je zdrave dobrovoljce.

Rezultati U istraživanje je bilo uključeno 85 odraslih bolesnika s transplantiranim bubregom (50 muškaraca i 35 žena, životne dobi 29-76 godina), podijeljenih u 4 skupine ovisno o vrsti imunosupresiva koji uzimaju u terapiji odbacivanja: ciklosporin, takrolimus, everolimus ili sirolimus. Kontrolna grupa uključivala je 30 zdravih dobrovoljaca oba spola. Gledajući vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (s) kod COL/EPI testa, izmjerene vrijednosti bile su većinom unutar referentnih granica, no ispitanici koji su uzimali takrolimus imali su statistički značajno kraće vrijeme nastanka trombocitnog ugruška u odnosu na kontrolu ($p=0,006$), i na ispitanike koji su primali ciklosporin ($p=0,031$). Kod COL/ADP testa, izmjerene vrijednosti bile su većinom unutar referentnih granica, no ispitanici u grupi koja je uzimala sirolimus imali su statistički značajno niže vrijednosti u odnosu na kontrolu ($p= 0,010$)

Rasprava i zaključak Uspoređujući vrijednosti agregacije između pojedinih imunosupresiva, vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (s) kod COL/EPI testa, bilo je većinom unutar referentnih granica, no ispitanici koji su uzimali takrolimus imali su statistički značajno kraće vrijeme nastanka trombocitnog ugruška u odnosu na kontrolu ($p=0,006$), i na ispitanike koji su primali ciklosporin ($p=0,031$). Isto tako, kod COL/ADP testa, izmjerene vrijednosti bile su većinom unutar referentnih granica, no ispitanici u grupi koja je uzimala sirolimus imali su statistički značajno niže vrijednosti u odnosu na kontrolu ($p= 0,010$). Osjetljivost testa i klinički značaj ovih saznanja potrebno je ispitati u danjim istraživanjima. U grupa ispitanika koji su liječeni everolimusom vrijeme nastanka trombocitnog ugruška (s) kod COL/EPI i COL/ADP testa, bilo je unutar referentnih granica bez zabilježenog značajnijeg odstupanja u odnosu na druge ispitivane skupine kao niti na kontrolu. Ovi rezultati mogli bi imati kliničku vrijednost kroz individualizaciju imunosupresivnih protokola prema čimbenicima rizika svakog pojedinog bolesnika, no osjetljivost testa i klinički značaj rezultata ovog istraživanja potrebno je upotpuniti dodatnim kliničkim istraživanjima.

8 Summary

Effect of Immunosuppressive Agents on Platelet Aggregation in Renal Transplant Patients

Introduction Renal transplantation is the treatment of choice for patients with end stage renal disease meaning better survival and quality of life. The success of transplantation depends largely on immunosuppressive therapy. The major immunosuppressive agents that are currently being used in various combination regimens are corticosteroids, azathioprine, mycophenolate mofetil (MMF), cyclosporine, tacrolimus, everolimus, and sirolimus. Immunosuppressive therapy is associated with an increase risk of thromboembolic complications and overall increased risks of morbidity and mortality from cardiovascular disease. Main goal of the study was to investigate the effect of different immunosuppressive agents on platelet aggregation in renal transplant patients with stable graft function. **Materials and methods** The study included renal transplant patients which were controlled in the Department of Nephrology, Hypertension, Dialysis and Renal Transplantation in Clinical Hospital Center Zagreb, during 3 months period, after providing the informed consent. During the regular visit, together with blood sampling for standard laboratory parameters, an additional 2 ml of blood was taken for testing platelet aggregation, from all patients who met the inclusion criteria. Platelet function testing was performed on platelet function analyzer (PFA-200) that „*in vitro*“ simulates the process of aggregation and platelet activation. The test simulates primary hemostasis through interaction of platelets with the aperture of a membrane at the end of the capillary which is coated with collagen and either adenosine diphosphate (COL-ADP) or epinephrine (COL-EPI). Results are reported as the closure time (CT) in seconds for COL-EPI and COL-ADP cartridges. The ranges for control subjects were 85–165 s for the COL - EPI closure time, and 71–118 s for the COL -ADP closure time. Data for analysis for renal transplant patients were taken from the medical records. Control group included healthy individuals. **Results** The study included 85 renal transplant patients (50 male and 35 female, median age 54 (29-76). Patients were divided into four groups based on the type of different immunosuppressive agent (cyclosporine, tacrolimus, everolimus, and sirolimus). All values of „*in vitro*“ closure times (s) with COL-EPI test were within the reference range, but patients in tacrolimus group had significantly lower values compared to controls (98,5 (IQR:89,0-122,8) : (129(IQR: 107,0-147,3); $p=0,006$), and compared to cyclosporine group (98,5(IQR:89,0-122,8) : (123,5 (IQR:98,3-166,0); $p=0,031$). With COL/ADP test, patients in sirolimus group had

significantly lower values compared to controls (77 (67,25-87,5) : (96,5 (85,8 – 105,3); p=0,010). **Discussion and conclusion** Although, all the values of „*in vitro*“ closure times with both tests (COL-EPI and COL-ADP) were within reference range, tacrolimus group of patients showed significantly lower values compared to cyclosporine and to controls, while sirolimus group of patients showed significantly lower values compared only to controls. Platelet aggregation values in everolimus patient group did not show any significant differences. These findings could have a certain clinical value. The sensitivity and clinical relevance of this test findings should be further investigated.

9 Popis literature

1. Morgan EG, Mikhail MS, Murray MJ. Clinical Anesthesiology. 4th edition: Lange, 2006.
2. Guyton JE Hall. Medicinska fiziologija. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada; 2006, str. 291-418.
3. Miller RD, Cohen NH, Erikson LI, Fleisher LA, Winer-Kronish JP, Young WL. Miller's Anesthesia. 8th edition. Elsevier Saunders, 2015. str. 547-656
4. KDOQI clinical practice guidelines for the evaluation and management of chronic kidney disease. Kid Int Supp 2013;2:5-14
5. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. Am J Kidney Dis 2002; 39 (Supp. 1): 1-266
6. De Jong PE, Curhan GC. Screening, monitoring and treatment of albuminuria: Public health perspectives. J Am Soc Nephrol 2006; 17:2120-6
7. Hrvatski registar za nadomještanje bubrežne funkcije. Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju. Dostupno na: <http://www.hdndt.org>
8. Heaf J. Current trends in European renal epidemiology. Clin Kidney J. 2017;10(2):149-153.
9. Zoccali C, Kramer A, Jager KJ. Epidemiology of CKD in Europe: an uncertain scenario. Nephrol Dial Transplant. 2010; 25 (6): 1731-1733.
10. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Interna medicina. 4. izd. Zagreb: Naklada Ljevak, 2008

11. Perrone Rd, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insight into old concept. *Clin Chem* 1992;38:1933-53
12. Harmoinen A, Lehtimaiki T, Korpela M, Turjanmaa V, Saha H. Diagnostic accuracies of plasma creatinine, cystatin C, and glomerular filtration rate calculated by the Cockcroft-Gault and Levey (MDRD) formulas. *Clin Chem* 2003;49:1223-5
13. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing kidney function – measured and estimated glomerular filtration rate. *N Eng J Med* 2006; 354:2473-83
14. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2009;150(9):604-12
15. Levey AS, Coresh J, Greene T, Stevens LA, Zhang YL, Hendriksen S, Kusek JW, Van Lente F; Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration. Using standardized serum creatinine values in the modification of diet in renal disease study equation for estimating glomerular filtration rate. *Ann Intern Med.* 2006;145(4):247-54
16. RemuzziG, Benigni A, Remuzzi A. Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J Clin Invest* 2006; 116:288-96
17. Miller WG, Bruns DE, Hortin GL et al. Current issues in measurement and reporting of urinary albumine excretion. *Clin Chem* 2009; 55:24-38
18. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW et al. National kidney foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003;139:137- 47
19. Levin A. Identification of patients and risk factors in chronic kidney disease--evaluating risk factors and therapeutic strategies. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16 (7):57-60

20. Poslijediplomsko usavršavanje iz anesteziologije, Fondation Europeenne d'Enseignement en Anesthesiologie, F.E.E.A., Hrvatsko društvo za anesteziologiju i intenzivno liječenje HLZ. 2003.
21. Audard V, Matignon M, Dahan K, Lang P, Grimbert P. Renal transplantation from extended criteria cadaveric donors: problems and perspectives overview. *Transpl Int* 2008; 21(1):11-7.)
22. Stratta R.J: Increased Kidney Transplantation Utilizing Expanded Criteria Deceased Organ Donors. *Annals of Surgery*, Vol 239; 2004.
23. Bašić Jukić N, Kaštelan Ž i sur. *Transplantacija bubrega*. Zagreb: Medicinska naklada, 2015.
24. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmakologija*. 5.izd. Zagreb: Golden marketing – Tehnička knjiga, 2005.
25. Zhang R. Modern immunosuppressive therapy in kidney transplantation. *Open Journal of Organ Transplant Surgery* 2013; 3: 22-31
26. Lee RA, Gabardi S. Current trends in immunosuppressive therapies for renal transplant recipients. *Am J Health Syst Pharm*. 2012;69(22):1961-75
27. Marcén R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs*. 2009;69(16):2227-43
28. European Medicines Agency. Summary of product characteristics. CellCept SmPC 2016; EMA; Dostupno na: www.ema.europa.eu
29. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med*. 2004;351:2715

30. Gonwa T, Mendez R, Yang HC, Weinstein S, Jensik S, Steinberg S. Randomized trial of tacrolimus in combination with sirolimus or mycophenolate mofetil in kidney transplantation: results at 6 months. *Transplant* 2003;75:1213-20
31. Morice M-C, Serruys PW, Sousa JE, et al. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med* 2002; 346:1773-80
32. Liefeldt L, Budde K. Risk factors for cardiovascular disease in renal transplant recipients and strategies to minimize risk. *Transpl Int* 2010; 23:1191-1204
33. Neale J et al. Cardiovascular risk factors following renal transplant. *World J Transplant* 2015; 5(4): 183-195
34. Meir Kriesche HU, Balinga R, Kaplan B. Decreased renal function is a strong risk factor for cardiovascular death after renal transplantation. *Transplantation* 2003;75:1291
35. Opelz G, Dohler B. Improved long-term outcomes after renal transplantation associated with blood pressure control. *Am J Transplant* 2005; 5:2725
36. Kasiske BL, Anjum S, Shah R et al. Hypertension after kidney transplantation. *Am J Kidney Dis* 2004.; 43: 1071
37. Kidney disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) blood pressure work group. KDIGO clinical practice guidelines for the management of blood pressure in chronic kidney disease. *Kidney Inter* 2012; 2 Suppl: 337 – 414
38. UK renal Association clinical Practice Guidelines Committee. Guideline: Post-operative care of kidney transplant recipient. 5th edit. 2011.

39. Hjelmesaeth J, Hartmann A, Leivestad T, Holdaas H, Sagedal S, Olstad M, Jenssen T. The impact of early-diagnosed new-onset post-transplantation diabetes mellitus on survival and major cardiac events. *Kidney Int* 2006; 69: 588-595
40. Boots JM, Christiaans MH, van Hooff JP. Effect of immunosuppressive agents on long-term survival of renal transplant recipients: focus on cardiovascular risk. *Drugs* 2004; 64:2047-2073
41. Weir MR. Microalbuminuria and cardiovascular disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2007;2(3):581-90. ;
42. Ninomiya T, Perkovic V, de Galan BE, et al. Albuminuria and kidney function independently predict cardiovascular and renal outcomes in diabetes. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(8):1813-21.
43. So WY, Kong AP, Ma RC, et al. Glomerular filtration rate, cardiorenal end points, and all-cause mortality in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2006;29(9):2046-52
44. Raju NC, Eikelboom JW, Hirsh J. Platelet ADP-receptor antagonists for cardiovascular disease: past, present and future. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2008; 5: 766-780
45. Michelson AD. Platelet Function Testing in Cardiovascular Diseases. *Circulation.* 2004;110:489-493
46. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002;8:1227–1234
47. Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, Hsieh K, Vlcek M, Losert H, Domanovits H, Schreiber W, Laggner AN, Jilma B. Platelet Function Predicts Myocardial Damage in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation.* 2004;110:1392-1397

48. Reny JL, De Moerloose P, Dautat M, Fontana P. Use of the PFA-100 closure time to predict cardiovascular events in aspirin-treated cardiovascular patients: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost.* 2008;6:444–450
49. Lanza GA, Sestito A, Iacovella S, Morlacchi L, Romagnoli E, Schiavoni G, Crea F, Maseri A, Andreotti F. Relation between platelet response to exercise and coronary angiographic findings in patients with effort angina. *Circulation* 2003; 107:1378-82.
50. Katz JN, Kolappa KP, Becker RC. Beyond thrombosis: the versatile platelet in critical illness. *Chest.* 2011;139:658–668
51. Caudrillier A, Kessenbrock K, Gilliss BM, et al. Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. *J Clin Invest.* 2012;122:2661–2671
52. Badimon L, Vilahur G. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med.* 2014;276(6):618–632
53. George JN. Platelets. *Lancet.* 2000; 355:1531-1539
54. Grace AA, Barradas MA, Mikhailidis DP et al. Cyclosporine A enhances platelet aggregation. *Kidney Int* 1987; 32: 889-895
55. Sahin G, Akay OM, Bal C, Yalcin AU, Gulbas Z. The effect of calcinurin inhibitors on endothelial and platelet function in renal transplant patients. *Clin Nephrol.* 2011; 76 (3): 218-25
56. Sahin G, Akay OM, Bal C, Yalcin AU, Gulbas Z. Effect of immunosuppressive drugs on platelet aggregation and soluble P-selectin in renal transplant patients. *Ren Fail.* 2009; 31 (2): 111-117.

57. Babinska A, Merckell MS, Salifu MO, Akoad M, Ehrlich YH, Kornecki E. Enhancement of human platelet aggregation and secretion induced by rapamycin. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 3153-3159.
58. Wu Q, Huang KS, Chen M, et al. Rapamycin enhances platelet aggregation induced by adenosine diphosphate in vitro. *Platelets*. 2009; 20: 428-31
59. Jalal DI, Chonchol M, Targher G. Disorder of hemostasis associated with chronic kidney disease. *Seminars in thrombosis and hemostasis* 2010;1(36):34-40
60. Furie B, Furie BC. Mechanism of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008;359 (9): 938-949
61. Barash PG, Stoelting RK, Cullen BF. *Clinical Anesthesiology*. 5th edition: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
62. Labar B, Hauptmann E, i sur. *Hematologija*. 4. izd. Zagreb: Školska knjiga, 2007.
63. Michelson AD. How platelets work: platelet function and dysfunction. *J Thromb Thrombolysis*. 2003;16:7–12
64. Gabrielli A, Layon J, Yu M. Civetta, Taylor and Kirby's *Critical Care*. 4th edition: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
65. Paniccia R, Priora R, Liotta AL, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag*. 2015; 11: 133–148
66. Favalaro EJ. Clinical application of the PFA-100. *Curr Opin Hematol*. 2002;9:407–415
67. Michelson AD, Frelinger AL, 3rd, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol*. 2006;98:4N–10N

68. Harrison P. The role of PFA-100 testing in the investigation and management of haemostatic defects in children and adults. *Br J Haematol.* 2005;130:3–10
69. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer – PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21: 106–12
70. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Ostgaard RA. Characterization of an in vitro platelet function analyzer – PFA-100. *Clin Appl Thromb Hemost* 1996; 2: 241–9
71. Francis JL. Platelet function analyzer (PFA-100). In: Michelson AD, ed. *Platelets*. San Diego: Academic Press, 2002: 325–35
72. Bilgen AU, Karadogan I, Artac M, Kizilors A, Blogin R, Undar L. Hemodialysis shortens long in vitro closure times as measured by the PFA-100. *Med Sci Monit* 2007; 13(3):141-5
73. Karger R, Reuter K, Rohlf J, Nimsky C, Sure U, Kretschme V. The Platelet Function Analyzer (PFA-100) as a screening tool in neurosurgery. *ISRN Hematol* 2012 ; 2012: 839242
74. Zupan IP, Sabovic M, salobir B, Ponikvar JB, Cernelc P, Lavre J, Vujkovic B. Association between platelet-related hemostasis impairment and functional iron Deficiency in hemodialysis patients. *Ther Apher Dial* 2011; 15: 34-9
75. Hayward CP, Harrison P, Cattaneo M, Ortel TL, Rao AK. Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost.* 2006;4:312–319
76. Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W. Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost.* 2000;83:316–321

77. Marcucci R, Paniccia R, Antonucci E, et al. Residual platelet reactivity is an independent predictor of myocardial injury in acute myocardial infarction patients on antiaggregant therapy. *Thromb Haemost.* 2007;98:844–851
78. Chakroun T, Gerotziafas G, Robert F, et al. In vitro aspirin resistance detected by PFA-100 closure time: pivotal role of plasma von Willebrand factor. *Br J Haematol.* 2004;124:80–85
79. Mannini L, Marcucci R, Paniccia R, et al. Erythrocyte deformability and white blood cell count are associated with aspirin resistance in high-risk vascular patients. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;35:175–18
80. Gianetti J, Parri MS, Sbrana S, et al. Platelet activation predicts recurrent ischemic events after percutaneous coronary angioplasty: a 6 months prospective study. *Thromb Res.* 2006;118:487–493
81. Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, van der Bom JG, Mertens BJ, Huisman MV. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J.* 2007;153:175–181
82. Marcucci R, Paniccia R, Antonucci E, et al. Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol.* 2006;98:1156–1159
83. Crescente M, Di Castelnuovo A, Iacoviello L, Vermylen J, Cerletti C, de Gaetano G. Response variability to aspirin as assessed by the platelet function analyzer (PFA)-100. A systematic review. *Thromb Haemost.* 2008;99:14–26
84. Koscielny J, von Tempelhoff GF, Ziemer S, et al. A practical concept for preoperative management of patients with impaired primary hemostasis. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2004;10:155–166
85. Rechner AR. Platelet function testing in clinical diagnostics. *Hamostaseologie.* 2011;31:79–87

86. Sucker C, Litmathe J, Feindt P, Zotz R. Platelet function analyzer (PFA-100) as a useful tool for the prediction of transfusion requirements during aortic valve replacement. *Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;59:233–236
87. Huczek Z, Filipiak KJ, Kochman J, Piatkowski R, Grabowski M, Roik M, Malek LA, Jaworski P, Opolski G. Baseline platelet reactivity in acute myocardial infarction treated with primary angioplasty--influence on myocardial reperfusion, left ventricular performance, and clinical events. *Am Heart J.* 2007; 154(1):62-70.
88. Linden MD, Furman MI, Frelinger AL 3rd, Fox ML, Barnard MR, Li Y, Przyklenk K, Michelson AD. Indices of platelet activation and the stability of coronary artery disease. *J Thromb Haemost.* 2007;5(4):761-5
89. Klein BC, Bach D, Rehfeld I, et al. Influence of mycophenolic acid and FK-506 on human platelet activation in vitro. *Kidney Blood Press Res.* 2000; 23(2):119-24
90. Muraki T, Sasaki Y, Giddings JC et al. Antithrombotic effect of FK 506 versus prothrombotic effect of cyclosporine in vivo. *Transplantation* 1995; 60:308-10.
91. Muraki T, Taka T, Noguchi T, Ishii H, Seki J, Yamamoto J. Effects of cyclosporine and FK506 on in vitro high shear-induced platelet reactivity in rat and human non-anticoagulated blood. *Transplantation* 1998; 65:1132-4
92. Naik UP, Markell M, Ehrlich YH, Kornecki E. Cyclosporine A enhances agonist-induced aggregation of human platelets by stimulating protein phosphorylation. *Cell Molec Biol Res* 1993; 39: 257-264
93. Fernandes JB, Naik UP, Markell MS, Kornecki E. Comparative investigation of the effects of the immunosuppressants cyclosporine A, cyclosporine G and FK-506 on platelet activation. *Cell Molec Biol Res* 1993; 39: 265-274.

94. Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK 506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK 506 Kidney Transplant Study Group. *Transplantation* 1997;63:977-983
95. Jespersen B, Thiesson HC, Henriksen C, Therland K, Falk C, Poulsen T, Fogh B, Madsen K, Walther S, Jensen BL. Differential effect of immunosuppressive drugs on COX-2 activity in vitro and in kidney transplant patients in vivo. *Nephrol Dial Transplant* 2009;24:1644-1655
96. Bombardier C, Laine L, Reicin A et al. VIGOR Study Group. Comparison of upper gastrointestinal toxicity and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343:1520-1528.
97. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: The human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:272-277.
98. Jokasky DK, Fisher CA, Stahl RF et al. The effects of cyclosporine on human platelet aggregation and thromboxane release. *Transplant Proc* 1989; 21: 948-949.
99. Perico N, Benigni A, Zoja C et al. Functional significance of the exaggerated renal thromboxane A2 synthesis induced by cyclosporin A. *Am J Physiol* 1987; 251: 581-587.
100. Evangelista V, Manarini S, Di Santo A et al. De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin. *Circ Res* 2006; 98: 593-595
101. Kobayashi M, Yorioka N, Yamakido M. Hypercoagulability and secondary hiperfibrinolysis may be related to abnormal lipid metabolism in patients treated with continous ambulatory peritoneal dialysis. *Nephron* 1997; 76:56-61.

102. Bertoli M, Gasparotto ML, Vertolli U et al. Does hypercoagulability exist in CAPD patients? *Perit Dial Bull* 1984; 4:237-9.
103. Kazory A, Ducloux D. Acquired hypercoagulable state in renal transplant recipients. *Thromb Haemost* 2004; 91:646-54.
104. Ojo AO, Hanson JA, Wolfe RA, Agodoa LY, Leavey SF, Leichtman A, Young EW, Port FK. Dialysis modality and the risk of allograft thrombosis in adult renal transplant recipients. *Kidney International* 1999; 55:1952–1960
105. Lopez E, Berna-Ero A, Bermejo N, Brull JM, Martinez R, Pino GG, Alvarado R, Salido GM, Rosado JA, Cubero JJ, Redondo PC. Long-term mTOR inhibitors administration evokes altered calcium homeostasis and platelet dysfunction in kidney transplant patients. *J Cell Mol Med* 2013; 17: 636-647.
106. Sikora J, Kostka B, Marczyk U, Chalubinski M, Broncel M. Effect of statins on platelet function in patients with hyperlipidemia. *Arch Med Sci* 2013;9(4):622-628
107. Tekten T, Ceyhan C, Ercan E, Onbasili AO, Turkoglu C. The effect of atorvastatin on platelet function in patients with coronary artery disease. *Acta Cardiol*. 2004;59(3):311-5
108. Natarajan P, Kanna S, Sahl S, Sathish P, Anand V. Pharmacological Effects of Atorvastatin in Platelet Function and Plaque Rupture. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2016; 6 (07): 189-192
109. Horvath B, Szapary L, Marton Z, Alexy T, Kesmarky G, Toth K. Short-term effects of atorvastatin on haemorheologic parameters, platelet aggregation and endothelium dysfunction in patients with hypercholesterolaemia. *Eur Heart J* 2004; 25 (1): 96
110. Briggs JD. Causes of death after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2001; 16:1545-1549

111. Gill JS. Cardiovascular Disease in Transplant Recipients: Current and Future Treatment Strategies. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008; 3(Suppl 2): S29–S37
112. Johnson M, Ramey E, Ramwell PW. Sex and age differences in human platelet aggregation. *Nature*. 1975;253:355–7
113. Capodanno D, Angiolillo DJ. Impact of race and gender on antithrombotic therapy. *Thromb Haemost*. 2010;104:471–84.
114. Bailey AL, Scantlebury DC, Smyth SS. Thrombosis and antithrombotic therapy in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:284–8
115. Becker DM, Segal J, Vaidya D, et al. Sex differences in platelet reactivity and response to low-dose aspirin therapy. *JAMA*. 2006;295:1420–7
116. Harrison MJ, Weisblatt E. A sex difference in the effect of aspirin on “spontaneous” platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost*. 1983;50:773–4
117. Breet NJ, Sluman MA, VanBerkel MAJ, VanWerkum JW, Bouman HJ, Harmsze AM, Kelder JC, Zijlstra F, Hackeng CM, TenBerg JM. Effect of gender difference on platelet reactivity. *Neth Heart J*. 2011; 19:451–457
118. Haque SF, Matsubayashi H, Izumi SI, Sugi T, Arai T, Kondo A, Makino T. Sex difference in platelet aggregation detected by new aggregometry using light scattering. *Endocrine Journal*. 2000;48(1):33-41.
119. Beyan C, Kaptan K, Ifran A, Savaşçı S, Oztürk Y, Okmen B. Effect of sex difference on platelet aggregation using an optical method in healthy subjects. *Clin Lab Haematol*. 2006;28(1):14-6
120. Baar EL, Carbajal KA, Ong IM, Lamming DW. Sex-and tissue-specific changes in mTOR signaling with age in C57BL/6J mice. *Aging Cell*. 2016;15(1):155-66.

121. Rodriguez KA, Dodds SG, Strong R, Galvan V, Sharp ZD, Buffenstein R. Divergent tissue and sex effects of rapamycin on the proteasome-chaperone network of old mice. *Front Mol Neurosci.* 2014;7:83

10 Popis oznaka i kratica

ADH	antidiuretski hormon
ADP	adenozindifosfat
AVP	arginine vazopresin
AKS	akutni koronarni sindrom
ASA	od engl. <i>American Society of Anesthesiologists</i> , Američko društvo anesteziologa
ASK	acetilsalicilna kiselina
ATP	adenozintrifosfat
ACE	inhibitori angiotenzin konvertirajućeg enzima
APD	automatizirana peritonejska dijaliza
CAPD	kontinuirana ambulantna peritonejska dijaliza
CVD	srčanožilne bolesti
BK	BK virus
BMI	od engl. <i>Body Mass Index</i> ; indeks tjelesne mase
CMV	citomegalovirus
COX	od engl. <i>cyclo-oxygenase</i> , ciklooksigenaza
CT	eng. <i>closure time</i> , vrijeme nastanka trombocitnog ugruška
CRP	C- reaktivni protein
DNA	od engl. <i>deoxyribonucleic acid</i> , deoksiribonukleinska kiselina
EBV	Epstein-Barr virus
FDP	od engl. <i>fibrin degradation product</i> , razgradni proizvodi fibrina

FKBD	od engl. <i>FK binding protein, FK vezni protein</i>
GFR	od engl. <i>glomerular filtration rate</i> , glomerularna filtracija
GP	glikoprotein
HCV	hepatitis C virus
HNL	hormonsko nadomjesno liječenje
HDL	lipoproteini velike gustoće (kolesterol velike gustoće)
HUS	hemolitičko-uremični sindrom
IL	interleukin
IL-2	interleukin 2
JC	JC virus
LDL	lipoproteini male gustoće (kolesterol male gustoće)
NODAT	od engl. <i>new onset diabetes after transplantation</i> , novonastali dijabetes nakon transplantacije
MPV	od engl. <i>Mean platelet volumen</i> , srednji volumen trombocita
NO	dušikov-oksid
NSAID	od engl. <i>nonsteroidal anti inflammatory drug</i> , nesteroidni antiupalni lijek
PFA-100	od engl. <i>Platelet function analyser</i> , analizator funkcije trombocita PFA-100 (Simens Healthcare Diagnostics)
PDGF	od engl. <i>platelet- derived growth factor</i> , trombocitni faktor rasta
PAI	od engl. <i>plasminogen activator inhibitor</i> , inhibitor aktivatora plazminogena
PAR	od engl. <i>protease-activated receptor</i> , proteazom aktivirani receptori
PF	od engl. <i>platelet factor</i> , trombocitni faktor

PGG2	prostaglandin G2
POC	od engl. <i>Point of care</i> , pretrage uz bolesnika
PF3	od engl. <i>Platelet factor 3</i> , trombocitni faktor
PV	protrombinsko vrijeme
TF	od engl. <i>Tissue factor</i> , tkivni faktor
TxA ₂	tromboksan A ₂
tPA	od engl. <i>Tissue plasminogen activator</i> , tkivni aktivator plazminogena
Tx	tromboksan
VLDL	od engl. <i>Very low density lipoprotein</i> , lipoproteini vrlo male gustoće
vWF	von Willebrandov faktor

11 Životopis