

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ines Mesar

Izraženost Wnt 4 u presađenim bubrezima

DISERTACIJA



Zagreb, 2019.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Ines Mesar

Izraženost Wnt 4 u presađenim bubrezima

DISERTACIJA

Zagreb, 2019.

Disertacija je izrađena u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju Kliničkoga bolničkog centra Zagreb i Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Disertacija pod nazivom „Izraženost Wnt 4 u presađenim bubrezima” 105 stranica, 22 tablice, 32 slike

Voditelj istraživanja: prof. dr. sc. Nikolina Bašić-Jukić, dr.med.

Zahvaljujem svojoj profesoric i mentorici prof.dr.sc. Nikolini Bašić Jukić koja mi je omogućila izradu ove doktorske disertacije, na strpljenju, nesebičnom djeljenju znanja i iskustava te svim savjetima kojima me kontinuirano upućivala kako u znanstvenom tako i svakodnevnom kliničkom radu.

Posebno se zahvaljujem kolegici dr.sc. Vesni Furić Čunko na ustupanju baze podataka te svim savjetima i iskustvima koja je nesebično podijelila sa mnom.

Velika zahvala prof.dr.sc. Marijani Čorić na stručnoj pomoći pri patohistološkoj pripremi i analizi materijala.

Hvala prof.dr.sc. Petru Kesu koji me je uz prof. Nikolinu Bašić Jukić uveo u svijet nefrologije i nadomještanja bubrežne funkcije te pružao potporu u cijelokupnom mom radu.

Hvala mom suprugu Vedranu na svojoj podršci i pomoći koju mi je pružio tijekom izrade ove doktorske disertacije.

Posebna zahvala mojim roditeljima bez kojih sva ova postignuća ne bi bila moguća.

POPIS KRATICA

ABMR - akutno odbacivanje posredovano protutijelima (eng. antibody mediated rejection)

APD - automatizirana peritonealna dijaliza (eng. automatic peritoneal dialysis)

BMP – koštani morfogenetski protein (eng. bone morphogenetic protein)

CAPD - kontinuirana ambulantna peritonealna dijaliza (eng. continuous ambulatory peritoneal dialysis)

CNI - inhibitori kalcineurina (eng. calcineurin inhibitors)

CyA - ciklosporin A

DAB - diaminobenzidin

DKK - Dickkopf protein

DSA - donor specifična protutijela (eng. donor specific antibody)

EMT - epitelno mezenhimalne tranzicije

FGF – faktor rasta fibroblasta (eng. fibroblast growth factor)

Fsp1 – fibroblast specifični protein 1 (eng. fibroblast specific protein 1)

GDNF – neurotropni faktor porijekla glijadina (eng. gliadin derived neurotropic factor)

GF - glomerularna filtracija

HD - hemodijaliza

HLA – humani leukocitni antigeni (eng. human leucocyte antigen)

IFTA - intersticijska fibroza i tubularna atrofija

KBB - kronične bubrežne bolesti

KBZ - kronično bubrežno zatajenje

LEF – faktor koji veže limfoidni stimulans (eng. lymphoid enhancer –binding factor)

LRP5 – receptor za lipoprotein niske gustoće (eng. low-density lipoprotein receptor-related protein 5)

MM – podudarnost (eng. mismatch)

MMF - mikofenolatmofetil

MMP-7 - matriks metaloproteinaza 7 (eng. matrix metalloproteinase 7)

mTOR – lijek koji inhibira mTOR kinazu (eng. mammalian target of rapamycin)

NBF - nadomještanja bubrežne funkcije

PAI-1 – aktivator plazminogena 1 (eng. plasminogen activator inhibitor-1)

Pax2 – upareni geni 2 (eng. paired box gene 2)

PD - peritonealna dijaliza

protein FKBP - protein koji veže FK506 (eng. FK506 binding protein)

RAS sustav – renin angiotenzin sustav

RET – receptor za tirozin kinazu (eng. receptor tyrosin kinase)

sFRPs –topivi Frizzeld povezani proteini (eng. soluble Frizzeld related proteins)

TCF – T stanični faktor (eng. T cell factor)

TCMR - akutno odbacivanje posredovano T limfocitima (eng. T-cell mediated rejection)

TGF beta 1 – transformirajući faktor rasta beta1 (eng. transforming growth factor beta 1)

TORC1 –koaktivator transkripcije za CREB1 (eng. transcriptional coactivator for CREB1)

TRPC 6 – prolazni receptorski kanal, član 6 pododbitelji C (eng. transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6)

Tx - transplantacija bubrega

VDR - receptor za vitamin D (eng. vitamin D receptor)

Wnt – (eng. wingless-type MMTV integration site family)

WT1 – protein Wilms tumora (engl. Wilms tumor protein)

SADRŽAJ

1. UVOD I SVRHA RADA.....	1
1.1. RAZVOJ, GRAĐA I FUNKCIJE BUBREGA	2
1.1.1. <i>Embrionalni razvoj bubrega.....</i>	<i>2</i>
1.1.2. <i>Molekularni aspekti embrionalnog razvoja bubrega.....</i>	<i>3</i>
1.1.3. <i>Građa i histologija bubrega.....</i>	<i>4</i>
1.1.4. <i>Funkcije bubrega</i>	<i>6</i>
1.1.5. <i>Zatajenje bubrežne funkcije.....</i>	<i>7</i>
1.1.5.1. <i>Akutno oštećenje bubrega.....</i>	<i>7</i>
1.1.5.2. <i>Kronično bubrežno zatajenje.....</i>	<i>8</i>
1.2. METODE NADOMJEŠTANJABUBREŽNE FUNKCIJE	11
1.2.1. <i>Hemodijaliza</i>	<i>12</i>
1.2.2. <i>Peritonealna dijaliza</i>	<i>12</i>
1.2.3. <i>Dugoročne posljedice liječenja dijalizom.....</i>	<i>13</i>
1.2.4. <i>Transplantacija bubrega.....</i>	<i>13</i>
1.2.5. <i>Imunologija transplantacije.....</i>	<i>14</i>
1.2.6. <i>Imunosupresivni lijekovi</i>	<i>15</i>
1.2.7. <i>Komplikacije liječenja transplantacijom.....</i>	<i>18</i>
1.2.8. <i>Kirurške komplikacije.....</i>	<i>19</i>
1.2.9. <i>Imunološke komplikacije.....</i>	<i>20</i>
1.2.10. <i>Ostale komplikacije (kronična disfunkcija presatka, infekcije).....</i>	<i>27</i>
1.2.11. <i>Kirurško uklanjanje presatka.....</i>	<i>30</i>
1.3. DOSADAŠNJE SPOZNAJE O WNT	31
1.3.1. <i>Obitelj WNT gena.....</i>	<i>31</i>
1.3.2. <i>Signalni put djelovanja WNT.....</i>	<i>31</i>
1.3.3. <i>Uloga Wnt gena u razvoju urogenitalnog sustava</i>	<i>32</i>
1.3.4. <i>Pretpostavljena uloga Wnt u nastanku bubrežne fibroze i glomeruloskleroze.....</i>	<i>34</i>
1.3.5. <i>Moguće terapijske strategije usmjerene na Wnt.....</i>	<i>37</i>
2. HIPOTEZA.....	39
3. CILJEVI RADA	40
3.1. OPĆI CILJ RADA	40
3.2. SPECIFIČNI CILJEVI	40
4. MATERIJALI I METODE	41
4.1. ISPITANICI	41
4.2. KONTROLNA SKUPINA	41
4.3. METODE.....	41
4.3.1. <i>Priprema patohistološkog materijala.....</i>	<i>42</i>
4.3.2. <i>Postupak imunohistokemijskog bojenja</i>	<i>42</i>
4.3.3. <i>Mikroskopiranje.....</i>	<i>43</i>
4.3.4. <i>Etičnost istraživanja</i>	<i>43</i>
4.3.5. <i>Statistička obrada podataka</i>	<i>43</i>

5. REZULTATI	45
5.1. OBILJEŽJA ISPITANIKA	45
5.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE NA WNT 4	50
5.2.1. Usporedba izraženosti Wnt 4 u ispitivanoj i kontrolnoj skupini	51
5.2.2. Obilježja ispitivane skupine prije transplantacije bubrega i utjecaj na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt4	53
5.2.3. Obilježja darovatelja organa i utjecaj na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4	58
5.2.4. Utjecaj HLA podudarnosti na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4	59
5.2.5. Utjecaj imunosupresivne terapije na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4	60
5.2.5.1. Indukcijska terapija	60
5.2.5.2. Inhibitor kalcineurina	61
5.2.5.3. Antiproliferativni lijekovi	62
5.3. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE NA C4D	64
5.4. INDIKACIJE ZA KIRUŠKO UKLANJANJE PRESATKA	65
5.5. ANALIZA FUNKCIJE PRESATKA, PATOHISTOLOŠKIH NALAZA I EPIZODA ODBACIVANJA PRIJE KIRUŠKOG UKLANJANJA PRESATKA	67
5.6. NALAZ HISTOLOGIJE NAKON KIRUŠKOG UKLANJANJA PRESATKA	69
5.6.1. Akutne promjene u patohistološkom nalazu nakon kiruškog uklanjanja presatka	70
5.6.2. Kronične promjene u patohistološkom nalazu nakon kiruškog uklanjanja presatka	71
5.6.3. Patohistološki nalaz toksičnosti lijekova na uzorcima kiruški uklonjenih presađenih bubrega	75
5.6.4. Trajanje hladne ishemije i utjecaj na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4	77
6. RASPRAVA	79
7. ZAKLJUČCI	90
8. SAŽETAK	91
9. SUMMARY	92
10. POPIS LITERATURE	93
11. BIOGRAFIJA	105

1. UVOD I SVRHARADA

Bubrezi (lat. ren, gr. nephro) su parni organi mokraćnog sustava. Obzirom na iznimnu važnost u održavanju homeostaze organizma, bubrezi spadaju u vitalne organe. Sve do otkrića metoda nadomještanja bubrežne funkcije, prvenstveno hemodijalize, a potom i peritonealne dijalize te transplantacije bubrega, život nije bio moguć u slučaju zatajenja bubrežne funkcije ili porođajnih anomalija s nerazvijenim ili neodgovarajuće razvijenim bubrezima. Postupnim razvojem moderne medicine preživljenje i kvaliteta života oboljelih od bubrežnih bolesti se značajno popravljaju, s naglaskom na postupnom razvoju transplantacije, čime se postiže značajan napredak u liječenju bubrežnog zatajenja. Sam razvoj dobre kirurške tehnike ne bi bio dovoljan da ga nije pratio razvoj moderne imunologije i suvremenih, vrlo potentnih imunosupresivnih lijekova. Lijekovi koji danas stoje na raspolaganju gotovo su u potpunosti iskoristili hiperakutna odbacivanja presađivanja, uvelike se smanjio broj akutnih odbacivanja, no i dalje, unatoč suvremenoj terapiji unatrag posljednjih 20 godina, nema napretka u prosječnoj duljini preživljenja presađivanja. Velik dio presađenih bubrega gubi se zbog kroničnih promjena u parenhimu organa za koje se pretpostavlja da su s jedne strane posljedica neželjenih učinaka imunosupresivnih lijekova, a s druge strane kasnih kroničnih imunoloških zbivanja. U ovom istraživanju ćemo istražiti neke od čimbenika za koje se smatra da bi mogli biti odgovorni za proces oštećenja i slabljenja funkcije presađenih bubrega. Iz postojeće literature jasno je da obitelj Wnt (od eng. wingless-type MMTV integration site family) gena ima ključnu ulogu u embionalnom razvoju bubrega. U daljnim istraživanjima pretpostavljena je i njihova uloga tijekom života prilikom ozljede bubrega te procesa reparacije ili fibroze. Obzirom da u dosadašnjim istraživanjima nije jasna njihova uloga niti izraženost u transplantiranim bubrezima to je bila glavna tema ovog istraživanja. Pratili smo izraženost Wnt 4 u tkivu zdravih (nativnih) bubrega te u tkivu kirurški odstranjenih transplantiranih bubrega u ovisnosti o različitim čimbenicima za koje smatramo da mogu imati utjecaja na njegovu izraženost.

1.1. RAZVOJ, GRAĐA I FUNKCIJE BUBREGA

1.1.1. Embrionalni razvoj bubrega

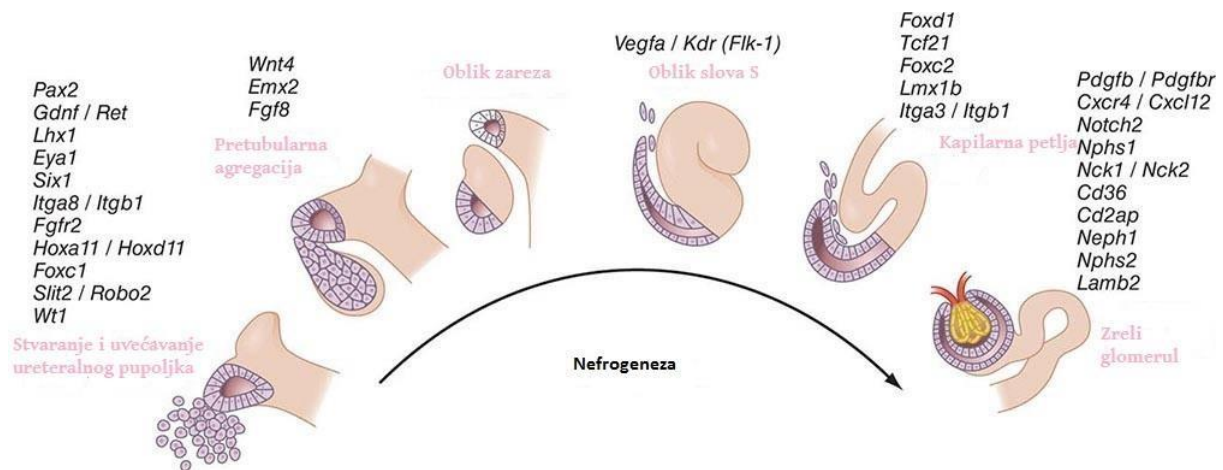
Nefrogeneza, odnosno razvoj bubrega, označava embrionalni nastanak bubrega. Razvoj bubrega odvija se u tri uzastopne faze, a po završetku svake od njih nastaje sve kompleksniji organ. Početak stvaranje nefrona započinje u 4. tjednu embrionalnog razvoja iz osnove koju nazivamo intermedijarni mezoderm. U području vrata iz intermedijarnog mezoderma nastaju nefrotomi iz kojih se razvijaju rudimentarni sekretorni kanalići koji nemaju sekretornu funkciju, a nazivamo ih pronefros (predbubreg). Krajem 4. tjedna embrionalnog razvoja iščezava pronefros a iz prsnog, slabinskog i križnog intermedijarnog mezoderma oblikuju se sekretorni kanalići mezonefrosa (prabubrega) koji spajanjem čine nefrogene tračke u koje urastaju kapilare čineći klupko (glomerul). Nefrogeni tračci koji okružuju glomerul čine osnovu Bowmanove čahure. Lateralni krajevi kanalića se ulijevaju u zajednički odvodni kanal – kanal mezonefrosa ili Wolffov kanal koji završava u kloaki. Sredinom 2. mjeseca embrionalnog razvoja gornji dio mezonefrosa počinje propadati, a potkraj drugog mjeseca iščezava većina mezonefrosa. Začetak definitivnog bubrega ili metanefrosa nastaje u 5. tjednu iz dvije osnove: metanefrogenog mezoderma i mokraćovodnog pupoljka. Mokraćovodni pupoljak nastaje iz donjeg dijela Wolffova kanala te urasta u metanefrogeno tkivo čineći tako primitivnu bubrežnu nakapnicu (pelvis renalis) koja dijeleći se daje osnovu velikih bubrežnih vrčeva (lat. Calyces renales majores) čijom podjelom nastaje 12 ili više generacija kanalića, čiji razvoj traje sve do 5. mjeseca embrionalnog razvoja. Kanalići 5. generacije postaju sabirni kanalići. Oko distalnog kraja svakog kanalića zgusne se metanefrogeni mezoderm, a pod indukcijom kanalića stvaraju se bubrežni mjehurići iz kojih nastaju kanalići koji obuhvata klupko kapilara koje čine glomerul. Glomerul sa pripadajućim kanalićem je osnova nefrona. Na proksimalnom kraju svakog nefrona nalazi se Bowmanova čahura dok se na distalnom kraju sekretorni kanalići izdužuju i savijaju te na taj način formiraju proksimalni zavijeni kanalić, Henleovu petlju i distalni zavijeni kanalić (1).

1.1.2. Molekularni aspekti embrionalnog razvoja bubrega

U području urastanja ureteralnog pupoljka u metanefrogeni mezenhim dolazi do procesa mezenhimalno-epitelne tranzicije. U tom procesu dolazi do kondenzacije i aktivacije mezenhimalnih stanica kao ključnog procesa nefrogeneze. Za aktivaciju navedenog procesa do sada je temeljem istraživanja na životnjskim modelima, dokazano da ključnu ulogu, među ostalim genima, ima i nekoliko gena iz obitelji Wnt.

Nastupa recipročni inducirajući događaj između epitela mokraćnog pupoljka i mezodermalnog mezenhima. Za urastanje mokraćnog pupoljka i njegovu daljnju diferencijaciju su potrebni GDNF (od engl. gliadin derived neurotropic factor), neurotropni čimbenik nastao iz glijadina i stvaranje receptora tirozin kinaze RET (od engl. receptor tyrosin kinase). Mezodermalnom mezenhimu su potrebni WT1 (od engl. Wilms tumor protein) i Pax2 (od engl. paired box gene 2) kako bi odgovorio na indukciju.

Proces započinje djelovanjem čimbenika transkripcije WT1 koji izražavaju stanice mezoderma. WT1 utječe na proizvodnju GDNF. Od ostalih ključnih gena u ovoj fazi razvoja potrebno je spomenuti Wnt, BMP (od engl. bone morphogenetic protein) i FGF (od engl. fibroblast growth factor). Kanonski signalni Wnt put koji je posredovan beta kateninom ključan je u fazi započinjanja mezenhimalno epitelne transformacije kojom nastaju nefroni, a u tom procesu prati se izraženost Wnt9B i Wnt6 koji utječu na izraženost PAX2 i Wnt4. Pod utjecajem PAX2 stanice mezenhima se zgušnjavaju, a zbog izraženosti Wnt 4 dolazi do epitelizacije i stvaranja bubrežnih mjehurića u koje urasta kapilarno klupko tvoreći na taj način glomerule (2,3,4,5,6)(slika 1).



Slika 1. Molekularni razvoj bubrega. Geni koji su odgovorni za kontrolu razvoja bubrega. Prilagođeno prema: 7

1.1.3. Građa i histologija bubrega

Bubrezi su dvije žlijezde smještene u razini od prvog do trećeg lumbalnog kralješka s lijeve i desne strane uz stražnju stjenku trbušne šupljine. Bubreg odraslog čovjeka je 10 - 12 cm dug, 5-6 cm široki i 4 cm debeo, a teži 300g. Sam bubreg obavijen je vezivnom čahuricom i masnim tkivom. Svojom izgledom bubrezi podsjećaju na zrno graha. U konkavitetu medijalnog ruba nalazi se hilus kroz koji u bubreg ulazi bubrežna arterija i živci, a izlazi bubrežna vena, limfne žile i mokraćovod. Prošireni gornji dio mokraćovoda nazivamo bubrežna nakapnica od koje polaze veliki bubrežni vrčevi koji se granaju u nekoliko malih bubrežnih vrčeva. Unutar bubrega razlikujemo koru i srž. Unutar srži se nalaze piramide od kojih polaze sržni tračci koji sadrže nekoliko sabirnih cjevčica i nefrona. Baze piramida su usmjerene prema bubrežnoj površini, a vrhovi strše u sinus bubrega kao bubrežne papile. Oko bubrežnih papila nalaze se bubrežni vrčevi koji se prema bubrežnom sinusu spajaju u bubrežnu nakapnicu (8).

Funkcionalna jedinica bubrega je nefron. U svakom bubregu nalazimo milijun nefrona. Nefron čini bubrežno tjelešće, proksimalni zavijeni kanalić, Henleova petlja i distalni zavijeni kanalić. Bubrežno tjelešće, proksimalni i distalni kanalić se nalaze u kori bubrega dok se Henleova petlja nalazi u srži.

Bubrežno tjelešće sastoji se od klupka kapilara (glomerul) kojega obavija dvostruka Bowmanova čahura. Između dva sloja Bowmanove čahure dolazi do stvaranja glomerularnog filtrata. Vanjski, odnosno parijetalni dio Bowmanove čahure građen je od jednoslojnog

pločastog epitela dok visceralni dio obavija glomerularne kapilare, a čine ga podociti. Karakteristika podocita su višestruki izdanci, odnosno nožice, koje se međusobno isprepliću, a prostor između dviju nožica podocita predstavlja filtracijsku površinu čija širina iznosi 25 nm. Filtracijska barijera između lumena kapilara glomerula i podocita je bazalna membrana, na kojoj elektronskim mikroskopom razlikujemo središnji gusti sloj – lamina densa, koju sa svake strane okružuje elektronski svjetliji sloj – lamina rara. Razlika potječe od različitog biokemijskog sastava. Lamina densa sadrži gusti sloj kolagena tipa IV koji predstavlja filter za čestice veće od 10 nm, dok anionska mjesta u obje lamine rare djeluju na negativno nabijene bjelančevine te se one samo oskudno propuštaju. Između kapilara glomerula nalaze se mezangijske stanice, one sintetiziraju amorfnu matriks i podupiru stijenku kapilara. U bubrežnom tjelešcu razlikujemo dva pola: žilni kroz koji prolaze dovodna i odvodna arteriola te mokraćni pol na koji se nastavlja proksimalni zavijeni kanalić. Proksimalni kanalići su obloženi jednoslojnim kubičnim ili cilindričnim epitelom, imaju širok lumen i okruženi su peritubularnim kapilarama. Na proksimalni zavijeni kanalić se nastavlja debeli silazni dio Henleove petlje koji se postupno sužava. Tanki krak silazne i uzlazne petlje prekriven je jednoslojnim pločastim epitelom, koji se u debelom uzlaznom kraku nastavlja u jednoslojni kubični epitel, poput onog koji oblaže i distalni kanalić. Distalni kanalići se nastavljaju u sabirne kanaliće koje se spajaju u sabirne cjevčice koje se na vrhu piramide otvaraju u bubrežne vrčeve. Iz bubrežnih vrčeva mokraćna se sakuplja u nakapnicu iz koje se odvodi pomoću mokraćovoda. Razlikujemo kortikalne nefrone koji čine većinu, te u manjem broju (svega 1/7 od svih nefrona) jukstamedularne nefrone koji su odgovorni za stvaranje gradijenta hipertoničnosti u srži bubrega što omogućuje bubregu stvaranje koncentrirane mokraće. Karakteristika jukstamedularnih nefrona su vrlo duge Henleove petlje (9).

1.1.4. Funkcije bubrega

Funkcije bubrega su od vitalnog značenja za održavanje homeostaze organizma. Uredna bubrežna funkcija uključuje ekskrecijsku, metaboličku i endokrinu funkciju.

Osnovna funkcija bubrega je ekskrecijska, što podrazumjeva filtriranje krvi, čime se iz organizma odstranjuju štetni proizvodi metabolizma, toksini, lijekovi te višak soli i tekućine. Kakobi mogli odgovarajuće filtrirati krv potreban im je velik protok krvi, tako da kroz bubrege u minuti protiče 1,2 L krvi što iznosi 21% srčanog minutnog volumena. Ova bubrežna funkcija neophodna je za održavanje ravnoteže elektrolita i tekućina u organizmu te za regulaciju krvnog tlaka.

Druga važna funkcija bubrega je metabolička, odnosno održavanje acido-bazne ravnoteže, pomoću sekrecije vodikovih iona te reapsorpcije i stvaranja bikarbonatnih iona. Već i vrlo mali otkloni acido-bazne ravnoteže dovode do klinički značajnih poremećaja koji mogu bolesnika vitalno ugroziti.

Osim što je ključan organ za izlučivanje štetnih tvari iz organizma odnosno za pročišćavanje krvi, bubreg ima važnu endokrinu ulogu jer se u njemu izlučuje nekoliko vrlo važnih hormona. Unutar jukstaglomerularnih stanica aferentnih arteriola sintetizira se renin koji pokreće sustav renin-angiotenzin-aldosteron, izuzetno važan u regulaciji krvnog tlaka. Slijedeći važan hormon je eritropoetin koji je neophodan za odgovarajuću hematopoezu. Osim toga, u bubregu se stvara aktivni oblik vitamina D hidroksilacijom u 1,25 dihidrokolekalciferol, koji je ključan za regulaciju kalcija i fosfata u organizmu, odlaganje kalcija u kosti te proizvodnju parathormona (10).

1.1.5. Zatajenje bubrežne funkcije

U ovisnosti o vremenskom razdoblju u kojem dođe do oštećenja bubrega koje posljedično uzrokuje zatajenje bubrežne funkcije razlikujemo akutno i kronično zatajenje bubrega. Akutno bubrežno zatajenje ili akutno oštećenje bubrega je u većini slučajeva reverzibilno, ukoliko se na vrijeme adekvatno liječi. Kronično bubrežno zatajenje (KBZ) ili završni stadij kronične bubrežne bolesti (KBB) obilježava ireverzibilan gubitak funkcionalnog tkiva bubrega koje postupno napreduje sve do završne faze bubrežnog zatajenja kada život nije moguć bez metoda nadomještanja bubrežne funkcije.

Zatajenje bubrežne funkcije obilježeno je smanjenjem glomerularne filtracije što se očituje smanjenjem diureze te povećanjem otpadnih produkata metabolizma u krvi, prvenstveno ureje i kreatinina. Uz navedeno mogu biti prisutne hematurija, odnosno proteinurija, ovisno o uzroku bubrežnog zatajenja. Obzirom na središnju ulogu bubrega u održavanju homeostaze elektrolita i tekućine u organizmu dolazi do volumnog opterećenja, do poremećaja koncentracije elektrolita, prvenstveno kalija, te do povećanja kiselosti krvi zbog uloge bubrega u održavanju acido-bazne ravnoteže. Daljnjim napredovanjem bubrežnog zatajenja dolazi do poremećaja kalcija i fosfata u organizmu te do razvoja anemije (11,12).

1.1.5.1. Akutno oštećenje bubrega

Akutno oštećenje bubrega obilježeno je naglo nastalim smanjenjem glomerularne filtracije unutar nekoliko sati ili dana. U krvi se prati porast štetnih proizvoda metabolizma – dušičnih spojeva. Izlučivanje mokraće može biti više od 3 litre dnevno, pa sve do oligurije i anurije. Uzroci akutnog oštećenja bubrega mogu biti višestruki, a djelimo ih prema mjestu nastanka na prerenalne, intrinzične i postrenalne. Do prerenalnog akutnog oštećenja bubrega dolazi u slučaju smanjenja perfuzije bubrega zbog hipovolemije u slučaju dehidracije ili obilnih krvarenja, zbog smanjenja efektivnog volumena, zbog kardijalnih bolesti koje dovode do smanjenja ejekcijske frakcije ili zbog gubitka tekućine u treći prostor. Intrinzično oštećenje bubrega nastaje zbog oštećenja bubrežnog parenhima, a može zahvatiti bilo koji dio funkcionalne jedinice bubrega od glomerula do tubula ili krvnih žila bubrega. Najčešći oblik intrinzičnog oštećenja je akutna tubularna nekroza. Postrenalno akutno oštećenje bubrega posljedica je mehaničke opstrukcije u otjecanju mokraće (11,12,13).

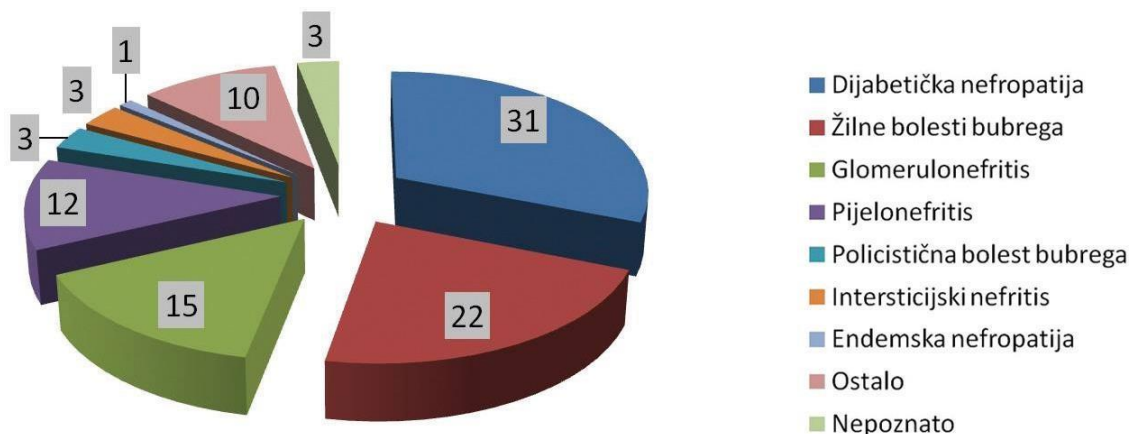
1.1.5.2. Kronično bubrežno zatajenje

Kronično bubrežno zatajenje (KBZ) predstavlja oštećenje bubrežne funkcije praćeno smanjenjem glomerularne filtracije ispod 60 ml/min/1,73 m² površine tijela, tijekom najmanje 3 mjeseca. Temeljem veličine glomerularne filtracije razlikujemo 5 stupnjeva KBZ (tablica 1). Bubrežno oštećenje može se manifestirati patohistološkim promjenama u tkivu bubrega dobivenom biopsijom, patološkim sastojcima u mokraći, poput proteinurije ili hematurije, ili promjenjenim izgledom bubrega na dijagnostičkim slikovnim metodama (13,14).

Tablica 1. Stupnjevi kroničnog bubrežnog zatajenja (15)

Stupanj bubrežnog zatajenja	Glomerularna filtracija (ml/min/1.73 m ²)
1	> 90, patološki nalaz u mokraći
2	60-89
3	30-59
4	15-29
5	<15

Posljednjih desetljeća bilježi se povećana pojavnost KBZ u svijetu pa tako i u Hrvatskoj, ponajviše zbog povećane učestalosti šećerne bolesti i arterijske hipertenzije kao najčešćih uzroka zatajenja bubrežne funkcije (slika 2). Istraživanja provedena na različitim rasama i u različitim dijelovima svijeta pokazala su da jedna od 10 odraslih osoba ima neki oblik oštećenja bubrega. U Hrvatskoj od kronične bubrežne bolesti boluje 4500 osoba, a prema podacima Hrvatskog registra nadomještanja bubrežne funkcije 930 bolesnika na milijun stanovnika zahtjeva nadomještanje bubrežne funkcije (16,17,18).



Slika 2. Učestalost pojedinih uzroka kronične bubrežne bolesti u novih bolesnika na dijalizi 2008. godine u Hrvatskoj (u postocima). Prilagođeno prema: 19

Kronična bubrežna bolest predstavlja jedan od vodećih javnozdravstvenih problema u svijetu. Čimbenici rizika za nastanak kronične bubrežne bolesti su pozitivna obiteljska anamneza, starija životna dob, urođena ili stečena smanjena bubrežna masa, šećerna bolest, arterijska hipertenzija, hiperlipidemija/dislipidemija, učestale infekcije mokraćnih kanala, bubrežni kamenci, upotreba nefrotoksičnih lijekova.

Unatoč poboljšanju tehnologije te kliničkom i znanstvenom napretku u liječenju metodama nadomještanja bubrežne funkcije, sve je veća učestalost nebubrežnih komplikacija koje bitno utječu na poboljšanje i smrtnost ovih bolesnika. Najvažnije su srčano-žilne komplikacije koje su odgovorne za 40 – 60 % smrti bolesnika s kroničnom bubrežnom bolesti. Čimbenici rizika za srčano-žilne bolesti u bolesnika sa kroničnom bubrežnom bolesti obuhvaćaju sve one čimbenike koji pogoduju nastanku ishemijske bolesti srca, kroničnog zatajivanja srca i hipertrofije lijeve klijetke. Brojni su čimbenici rizika od kojih samo opći, nazočni i u općoj populaciji, ne mogu objasniti visoku pojavnost srčano-žilnih bolesti u ovih bolesnika. Osim općih čimbenika rizika, značajni su rizični čimbenici specifični za kronično bubrežno zatajenje, često se označuju i kao “uremijski” čimbenici rizika, a navedeni su u tablici 2 (20).

Tablica 2. Srčano-žilni čimbenici rizika u bolesnika s kroničnim bubrežnim zatajenjem (20)

Opći čimbenici rizika	“Uremijski” čimbenici rizika	Posebni čimbenici rizika na dijalizi
Starija dob Muški spol Arterijska hipertenzija Dijabetes Pušenje cigareta Dislipidemija Tjelesna neaktivnost Menopauza Psihosocijalni stres Obiteljska anamneza	Proteinurija (mikroalbuminurija) Upala Pothranjenost Disfunkcija endotela Oksidativni stres Anemija Poremećaj mineralnog metabolizma Razgradni produkti metabolizma glukoze Hiperhomocisteinemija Trombogeni čimbenici Povišen izvanstanični volumen	Intradijalitička hipotenzija Doza isporučene dijalize Promjene ravnoteže elektrolita Bioinkompatibilne membrane Onečišćenje dijalizata

Kronično bubrežno zatajenje 1. i 2. stupnja obično ne daje simptome specifične za bubrežnu bolest, no može se javiti povišeni krvni tlak i otok ekstremiteta u slučaju značajnog gubitka serumskih bjelančevina. Simptomi koji karakteriziraju kroničnu bubrežnu bolest javljaju se u 3. i 4. stupnju KBZ, a uključuju: opću slabost i umor, smanjenje apetita, anemiju kronične bubrežne bolesti, poremećaje elektrolita, prvenstveno hiperkalemiju, razvoj metaboličke acidoze te poremećaj metabolizma kalcija i fosfora, vitamina D i paratireoidnog hormona. Daljnjim napredovanjem bolesti uremijski sindrom postaje sve izraženiji jer bubrezi postupno gube i egzokrinu i metaboličku i endokrinu funkciju te ukoliko se u 5. stadiju, odnosno završnom stadiju KBZ, ne započne nadomještanje bubrežne funkcije nastupa smrt (13,21,22).

1.2. METODE NADOMJEŠTANJA BUBREŽNE FUNKCIJE

Dijaliza i transplantacija bubrega predstavljaju suvremene metode nadomještanja bubrežne funkcije (NBF). Početak nadomjesnog liječenja ovisi o brojnim čimbenicima i kliničkom stanju bolesnika. Budući da ne postoji suglasje o vremenu započinjanja nadomjesnog liječenja, bolesniku sa GF manjom od 15 ml/min predlaže se da započne s nadomjesnim liječenjem uz obavezan individualni pristup (23). No, neovisno o vrijednosti GF, u bolesnika koji unatoč adekvatnom konzervativnom liječenju imaju hiperkalijemiju, krvarenje, hipervolemiju, hipertenziju, perikarditis, mučninu, učestalo povraćanje ili znake progresivne neuropatije, treba započeti nadomjesno liječenje. U praksi, većina bolesnika započinje s nadomještanjem bubrežne funkcije kada GF padne ispod 10 ml/min. Čimbenici koji određuju mogući izbor metode nadomjesnog liječenja KBZ su dob, motiviranost, pokretljivost, samostalnost, obiteljska pomoć, prihvaćanje bolesti, radna sposobnost, šećerna bolest, žilna bolest, respiratorna bolest, prethodne operacije, suradljivost bolesnika te hepatitis B i C (24). Najbolji pristup liječenju NBF nije samo izbor nadomjesne metode, već je potrebno razmišljati o ukupnom produljenju života bolesnika. Procjene kvalitete života bolesnika su neodvojivi dio ukupne skrbi o bubrežnim bolesnicima.

Od metoda nadomještanja bubrežne funkcije imamo na raspolaganju hemodijalizu, peritonealnu dijalizu i transplantaciju bubrega (tablica 3).

Tablica 3. Metode nadomještanja bubrežne funkcije

Metoda nadomještanja bubrežne funkcije	Vrsta nadomjesnog liječenja
Hemodijaliza (HD)	HD u centru HD u satelitskom centru Kućna HD
Peritonealna dijaliza (PD)	Kontinuirana ambulantna PD (CAPD) Automatizirana PD (APD)
Transplantacija bubrega (Tx)	Tx od umrle osobe Tx od živućeg srodnika Tx od nesrodne žive osobe

1.2.1. Hemodijaliza

Hemodijaliza je metoda u kojoj do uklanjanja štetnih tvari iz organizma dolazi prilikom prolaska krvi bolesnika kroz filter dijaliznog aparata – „umjetni bubreg“ kroz koji u suprotnom smjeru teče dijalizna tekućina. Procesom difuzije preko polupropusne membrane štetne tvari pretežito male molekularne težine prelaze sukladno koncentracijskom gradijentu. Tekućina nakupljena između dva dijalizna tretmana uklanja se procesom ultrafiltracije koji je kontroliran razlikom u hidrostatskim tlakovima na membrani dijalizatora. Za postupke hemodijalize potrebno je osigurati krvožilni pristup. Nedostaci liječenja hemodijalizom su upotreba heparina, potreba za osiguranjem krvožilnog pristupa, epizode hipotenzije tijekom samog postupka, potreba za vrlo strogim režimom prehrane i unosa tekućine.

1.2.2. Peritonealna dijaliza

Tijekom peritonealne dijalize difuzija je također glavni mehanizam uklanjanja štetnih produkata, no kao endogena dijalizna polupropusna membrana koristi se peritoneum. Kako bi bilo moguće provoditi peritonealnu dijalizu potrebno je uvesti peritonealni kateter u peritonealnu šupljinu, te se putem tog katetera u peritonealnu šupljinu utiče dijalizna otopina i ističe dijalizat. Tijekom svake izmjene difuzijom, ovisno o koncentracijskom gradijentu, se uklanjaju otpadne tvari male molekularne težine, dok se ultrafiltracija vode postiže razlikom u osmotskom tlaku hipertoničnog dijalizata i ekstracelularne tekućine. Postupak radi bolesnik sam ili uz pomoć aparata, a ponavlja se u ciklusima svakih nekoliko sati. Prednost peritonealne dijalize nad hemodijalizom je relativno konstantna koncentracija ureje, kreatinina i elektrolita u krvi. Postupna i kontinuirana ultrafiltracija doprinosi boljoj kontroli krvnog tlaka, a obzirom da ovu metodu dijalize provodi sam bolesnik u kućnim uvjetima ima određenu neovisnost i bolju kvalitetu života. Najvažnija komplikacija peritonealne dijalize je razvoj bakterijskog peritonitisa.

1.2.3. Dugoročne posljedice liječenja dijalizom

Kako je već ranije navedeno, ova populacija bolesnika je pod povećanim rizikom za razvoj kardiovaskularnih bolesti (tablica 2). Također se može razviti bubrežna koštana bolest, gdje razlikujemo dvije glavne skupine poremećaja koštanog metabolizma: 1. Visok koštani obrtaj (osteitis fibroza cystica) i 2. Nizak koštani obrtaj (adinamična kost i osteomalacija) (25,26). Posljedice su bolovi u kostima, patološke frakture te kalcifikacije mekih tkiva s posebnim naglaskom na vaskularne kalcifikacije (27).

Uremijska neuropatija može biti različitih stupnjeva težine, od blage senzorne neuropatije praćene bolovima u nogama ili „nemirnim“ nogama pa sve do uremijske encefalopatije (28).

Može doći do razvoja amiloidoze zbog nakupljanja beta2-mikroglobulina koji se nakuplja u različitim tkivima, najčešće u području zapešća, gdje uzrokuje nastanak sindroma karpalnog kanala (29). Stečena cistična bolest bubrega može se javiti nakon nekoliko godina liječenja dijalizom, a karakterizira ju pojava multiplih, bilateralnih cista u kronično promjenjenim bubrezima. Ciste se mogu inficirati, krvariti, uzrokovati bolove, a postoji i opasnost od njihove maligne alteracije (30). Konačno, kod bolesnika može doći do gubitka krvožilnog pristupa kada nije moguće nastaviti sa dotadašnjom metodom nadomještanja bubrežne funkcije, a navedeno može vitalno ugroziti bolesnika.

1.2.4. Transplantacija bubrega

Iz do sada opisanih metoda nadomještanja bubrežne funkcije možemo zaključiti da niti jedna od navedenih metoda ne nadomješta bubrežnu funkciju u cjelosti, a bolesnici su ovisni o učestalim terapijskim tretmanima. Kako bi se liječenje ove skupine bolesnika poboljšalo razvijena je transplantacija bubrega kao jedina metoda nadomještanja funkcije bubrega koja vraća bubrežnu funkciju u cjelosti (31). To je oblik liječenja koji bolesnicima omogućava kvalitetu života najbližu onoj koju su imali sa funkcionalnim bubregom i danas se smatra metodom izbora u liječenju. Apsolutne kontraindikacije za transplantaciju bubrega su aktivna infekcija i maligna bolest (32,33). Bubrež se može transplantirati sa živog srodnog ili nesrodnog darivatelja te sa umrle osobe.

Prema podacima Eurotransplanta preživljenje bolesnika godinu dana nakon transplantacije bubrega sa živog davatelja iznosi 95%, a usporedivo visoko je i ono od preminulog davatelja. Preživljenje presatka nakon 3 - 5 godina iznosi 70-90% (34,35).

1.2.5. Imunologija transplantacije

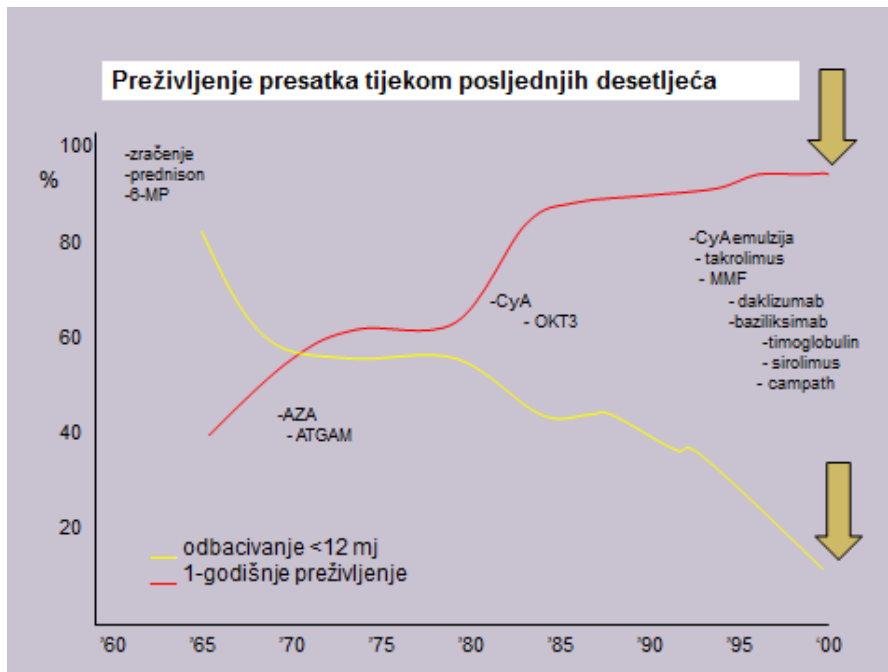
Ljudski organizam posjeduje vrlo složen i visoko specijalizirani imunološki sustav čija je osnovna uloga prepoznavanje stranih antigena te pokretanja imunološke reakcije na antigene u svrhu očuvanja biološkog integriteta. Taj sustav nazivamo glavnim sustavom tkivne podudarnosti (od eng. Major Histocompatibility Complex). U čovjeka on proizvodi površinske stanične proteine poznate pod nazivom sustav HLA (od eng. Human Leucocyte Antigen) pomoću kojeg naš organizam razlikuje vlastito od tuđeg (36). Obzirom da je prilikom transplantacije organa imunoreakcija usmjerena prema stranim antigenima na transplantiranom bubregu imunogenetika je nezaobilazna u području transplantacije. Kako bi se smanjila imunološka reakcija i time produljilo preživljenje presatka potrebno je prilikom transplantacije organa voditi računa o podudarnosti u ranije navedenim HLA antigenima između primatelja i darovatelja. Razlikujemo gene I. klase histokompatibilnosti HLA-A, B i C koji se nalaze na svim stanicama sa jezgrom i trombocitima, te gene II. klase histokompatibilnosti HLA-DR, DP i DQ koji su izraženi na limfocitima B, monocitima-makrofazima i dendritičkim stanicama (37,38). Predtransplantacijsko određivanje broja i specifičnosti protutijela na HLA i test križne reakcije od ključne su važnosti za sprečavanje reakcija hiperakutnog i akutnog odbacivanja presatka (39). U analizi HLA podudarnosti primatelja i darovatelja njihovi se antigeni uspoređuju na temelju nepodudarnosti, kratica MM (od eng. mismatch) za lokuse HLA A, B i DR. Temeljem toga broj nepodudarnosti na svakom lokusu može iznositi od 0-2, a za sva tri lokusa broj nepodudarnosti može biti od 0-6 (40,41).

Osim što je važno odrediti antigene i podudarnost u sustavu HLA, važno je odrediti i postojanje protutijela na HLA u serumu primatelja. Do razvoja HLA protutijela može doći prilikom liječenja transfuzijama krvnih pripravka, tijekom trudnoće te tijekom prethodnih transplantacija (42,43). Postojanje HLA protutijela je kontraindikacija za transplantaciju, odnosno predstavljaju neprihvatljive antigene darovatelja.

Nakon što je određen profil HLA antigena i eventualno postojanje HLA protutijela, u završnoj fazi, prije same transplantacije, potrebno je učiniti i test križne reakcije (eng. cross match). Reakcija se sastoji od izlaganja limfocita darovatelja serumu potencijalnog primatelja. Ukoliko je rezultat negativan, znači da u serumu primatelja ne postoje specifična protutijela na antigene darivatelja.

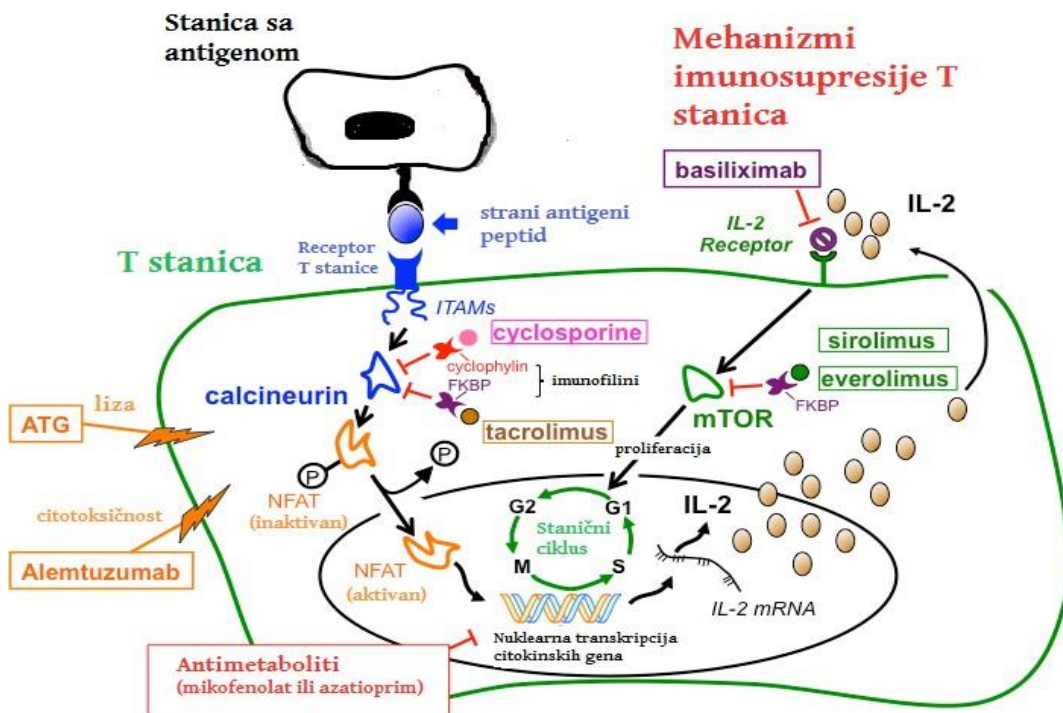
1.2.6. Imunosupresivni lijekovi

Razvojem moderne transplantacijske medicine došlo je do velikog napretka u razumjevanju imunologije transplantacije. To je bio temelj za daljnji napredak u razvoju lijekova kojima možemo suprimirati imunološke odgovore organizma na prisustvo stranih antigena (slika 3). Danas najveći izazov u liječenju bolesnika sa transplantiranim bubregom predstavlja propisivanje odgovarajuće doze imunosupresivne terapije, jer s jedne strane ta terapija treba biti dovoljno učinkovita da spriječi pokretanje imunoloških reakcija, a s druge strane valja voditi računa o neželjenim posljedicama imunosupresivne terapije, poput razvoja infekcija i malignih oboljenja. Razvojem modernih lijekova postepeno se smanjuje stopa hiperakutnih i akutnih odbacivanja, ali raste postotak komplikacija koje su izravna posljedica imunosupresivne terapije.



Slika 3. Preživljenje presatka i postotak akutnih odbacivanja u odnosu na otkriće imunosupresivnih lijekova. Prilagođeno prema: 70

U našem transplantacijskom centru, temeljem dosadašnjih spoznaja i prema KDIGO smjernicama, koristi se indukcijska terapija, a potom trojna imunosupresivna terapija. Temeljem imunološkog rizika odabire se terapija indukcije. U našem centru na raspolaganju nam stoje poliklonska protutijela Thymoglobulin ili Grafalon, a sastoje se od protutijela protiv komponenti T staničnog receptora, molekula razreda HLA I. i II. te adhezijskih molekula i citokinskih receptora (44). Obično se koriste kod bolesnika s visokim imunološkim rizikom, te kao terapija odbacivanja rezistentnih na steroide. Druga mogućnost u indukcijskoj terapiji su monoklonska protutijela, kod nas dostupna isključivo kao nedeplecijsko monoklonsko protutijelo basiliximab koje je usmjereno na CD25, što je dio receptora za interleukin 2 (45). Ovo protutijelo je standardna indukcijska terapija u našem centru, osim u pojedinim slučajevima, kao što je ranije navedeno, kada se u terapiji koriste poliklonska protutijela (46,47). Imunosupresivni lijekovi razlikuju se prema mehanizmu djelovanja na pojedinom mjestu u staničnom ciklusu. Mjesto djelovanja pojedinih imunosupresivnih lijekova prikazno je na slici 4 (48).



Slika 4. Mehanizam djelovanja immunosupresivnih lijekova na stanice obrambenog sustava. Prilagođeno prema: 48

Današnji standard immunosupresivne terapije sastoji se od tri različite vrste lijekova, obično je to kombinacija inhibitora kalcineurina (glavni predstavnik ove skupine je takrolimus i, danas manje upotrebljavan, ciklosporin), mikofenolat mofetila i kortikosteroida. U kompleksnoj kaskadi unutarstanične signalizacije kalcineurin je odgovoran za pokretanje transkripcije interleukina 2, proupalnog limfokina koji dovodi do aktivacije T limfocita (49). Kortikosteroidi imaju protuupalne učinke te blokiraju antigen-prezentirajuće stanice u prikazu aloantigena T limfocitima (50). Antiproliferativni lijekovi, poput mikofenolat mofetila i azatioprina, koče proliferaciju gotovo svih stanica jer prekidaju sintezu nukleotida nepohodnih za staničnu proliferaciju (51,52).

Iako su inhibitori kalcineurina (CNI) odgovorni za „revoluciju“ u transplantaciji i danas su zlatni standard terapije, oni imaju i neželjene učinke koji su ponekad toliko izraženi da je lijek potrebno zamjeniti. Neželjeni učinci pojedinih imunosupresivnih lijekova prikazani su u tablici 4. Tu se prvenstveno misli na nefrotoksičnost, neurotoksičnost te povećani rizik od srčano-žilnih i malignih bolesti (53,54). Lijekovi kojima je moguće zamjeniti CNI u imunosupresivnoj terapiji održavanja su mTOR inhibitori. Oni se vežu u stanici na citoplazmatski protein FKBP (od engl. FK506 binding protein), a potom se taj kompleks veže za TORC 1 (od engl. transcriptional coactivator for CREB1) čime dolazi do blokade staničnog metabolizma, rasta i proliferacije. Predstavnici ove skupine lijekova su sirolimus i everolimus (55).

Tablica 4. Neželjeni učinci imunosupresivnih lijekova (53,54)

Lijek	Neželjeni učinak
Kortikosteroidi	Povećanje tjelesne težine, povećanje krvnog tlaka, steroidni dijabetes, osteoporoza, strije
Ciklosporin	Povišen krvni tlak, nefrotoksičnost, tremor - neurotoksičnost, hirzutizam, hipertrofija gingiva, dijabetes
Takrolimus	Povišen krvni tlak, dijabetes, neurotoksičnost, nefrotoksičnost
MMF	Nadutost, mučnina, povraćanje, proljev, citopenija (leukopenija)
mTOR	Povećani krvni tlak, citopenije, hiperlipidemija, edemi, usporeno cjeljenje rana, limfokele

1.2.7. Komplikacije liječenja transplantacijom

Komplikacije liječenja transplantacijom su brojne. Dijelimo ih na imunološke (akutno, odnosno kronično odbacivanje posredovano stanicama ili protutijelima) i neimunološke (infekcije, rane i kasne kirurške komplikacije), te neželjene učinke trajnog uzimanja imunosupresivnih lijekova.

Najteža komplikacija je gubitak presatka. On može biti rani, nastao tijekom prvih 6 mjeseci po transplantaciji, ili kasni, koji se javlja nakon navedenog perioda. Rani gubitak presatka najčešće je posljedica imunološkog zbivanja, poput hiperakutnog ili akutnog odbacivanja, ili kirurških komplikacija, u smislu stenoze ili tromboze krvnih žila bubrega (56). Najčešći uzrok kasnog gubitka presatka je smrt primatelja s funkcionirajućim presatkom, a potom kronična disfunkcija presatka (56,57,58). Najčešće komplikacije liječenja transplantacijom bubrega prikazane su u tablici 5.

Tablica 5. Komplikacije liječenja transplantacijom bubrega

Kirurške	Imunološke	Ostalo
Stenoza arterije presatka	Hiperakutno odbacivanje	Smrt s funkcionalnim presatkom
Tromboza arterije/vene presatka	Akutno odbacivanje <ul style="list-style-type: none"> • Stanično □ Humoralno 	Kronična disfunkcija presatka
Limfokela	Kronično odbacivanje <ul style="list-style-type: none"> • Stanično □ Humoralno 	Infekcije
Urinom		Toksičnost lijekova
Stenoza uretera		Povrat osnovne bolesti

1.2.8. Kirurške komplikacije

Rani gubitak presatka zbog tromboze iznosi 2-7% (59). Tromb nastaje obično unutar 48 sati od transplantacije, bilo u arteriji ili veni presatka. Obično nastaje na mjestu ozljede krvne žile klemom ili na mjestu postojanja aterosklerotskog plaka, ukoliko postoji pritisak kolekcijom (hematom ili limfokela) na žilu izvana (60). Ukoliko dođe do razvoja tromboze, bilo arterije ili vene, nastupa ireverzibilan gubitak presatka te ga se mora kirurški ukloniti.

Stenoza bubrežne arterije javlja se u 3 - 12,5% slučajeva. Ona se može očitovati vrlo rano u posttransplantacijskom tijeku, ali i unutar prvih mjesec dana po transplantaciji. Posljedica je ozljede klemom ili pogreške prilikom kreiranja anastomoze krvnih žila. Ukoliko je bubrežna arterija dugačka, stenoza može nastati na mjestu presavinuća. Stenozu je moguće rješavati perkutanom transluminalnom angioplastikom ili otvorenim kirurškim putem učiniti reanastomozu (61).

1.2.9. Imunološke komplikacije

U rane imunološke komplikacije spada hiperakutno odbacivanje presatka, koje danas gotovo uopće ne viđamo. Hiperakutno odbacivanje posljedica je aktivacije postojećih protutijela primatelja na antigene endotelnih stanica i mikrovaskulature presatka. Dolazi do aktivacije kaskade sustava komplementa i do stvaranja tromba u mikrocirkulaciji bubrega. Terapija je hitno kirurško uklanjanje prestaka (62).

U prvom tjednu nakon transplantacije pa sve do kraja prvog tromjesečja, može se javiti akutno odbacivanje presatka posredovano ili stanicama ili protutijelima. Odbacivanje posredovano protutijelima javlja se zbog od ranije prisutnih slabo specifičnih protutijela koja stvaraju senzibilizirani B limfociti (63). Ipak, najčešća reakcija odbacivanja koju danas viđamo u prvom tromjesečju po transplantaciji je odbacivanje posredovano T limfocitima (stanično). Klinički na razvoj odbacivanja presatka upućuje pogoršanje funkcije presatka u smislu porasta dušičnih supstanci u krvi, smanjenje diureze, razvoj febriliteta ili bolnost i napetost te povećanje presatka (64). Težina akutnog odbacivanja je histopatološka dijagnoza i temelji se na histološkoj analizi materijala biopsije presatka koja se koristi Banff klasifikacijom za određivanje vrste i težine odbacivanja, što je ključno u donošenju daljnjih terapijskih odluka.

Banff klasifikacija

Biopsija bubrega je „zlatni standard“ u postavljanju dijagnoze disfunkcije presatka (65). Adekvatan uzorak tkiva bubrega treba sadržavati dva cilindra kore i dijela medule te najmanje 10 glomerula i 2 arterije. Zadovoljavajući uzorak sadrži najmanje 7 glomerula i 1 arteriju.

Prilikom patohistološke analize rutinski se rade tri metode: 1. svjetlosna mikroskopija, 2. imunofluorescentna mikroskopija i 3. elektronska mikroskopija. Temeljem patohistološke dijagnoze određuje se terapijski pristup svakom pojedinom bolesniku. Iz potrebe za standardizacijom patohistoloških nalaza nastala je klasifikacija iz Banff-a još 1993. godine, od tada se svakih nekoliko godina revidira i nadopunjuje, a posljednja je revizija učinjena 2017. godine. Pomoću Banff klasifikacije analiziraju se pojedine morfološke promjene u tkivu bubrežnog presatka. Semikvantitativno se od 0-3 boduju upala intersticija, tubulitis (zahvaćenost kanalića upalom), arteritis (upala stijenke arterija), glomerulitis (upala glomerula), intersticijska fibroza, atrofija kanalića, fibrointimalno zadebljanje stijenke arterija, transplantacijska glomerulopatija, proširenje mezangijskog matriksa, arteriolarna hijalinoza, peritubularni kapilaritis (upala u peritubularni kapilarama) te depoziti C4d u peritubularnim kapilarama (66,67,68).

Tablica 6. Patohistološki nalaz biopsije bubrega, skoriranje prema Banff klasifikaciji (66,67,68)

Intersticijska upala (i) – postotak upale u neutrofičnom parenhimu	i0 - < 10% i1 - 10-25% i2 - 26-50% i3 - > 50%
Tubulitis (t) - broj mononuklearnih upalnih stanica po poprečnom presijeku kanalića ili na 10 stanica kanalića	t0 - nema mononuklearnih upalnih stanica t1 - 1-4 t2 - 5-10 t3 - >10
Vaskularna upala (v) - mononuklearne upalne stanice u intimi ili mediji arterije	v0 - nema arteritisa v1 - intimalni arteritis u <25% lumena v2 - intimalni arteritis >25% lumena v3 - transmuralni arteritis ili nekroza medije

Glomerulitis (g) - postotak glomerula sa mononuklearnim upalnim stanicama i reakcijom endotela	g0 g1 - <25% g2 - 25-75% g3 - >75%
Peritubularni kapilaritis (ptc) - broj upalnih stanica u poprečnom prerezu peritubularnih kapilara, mora biti prisutan u >10% peritubularnih kapilara	ptc0 - nema značajnog kapilaritisa ptc1 - do 4 upalne stanice ptc2 - 5-10 upalnih stanica ptc3 - >10 upalnih stanica
Ukupna upala (ti)	ti0 - <10% kortikalnog parenhima ti1 - 10-25% ti2 - 26-50% ti3 - >50%
C4d u peritubularnim kapilarama (C4d) - postotak pozitivnih peritubularnih kapilara	C4d0 C4d1 - 1-9% C4d2 - 10-50% C4d3 - >50%
Upala u području intersticijske fibroze i tubularne atrofije (i-IFTA) - postotak zahvaćenog ožiljno promjenjenog korteksa	i-IFTA0 - <10% i-IFTA1 - 10-25% i-IFTA2 - 26-50% i-IFTA3 - >50%

<p>Transplantacijska glomerulopatija (cg) - postotak kapilara u kojima se nalaze duplikature GBM. Gleda se najzahvaćeniji glomerul.</p>	<p>cg0 - nema duplikature GBM niti svjetlosnom niti elektronskom mikroskopijom</p> <p>cg1a - nema duplikature GBM svjetlosnom, no elektronskom mikroskopijom zahvaćene do 3 glomerularne kapilare</p> <p>cg1b - 1-25% na svjetlosnoj mikroskopiji</p> <p>cg2 - 26-50%</p> <p>cg3 - >50%</p>
<p>Proširenje mezangija (mm)</p>	<p>mm0</p> <p>mm1 - <25% neskleroziranih glomerula</p> <p>mm2 - 26-50% neskleroziranih glomerula</p> <p>mm3 - >50% neskleroziranih glomerula</p>
<p>Arteriolarne hijalinoze (ah) - broj arteriola sa segmentalnim ili koncentričnim nakupljanjem hijalinog materijala</p>	<p>ah0</p> <p>ah1 - 1 arteriola nodularna hijalinoza</p> <p>ah2 - >1 arteriole nodularna hijalinoza</p> <p>ah3 - 1 i > arteriole hijalinoza u čitavom opsegu</p>

Fibrointimalno zadebljanje arterije (cv) - postotak suženja lumena u najviše zahvaćenoj arteriji	cv0 cv1 - <25% cv2 - 26-50% cv3 - >50%
Intersticijska fibroza (ci) - postotak zahvaćene kortikalne zone	ci0 - <5% ci1 - 6-25% ci2 - 26-50% ci3 - >50%
Tubularna atrofija (ct) - postotak atrofičnih kanalića	ct0 ct1 - <25% ct2 - 26-50% ct3 - >50%

Nakon bodovanja prema gore navedenoj tablici histološki nalaz biopsije presatka svrstava se u određenu dijagnostičku kategoriju prema Banff klasifikaciji: 1) normalan nalaz; 2) promjene posredovane protutijelima; 3) granične promjene; 4) akutno odbacivanje posredovano T limfocitima; 5) intersticijska fibroza i tubularna atrofija; 6) ostale promjene koje nisu posljedica odbacivanja (tablica 7).

Tablica 7. Banff klasifikacija - dijagnostičke kategorije za biopsije bubrežnog presatka (67,68)

1.Normalno
2.Promjene posredovane protutijelima Akutno/Aktivno ABMR (sva tri kriterija trebaju biti prisutna) <ol style="list-style-type: none">1. histološki znakovi akutnog oštećenja tkiva - mikrovaskularna upala ($g>0$ i/ili $ptc>0$), intimalni ili transmuralni arteritis ($v>0$), akutno oštećenje tubula bez drugog evidentnog uzroka2. znakovi trenutne ili skorašnje interakcije protutijela sa endotelom (barem jedna od tri navedene)<ul style="list-style-type: none">• C4d bojenje u peritubularnim kapilarama• Umjerena mikrovaskularna upala ($g+ptc >2$)• Povećana ekspresija molekularnih markera indikativnih za oštećenje endotela3. serološki dokaz donor specifičnih protutijela (DSA) Kronično aktivno ABMR (sva tri kriterija trebaju biti prisutna) <ol style="list-style-type: none">1. morfološki dokaz kronične ozljede tkiva (jedna ili više navedenih značajki)<ul style="list-style-type: none">• transplantacijska glomerulopatija ($cg>0$)• značajne duplikature bazalne membrane peritubularnih kapilara• novonastala intimalna fibroza bez ranijih znakova TCMR2. znakovi trenutne ili skorašnje interakcije protutijela sa endotelom (barem jedan od tri navedena)<ul style="list-style-type: none">• C4d bojenje u peritubularnim kapilarama• Umjerena mikrovaskularna upala ($g+ptc >2$)• Povećana ekspresija molekularnih markera indikativnih za oštećenje endotela3. Serološki dokaz donor specifičnih protutijela (DSA) C4d bez znakova odbacivanja <ul style="list-style-type: none">• C4d bojenje u peritubularnim kapilarama• $g=0$, $ptc=0$, $cg=0$, $v=0$, ne nalazi se duplikatura bazalne membrane peritubularnih kapilara, ne nalazi se akutno tubularno oštećenje• nema znakova akutnog staničnog odbacivanja niti graničnih promjena

3. Granične promjene – sumnja na akutno odbacivanje posredovano T limfocitima

Primjenjuje se kada ne postoji intimalni arteritis uz fokalno postojanje tubulitisa s minimalnom infiltracijom intersticija (i0 ili i1) ili (i2, i3) s blagim tubulitisom (t1)

4. Akutno odbacivanje posredovano T limfocitima

IA- i2 ili i3 i fokalno umjereni tubulitis (t2)

IB- i2 ili i3 i fokalno teški tubulitis (t3)

IIA- blagi do umjereni intimalni arteritis (v1)

IIB- teški intimalni arteritis (v2)

III- transmuralni arteritis ili nekroza medije (v3)

Kronično aktivno odbacivanje posredovano T limfocitima - fibroza intime arterija s infiltracijom mononukleara u fibrozu, stvaranje neointime

5. Intersticijska fibroza i tubularna atrofija (stupanj)

I. blaga intersticijska fibroza i tubularna atrofija (<25% kore)

II. umjereni intersticijska fibroza i tubularna atrofija (26-50% kore)

III. teška intersticijska fibroza i tubularna atrofija (>50% kore)

6. Ostale promjene koje nisu posljedica odbacivanja

BK virus nefropatija

Posttransplantacijska limfoproliferativna bolest

Nefrotoksičnost kalcineurina

Akutna tubularna nekroza

Povrat osnovne bolesti

Pijelonefritis

Lijekom uzrokovan intersticijski nefritis

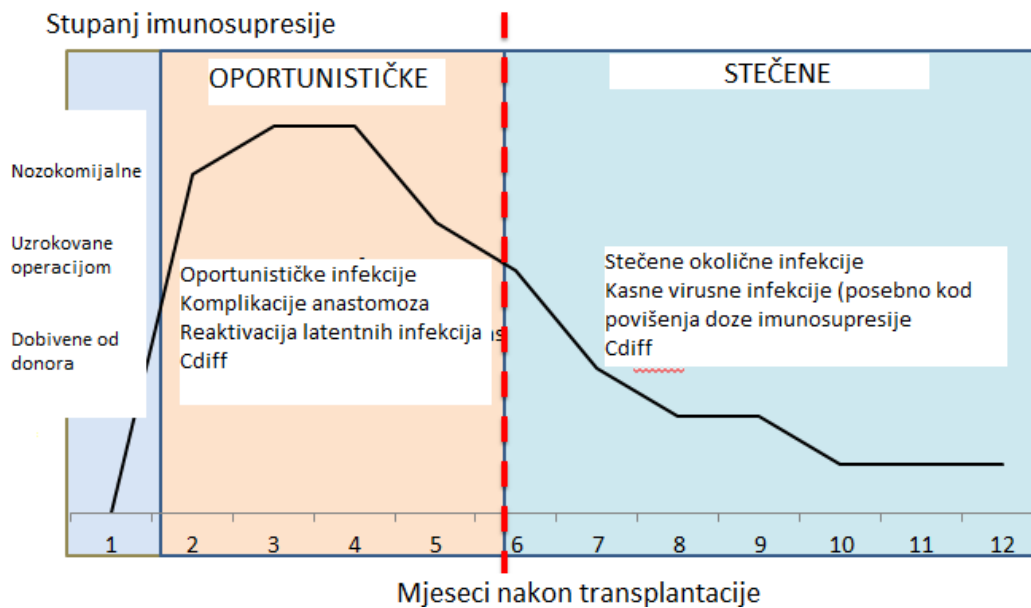
Kratice: TCMR, akutno odbacivanje posredovano T limfocitima (eng. T-cell mediated rejection), ABMR, akutno odbacivanje posredovano protutijelima (eng. Antibody mediated rejection)

1.2.10. Ostale komplikacije (kronična disfunkcija presatka, infekcije)

Najčešći uzrok gubitka presatka godinu dana od transplantacije je smrt s funkcionirajućim presatkom, najčešće kao posljedica velikog kardiovaskularnog događaja (58).

Od ostalih komplikacija liječenja transplantacijom potrebno je naglasiti veliki broj infekcija kojima su ovi bolesnici skloni, obzirom na trajno uzimanje imunosupresivnih lijekova. Učestalost sepse je 41,5 puta veća u odnosu na opću populaciju. Infekcije su drugi najčešći uzrok smrtnosti u bolesnika sa bubrežnim presatkom, odmah nakon srčano-žilnih bolesti (69). Prepoznavanje infekcije u ovih bolesnika može biti otežano obzirom da je klinička slika često izmjenjena zbog oslabljenog imunološkog odgovora. Spektar infektivnih oboljenja je širok, od bakterijskih patogena, preko gljivičnih do čitavog niza virusa. Vjerojatnost od infektivnog oboljevanja ovisi o ukupnoj imunosupresivnoj terapiji. Učestalost infektivnih komplikacija je viša u ranom posttransplantacijskom razdoblju, kada se bolesnicima daju visoke doze imunosupresiva. Ali isto tako u bolesnika kod kojih dolazi do epizoda akutnih odbacivanja koje je potrebno liječiti visokim dozama kortikosteroida, te podizanjem doze ukupne imunosupresivne terapije. Nisu svi patogeni jednako zastupljeni u posttransplantacijskom periodu, postoji shema pojavnosti infekcija ovisno o vremenskom periodu od transplantacije (slika 5).

Vremenska skala pojave infekcija nakon transplantacije



Slika 5. Infekcije u posttransplantacijskom razdoblju.
Prilagođeno prema: 71

U slučaju kad kod bolesnika pomoću antimikrobnih lijekova nije moguće kontrolirati infekciju, pokušava se smanjiti imunosupresivnu terapiju, u prvom redu dozu mikofenolat mofetila. Ukoliko ni to ne dovede do odgovarajućeg terapijskog odgovora, te ukoliko se procijeni da je kod bolesnika došlo do razvoja životno ugrožavajuće infekcije, postavlja se indikacija za hitno kiruško uklanjanje presatka.

Kronična disfunkcija presatka očituje se sporim, progresivnim gubitkom bubrežne funkcije nakon jedne ili više godina po transplantaciji. U 20% bolesnika s presađenim bubregom razvije se kronična disfunkcija presatka nakon 10 godina od transplantacije. Klinički dolazi do postupnog povećanja serumskog kreatinina, smanjenja glomerularne filtracije, razvoja ili povećanja proteinurije i pogoršanja arterijske hipertenzije.

Definitivna dijagnoza se postavlja biopsijom presatka, a temeljni je patohistološki nalaz nespecifična intersticijska fibroza i tubularna atrofija (IFTA) (71). U patofiziologiji oštećenja presatka razlikujemo imunološke i neimunološke čimbenike koje smo podijelili u odnosu na vrijeme od transplantacije u kojemu su mogli imati štetan učinak, odnosno doprinjeti oštećenju presatka. Od imunoloških čimbenika važno je naglasiti imunološki status bolesnika prije samog zahvata, odnosno njegovu senzibilizaciju (postojanje specifičnih protutijela u krvi bolesnika od ranije) i broj nepodudarnosti HLA između primatelja i darovatelja. Nakon transplantacije u obzir je potrebno uzeti epizode odbacivanja presatka, bilo staničnog bilo posredovanog protutijelima. S druge strane, nalazimo čitav niz neimunoloških čimbenika. U perioperativnom razdoblju valja misliti na karakteristike darovatelja bubrega (dob i anamnestičke podatke) i duljinu hladne ishemije, što može dovesti do odgođene funkcije presatka. U kasnijem razdoblju po transplantaciji ponovno se javlja čitav niz čimbenika koji mogu oštetiti bubreg uključujući arterijsku hipertenziju, hiperlipidemiju, te nefrotoksične učinke imunosupresivnih lijekova, prvenstveno inhibitora kalcineurina. Vrlo važan čimbenik je suradljivost bolesnika u redovitom uzimanju imunosupresivne terapije. Upravo je ovaj čimbenik jedan od najvažnijih u razvoju „*de novo*“ donor specifičnih protutijela i nastanka odbacivanja posredovanog protutijelima (58).

Bez obzira na uzrok oštećenja, posljedica je upala, a presadak je infiltriran B i T limfocitima te makrofagima i razvija se proliferativni odgovor posredovan kemokinima, citokinima i čimbenicima rasta. Kasnije procesom epitelno mezenhimalne tranzicije (EMT) dolazi do razvoja fibroze. Tijekom tog procesa epitelne stanice tubula bubrega poprimaju karakteristike mezenhimalnih stanica. Smatra se da je upravo ovaj proces EMT odgovoran za gubitak nefrona i razvoj fibroze (72,73).

Danas možemo već u ranim stadijima uočiti aktivaciju gena koji su odgovorni za razvoj fibroze, a na protokol biopsijama moguće je uočiti početne morfološke promjene koje ukazuju na razvoj kronične disfunkcije presatka. Stoga je moguće reagirati modifikacijom imunosupresivne i ostale terapije, te čimbenika rizika za nastanak oštećenja.

No, danas se sve više orijentiramo na one čimbenike rizika za nastanak fibroze koji se javlja rano, poput presađivanja organa sa što boljom HLA podudarnosti, što kraće vrijeme hladne

ishemije, rano otkrivanje i liječenje akutnih odbacivanja, te kontinuirani rad sa bolesnicima u svrhu postizanja što bolje suradljivosti.

1.2.11. Kiruško uklanjanje presatka

Podjeljena su mišljenja o indiciranosti kiruškog uklanjanja presatka čija je funkcija zatajila. Odluka se donosi važući potencijalnu korist i neželjene učinke za svakog pojedinog bolesnika. Afunkcionalan presadak još uvijek može imati očuvanu ekskrecijsku funkciju koja je važna radi održavanja ravnoteže tjelesnih tekućina i održavanja funkcije mokraćnog mjehura, osobito ukoliko se radi o bolesniku kod kojega se planira retransplantacija bubrega. Osim navedenog očuvana može biti i endokrina funkcija. Apsolutne indikacije za kiruško uklanjanje presatka su životno ugrožavajuće infekcije, afunkcionalni presadak u kojemu se javlja imunološki odgovor, prijeteća ruptura presatka, tromboza renalne arterije ili vene, tumori presatka i rezistencija na eritropoetin (74). Prilikom kiruškog uklanjanja presatka moguć je imunosni podražaj same operacije te razvoj reaktivnih protutijela. Protutijela se javljaju u nesenzibiliziranih bolesnika i dosežu svoj maksimum nekoliko mjeseci nakon kiruškog uklanjanja presatka (75). U obzir prilikom odluke o kiruškom uklanjanju presatka treba uzeti i rizik od anestezije i samog operativnog zahvata.

1.3. DOSADAŠNJE SPOZNAJE O Wnt

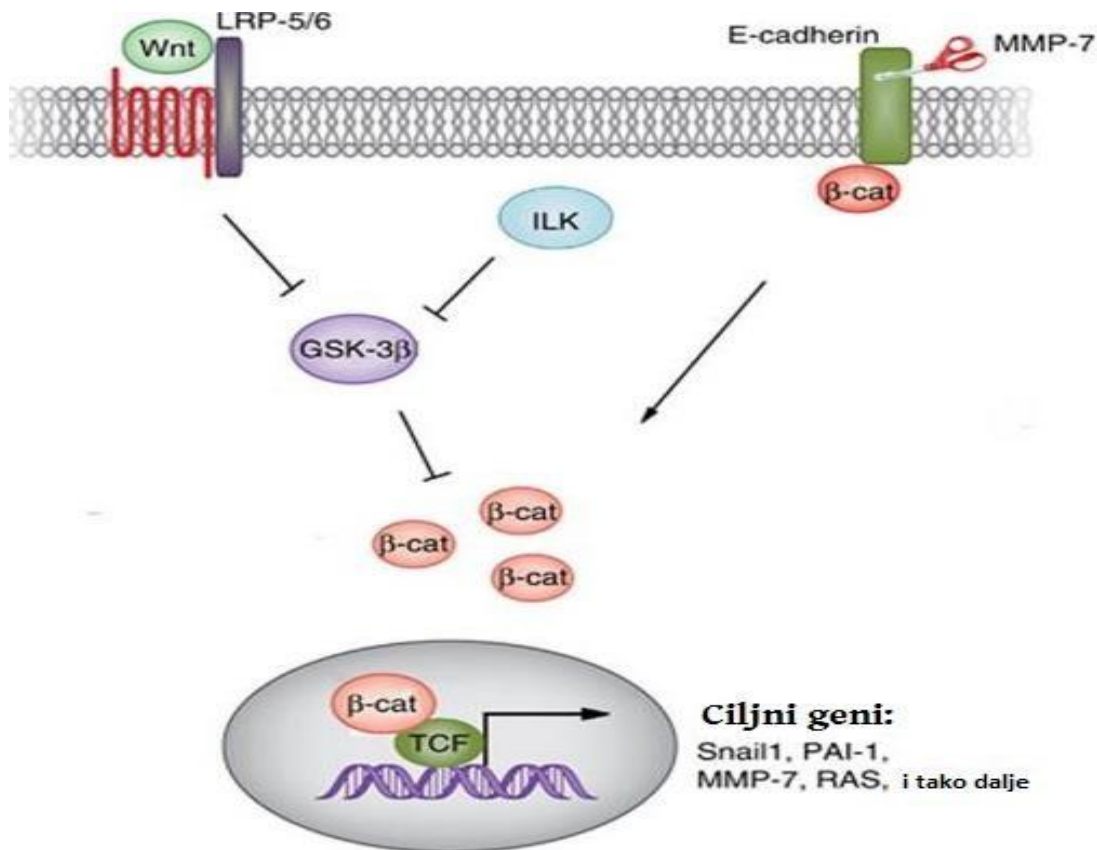
1.3.1. Obitelj Wnt gena

Obitelj Wnt (od engl. wingless-type MMTV integration site family) sastoji se od strukturno povezanih gena kojima je zajedničko kodiranje signalnih sekretornih proteina. Poznato je 19 članova Wnt obitelji. Za neke od tih proteina je dokazano da tijekom embrionalnog razvoja sudjeluju u razvoju bubrega i determinaciji ženskog spola. Poznata je njihova uloga u procesu oštećenja i oporavka bubrežnog tkiva. Najčešće spominjani je Wnt 4 (2,3).

1.3.2. Signalni put djelovanja Wnt

Mehanizam kojim Wnt sekretorni proteini djeluju uključuje vezanje za frizzeld (Fz) transmembranske receptore i ko-receptore na membrani stanica što dovodi do aktivacije niza unutarstaničnih signala te aktivacije transkripcije ciljanih gena. Wnt svoje djelovanje može ostvariti na dva načina: beta katenin ovisnim putem (kanonski put) i beta katenin neovisnim putem (ne kanonski put) (3,76). Beta katenin ovisan put povezan je sa frizzeld transmembranskim receptorima i u slučaju vezanja Wnt za receptor dolazi do fosforilacije LRP5 (low-density lipoprotein receptor-related protein 5) koja pokreće niz unutarstaničnih signala koji rezultiraju defosforilacijom beta katenina. Na taj način on postaje stabilan i ulazi u jezgru gdje se veže i aktivira proces transkripcije TCF (T cell factor) i LEF (lymphoid enhancer –binding factor) koji stimuliraju transkripciju ciljanih gena (77,78). Beta katenin neovisan put također može biti posredovan frizzeld receptorima, a uključuje i male Rho GTP-aze i c-Jun N-kinaza aktivaciju (79). Drugi mogući mehanizam djelovanja posredovan je fosfolipazom C i dovodi do povećanja unutarstaničnog kalcija koji onda aktivira Ca/kalmodulin – ovisnu protein kinazu, protein kinazu C i nuklearni faktor aktivacije T stanica (79). Upravo je ovaj put djelovanja zaslužan za proces mezenhimalno-epitelne transformacije tijekom nefrogeneze (80). Wnt signalni put je strogo kontroliran, pa tako postoje antagonisti Wnt koji uključuju sFRPs (od engl. soluble Frizzeld related proteins), Wnt faktor inhibicije i obitelj Dickkopf proteina (DKK) (77).

U novijim istraživanjima se spominje da i Klotho može direktnim vezanjem na Wnt inhibirati njihovu aktivnost (81,82). Važno je spomenuti da beta katenin ovisan put može biti aktiviran i drugim signalnim molekulama osim Wnt: TGF beta 1 (transforming growth factor beta 1), angiotensin II, integrini i ostali profibrogeni faktori (83,84).



Slika 6. Shematski prikaz signalnog puta Wnt/beta katenin
Prilagođeno prema: 88

1.3.3. Uloga Wnt gena u razvoju urogenitalnog sustava

Mokraćni i spolni sustav razvijaju se iz intermedijarnog mezoderma smještenog duž stražnje stijenke trbušne šupljine. Tijekom embrionalnog razvoja nastaju tri različite generacije bubrega: pronefros (predbubreg), mezonefros (prabubreg) i metanefros (definitivni bubreg). Razvoj definitivnog bubrega započinje u 5. tjednu embriogeneze urastanjem mokraćovodnog pupoljka u metanefrogeni mezenhim.

Dolazi do kondenzacije i agregacije mezenhimalnih stanica koje potom epiteliziraju i tvore jednostavne tubule. Daljnjom morfogenezom i diferencijacijom dolazi do uspostave funkcionalnih nefrona (5,85). Glikoproteini Wnt obitelji ključni su autoregulatori mezenhimalno-epitelne transformacije i nastanka tubula bubrega. Ukoliko ne dođe do njihove aktivacije izostaje kondenzacija i agregacija mezenhimalnih stanica koja je najvažniji događaj u procesu nefrogeneze (86). Miševi kod kojih je mutacijom induciran nedostatak nekog od Wnt-a, poglavito Wnt 4 i 9, umiru unutar 24 sata od okota zbog ageneze bubrega (5,85). Nasuprot tome, u miševa kod kojih nedostaje isključivo Wnt 4 dolazi do urastanja ureteralnog pupoljka u mezenhimalno tkivo, no izostaje mezenhimalno epitelna transformacija, što opet za posljedicu ima anomalije bubrežnog razvoja (87,88). Možemo zaključiti da je obitelj Wnt, osobito Wnt 4, svojevrsan autoinduktor mezenhimalno epitelne tranzicije i samim time razvoja funkcionalnog nefrona. Vjerojatno izvanstanični okoliš u kojem stanica prima signal igra vrlo važnu ulogu u odabiru puta u procesu aktivacije. Wnt bi mogao biti vrlo važan čimbenik u nastanku bubrežnih anomalija, no do sada postoje samo opisani eksperimentalni podaci na miševima (89,90). Također je potvrđena uloga Wnt 4 u nastanku anomalija spolnog sustava. U miševa koji imaju mutaciju Wnt 4 ne dolazi do razvoja Müllerove cijevi što posljedično dovodi do virilizacije, primarne amenoreje i hipergonadizma (91,92). Vanio i suradnici proučavali su nedostatak Wnt-a na mišjim modelima. Uočili su da su i muški i ženski miševi imali jednake anomalije bubrega i nadbubrežnih žlijezda, no isključivo kod ženskih miševa došlo je do anomalija u razvoju gonada i steroidogeneze. Stoga je Wnt ključan i u determinaciji ženskog spola (93).

Tablica 8. Uloga mutacije gena obitelji Wnt u razvoju pojedinih oboljenja

Gen	Oboljenje
Wnt1	Schizofrenija
Wnt3	Tetra amelija
Wnt4	Oštećenje bubrega, razvojne anomalije mokraćnog i spolnog sustava, policistična bolest bubrega
Wnt5a	Leukemija

1.3.4. Pretpostavljena uloga Wnt u nastanku bubrežne fibroze i glomeruloskleroze

U odraslom bubregu, nakon diferencijacije, Wnt/beta katenin signalni put nije aktivan, no postoje spoznaje da se taj put aktivira nakon oštećenja bubrega i često surađuje sa ostalim patološkim signalnim putevima u procesu nastanka bubrežne bolesti (94). Obzirom na do sada poznatu ulogu Wnt-a u razvoju bubrega pretpostavlja se da se isti put aktivira u procesu reparacije bubrežnog tkiva tijekom akutnog oštećenja bubrega. Na eksperimentalnom modelu akutnog oštećenja bubrega, odnosno ishemijsko - reperfuzijskog oštećenja u štakora, koje je postignuto klemanjem renalne arterije tijekom jednog sata, Terada i suradnici su verificirali značajnu izraženost Wnt 4 već tri sata nakon ishemije do 24 sata sveukupnog trajanja njegove izraženosti. Imunohistokemijskim metodama najveća izraženost Wnt 4 zabilježena je u području proksimalnih kanalića. Obzirom na navedeno, pretpostavlja se da Wnt igra značajnu ulogu u kontroli procesa regeneracije kanalića prilikom akutnog oštećenja bubrega (95). Prisutnost Wnt u odraslog miša inače se može naći samo u području epitela distalnih sabirnih kanalića. Postoje istraživanja Surendrana i suradnika o ekspresiji Wnt 4 tijekom tubulointersticijske fibroze na eksperimentalim mišijim modelima. Putem četiri mehanizma oštećenja bubrega (unilateralna ureteralna opstrukcija, administracija folne kiseline, oštećenje tubulointersticija uzrokovano direktnim razaranjem bubrežnog tkiva iglom, policistična bolest bubrega) potaknut je proces tubulointersticijske fibroze. Na navedenim modelima uočena je najveća izraženost Wnt 4 u područjima fibroznih lezija u intersticijskim fibroblastima što govori u prilog njegove uloge u patogenezi renalne fibroze (96). Ukoliko se blokira aktivacija Wnt/beta kateninskog puta nakon oštećenja bubrega, oštećenje će biti značajno veće, doći će do apoptoze stanica kanalića, a samim time povećava se i smrtnost nakon ishemijskog ili toksičnog akutnog oštećenja bubrega (93). No, ukoliko dođe do kontinuirane aktivacije Wnt/beta kateninskog puta dolazi do progresije u kroničnu bubrežnu bolest. Smatra se da je upravo ovakva kontinuirana aktivacija Wnt/beta kateninskog puta osnova u nastanku različitih fibroznih kroničnih bubrežnih bolesti poput opstruktivne nefropatije, dijabetičke nefropatije, policistične bolesti bubrega i kronične glomerulopatije presatka (97,98,99).

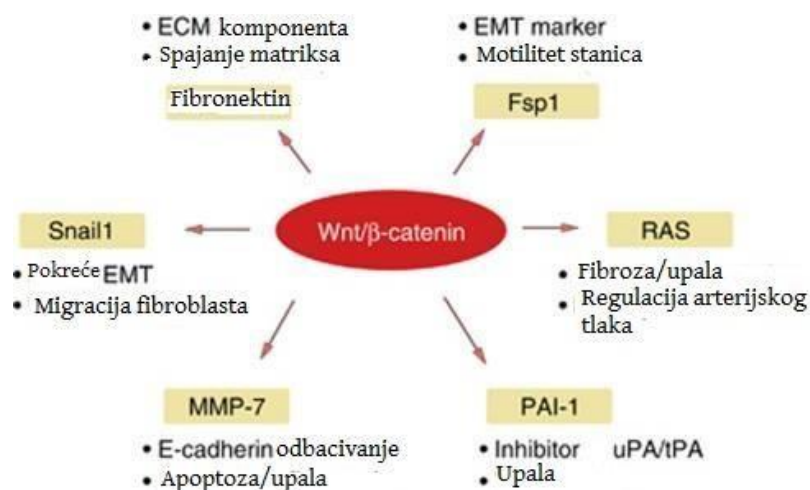
Iz navedenog možemo zaključiti da je ovaj signalni put ključan za oporavak nakon akutnog oštećenja bubrega. No, njegova kontinuirana aktivacija dovesti će do razvoja fibroze bubrežnog tkiva i kronične bubrežne bolesti. Za sada još nije poznato ima li ključnu ulogu jedan određeni pripadnik Wnt obitelji ili je nekoliko njih potrebno za gore navedene procese u razvoju fibroze.

Temeljem navedenog pretpostavljeno je da iste one molekule koje reguliraju nefrogenezu sudjeluju u patofiziologiji tubulointersticijskih bolesti, ali i u procesu oporavka bubrežnog tkiva nakon oštećenja. Za sada još uvijek nije razjašnjeno kada će Wnt djelovati protektivno na bubrežni parenhim, a kada će sudjelovati u procesu bubrežnog oštećenja. Moguće je da odgovor leži u različitim signalnim putevima kojima se može pokrenuti kaskada unutarstaničnih odgovora ili u izvanstaničnim uvjetima koji imaju mogućnost usmjeravanja daljnjeg razvoja događaja. Ne smije se zaboraviti niti interakcija s mogućim inhibitorima ili aktivatorima Wnt ili njegovih signalnih molekula.

Mehanizam kojim Wnt/beta katenin signalni put dovodi do nastanka fibroze je aktivacija ciljnih gena, prije svega onih odgovornih za proliferaciju, poput c-Myc i cyclin D1 (97,98). Ciljni geni su fibronektin, Fsp1 (od engl. fibroblast specific protein 1), Snail, MMP-7 (od engl. matrix metalloproteinase-7), PAI-1 (od engl. plasminogen activator inhibitor-1) i komponente sustava renin - angiotenzin (99). Snail je ključan transkripcijski faktor koji regulira proces epitelno mezenhimalne transformacije (EMT). Njegov mehanizam djelovanja je usmjeren na supresiju E-cadherina zbog čega izostaje adhezija epitelnih stanica što je prvi korak u procesu EMT (100,101). Drugi ciljni gen je MMP-7, sekretorna cink kalcij ovisna endopeptidaza koja razgrađuje komponente ekstracelularnog matriksa poput elastina i sindekana, djeluje na Fas ligand, TNF alfa i E kadherin. Aktivnost MMP-7 je direktno ovisna o Wnt/beta kateninu i u budućnosti bi mogao koristiti kao biomarker bubrežne aktivnosti Wnt/beta katenina, a također je dokazana poveznica sa težinom fibroznih lezija (102). PAI-1 (od engl. plasminogen aktivator tip 1) je glikoprotein akutne faze. Pod utjecajem Wnt/beta katenina dolazi do njegove pojačane ekspresije u tubularnim stanicama gdje potiče indukciju TGF beta, mobilizaciju upalnih stanica i miofibroblasta i na taj način dovodi do fibroze (103).

Jedan od mogućih mehanizama putem kojih Wnt/beta katenin dovodi do nastanka fibroze u bubregu je putem RAS sustava koji dovodi do povećanja oksidativnog stresa, ekspresije TGF beta i nastanka fibroze. Postoje istraživanja kojima je dokazano da RAS sustav posjeduje TCF/LEF vezna mjesta na koja se veže beta katenin. To u budućnosti otvara terapijske mogućnosti putem djelovanja na RAS sustav u smislu sprečavanja nastanka fibroze u bubregu (104).

Glomeruloskleroza je čest zajednički ishod većine bubrežnih bolesti. Prema novijim istraživanjima postoje dokazi da Wnt/beta katenin dovodi do oštećenja i disfunkcije podocita, razvoja proteinurije i glomeruloskleroze. Postoji nekoliko eksperimentalnih mišjih modela gdje je dokazano da se blokadom Wnt sprječava razvoj proteinurije. Blokadu Wnt se postiže primjenom endogenog antagonista Wnt DKK1 i paracalcitola (83). Način na koji Wnt/beta katenin dovodi do disfunkcije podocita je putem regulatornih molekula poput Snail, TRPC 6 (od engl. transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 6), receptora tip I za angiotenzin II i Wilmsov tumor 1. U tubularnim stanicama beta katenin potiče ekspresiju Snaila što uzrokuje dediferencijaciju epitelnih stanica i proces EMT (105). TRPC6 se nalazi na podocitima, a aktivira ga visoka vrijednost šećera u krvi, naravno njegova aktivacija je ovisna o Wnt/beta kateninu. Ovim je mehanizmom moguće objasniti na koji način dijabetes uzrokuje proteinuriju (106).



Slika 7. Shematski prikaz uloge Wnt u nastanku fibroze bubrega
Prilagođeno prema: 88

1.3.5. Moguće terapijske strategije usmjerene na Wnt

Vodeći uzrok disfunkcije presatka verificiran histopatološkom analizom je intersticijska fibroza i tubularna atrofija (IFTA) (107). U postupan gubitak funkcije presatka uključeni su svi dijelovi bubrežnog parenhima: krvne žile, glomeruli, intersticij i tubuli, no glavni čimbenik je IFTA (108). Proces epitelno-mezenhimalne tranzicije (EMT) je jedan od glavnih puteva koji vode do gubitka nefrona i razvoja fibroze (109). U procesu EMT stanice epitela tubula gube svoj fenotip karakterističan za epitel i poprimaju karakteristike stanica mezenhima. Jedan od glavnih profibrotskih faktora je TGFβ1 (od engl. transforming growth factor) koji regulira EMT. Učinci TGFβ1 su višestruki. Glavni je induktor stvaranja izvanstaničnog matriksa, sudjeluje u regulaciji staničnog rasta, diferencijacije, stvaranja citokina i moduliranja stanične imunosti. TGFβ1 potiče intersticijsku fibrozu procesom EMT što je jedan od glavnih putova gubitka nefrona i razvoja fibroze (110,111,112). U posljednje vrijeme započela su ispitivanja nekih novih glikoproteina u procesu bubrežne fibroze pa tako i glikoproteina iz obitelji Wnt.

Do sada je prepoznato nekoliko mogućih ciljnih mehanizama kojima se smanjuje aktivnost Wnt/beta katenina i na taj način intersticijska fibroza. Jedan od njih je Klotho koji veže nekoliko Wnt tijekom oštećenja bubrega i na taj se način smanjuje aktivnost beta katenina (113). Drugi mogući antagonist Wnt je već ranije spomenuti DKK1 (77).

Također je dokazano da agonisti receptora za vitamin D (VDR), poput parakalcitola, imaju renoprotektivan učinak u kroničnoj bubrežnoj bolesti jer smanjuju oštećenje podocita i nastanak proteinurije što postižu blokadom Wnt/beta katenina. Način na koji dolazi do blokade beta katenina je ulazak VDR u jezgru, nakon aktivacije parakalcitolom, gdje interferiraju sa beta kateninom prilikom aktivacije ciljnih gena (114).

Obzirom da je nekoliko različitih Wnt-a povezano sa mogućnošću nastanka bubrežne bolesti, terapijski je nemoguće djelovati na sve njih. Zato se upravo beta katenin razmatra kao dobra terapijska opcija jer su svi Wnt signalni putevi ovisni o njemu. Za sada je prepoznata molekula ICG-001 koja može selektivno inhibirati beta katenin/TCF vezanu transkripciju gena jer se beta katenin prilikom ulaska u jezgru stanice veže za TCF/LEF transkripcijski faktor (113).

Obzirom da je najčešći uzrok gubitka funkcije presađka bubrega IFTA, bolje razumijevanje procesa koji do nje dovode moglo bi otvoriti nove terapijske mogućnosti s ciljem poboljšanja preživljenja primatelja i presatka. Potrebno je daljnjim istraživanjima razjasniti mehanizme nastanka određenih bubrežnih bolesti.

2. HIPOTEZA

Postoji povećana izraženost Wnt 4 u presađenim u odnosu na zdrave bubrege, a razlikuje se u odnosu na uzrok graftektomije.

3. CILJEVI RADA

3.1. Opći cilj rada

Ispitati povezanost uzorka izraženosti Wnt 4 i uzroka poremećaja funkcije presatka bubrega i posljedičnog kirurškog odstranjenja.

3.2. Specifični ciljevi

1. odrediti opće karakteristike populacije bolesnika kojima je učinjeno kirurško uklanjanje presatka bubrega.
2. na osnovi dobivenog uzorka izraženosti Wnt 4 i analize karakteristika populacije pretpostaviti njegovu ulogu u poremećaju funkcije presatka bubrega koji rezultira kirurškim uklanjanjem presadaka.

4. MATERIJALI I METODE

4.1. ISPITANICI

U istraživanje smo uključili 59 bolesnika kojima je zbog završnog stadija zatajenja bubrežne funkcije učinjena transplantacija bubrega sa umrle osobe. Uzorci za imunohistokemijsko bojenje i patohistološku analizu dobiveni su iz parafinskih kocki tkiva presađenih bubrega koji su iz ispitanika, zbog različitih indikacija, kirurški uklonjeni u različitim vremenskim razdobljima od transplantacije bubrega.

Za sve ispitanike prikupili smo osnovne podatke pregledom povijesti bolesti arhiviranih u Klinici za unutarnje bolesti KBC Zageb. Prikupljeni su podaci o spolu, dobi bolesnika u trenutku transplantacije, osnovnoj bubrežnoj bolesti, načinu i duljini nadomještanja bubrežne funkcije prije transplantacije bubrega, imunosupresivnoj terapiji, postojanju infekcije virusom hepatitisa B ili C, patohistološki nalaz biopsije bubrega prije kirurškog uklanjanja, indikacije zbog koje je učinjeno kirurško uklanjanje presatka te patohistološki nalazi nakon kirurškog uklanjanja presatka.

4.2. KONTROLNA SKUPINA

Kao kontrolna skupina uzeti su uzorci zdravog tkiva bubrega, dobiveni nefrektomijom bolesnika s lokaliziranim tumorom bubrega. U kontrolnoj skupini analizirana su 24 uzorka. Za analizu smo koristili tkivo uzeto s najudaljenijeg mjesta od sijela tumora, histoloških karakteristika zdravog tkiva bubrega.

4.3. METODE

Svi uzorci ispitivane skupine dobiveni su kirurškim uklanjanjem presatka bubrega u različitim vremenskim periodima od transplantacije bubrega. Uzorci tkiva su odmah po kirurškom uklanjanju rezani na veličinu 1:1:0,5 cm, a potom su fiksirani u 10% puferiranom formalinu, dehidrirani u rastućem nizu alkohola, provedeni kroz ksilol i uklopljeni u parafinske kocke na 60 °C.

4.3.1. Priprema patohistološkog materijala

Iz parafinskih blokova rezani su rezovi debljine 4-5 μm . Nakon fiksacije na staklu, deparafinirani su u ksilolu i rehidrirani u silaznom nizu alkohola. Nakon navedenih postupaka uslijedilo je razotkrivanje antigena u PT LINK-u uz korištenje Dako pufera „3 in 1“ pH 9.0 na temperaturi od 97 °C kroz 20 minuta, nakon čega je uslijedilo ispranje u puferu En Vision FLEX Wash Buffer pH 7.6. Tako pripremljeni preparati dalje su imunohistokemijski bojani.

4.3.2. Postupak imunohistokemijskog bojenja

Uzorci pripremljeni prema gore opisanom načinu inkubirani su sa mišjim monoklonskim protutijelom Wnt 4 (B-6), proizvođača Santa Cruz u razrijeđenju 1:50 na sobnoj temperaturi kroz 30 minuta, te sa mišjim poliklonskim protutijelom anti-C4d proizvođača Abcam u razrijeđenju 1:100 na sobnoj temperaturi kroz 30 minuta. Blokiranje tkivne peroksidaze je postignuto 3% vodikovim peroksidom (En Vision FLEX plus K8000) tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Vizualizacijski kit koji se koristio je EnVision FLEX plus K8000 uz inkubaciju na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Kao kromogen koristili smo DAB (diaminobenzidin) tijekom 10 minuta na sobnoj temperaturi. Nastala pozitivna reakcija bila je smeđe boje. Potom su stakalca kontrastno obojana hematoksilinom. Cijeli postupak imunohistokemijskog bojenja proveden je u aparatu Autostain Dako. Radi se o aparatu koji ima automatizirani sustav za bojenje preparata parafinskih ili smrznutih rezova, citoloških uzoraka i razmaza stanica. Sastoji se od integrirane aparature za bojanje i programske podrške koja sa prikladnim reagensima omogućava automatizirano imunohistokemijsko i imunocitokemijsko bojanje.

4.3.3. Mikroskopiranje

Svi preparati bojani imunohistokemijskom metodom na Wnt 4 i C4d mikroskopirani su, a izraženost Wnt 4 i C4d procijenjeni su semikvantitativnom metodom. Uzorci bojani na Wnt 4 su bodovani prema raspodjeli pozitivnih stanica, u rasponu bodova od 0 do +++, prema protokolu: +++ više od 75 % stanica je pozitivno; ++ 50-74% pozitivnih stanica; 1+ 10-49 % pozitivnih stanica; i 0 ako je < 10 % stanica pozitivno. Analizirano je 8 vidnih polja mikroskopa, pri povećanju x 400, s najmanje 500 stanica svakog uzorka.

Procijenjen je postotak kortikalnih peritubularnih kapilara pozitivan imunohistokemijski na C4d, koji je analiziran na najmanje 8 vidnih polja mikroskopa, pri povećanju x 400. Korišten je Banff sustav skoriranja (C4d0 – 0%, C4d1 - 1 - 9%, C4d2 - 10–50%, C4d3 ->50%).

4.3.4. Etičnost istraživanja

Istraživanje je retrospektivno, uzorci i podaci o ispitanicima prikupljeni su pregledom arhive Zavoda za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju, Zavoda za patologiju te Zavoda za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb. Osigurana je privatnost bolesnika uključenih u ispitivanje (medicinska tajna) kao i zaštita tajnosti podataka.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo KBC Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

4.3.5. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka izvršena je licenciranim programom STATISTICA StatSoft inc. (Serial number AGA304B211928E61). Promatrani parametri opisani su deskriptivnom statistikom i frekvencijskim tablicama. Za testiranje statističke razlike između skupina u odnosu na dob korišten je t-test za nezavisne uzorke, a za testiranje razlike u odnosu na dob hi-kvadrat test i Yates korekcija. Za testiranje statističke razlike između dvije kategorije opisnih parametara u odnosu na parametre s cjelobrojnim vrijednostima korišten je Mann-Whitney U test, a za testiranje statističke razlike između tri ili više kategorija Kruskal-Wallis ANOVA.

Za testiranje statističke razlike između dvije kategorije opisnih parametara u odnosu na numeričke parametre korišten je t-test za nezavisne uzorke, a za testiranje statističke razlike između tri ili više kategorija analiza varijance (ANOVA). Statistička povezanost parametara s cjelobrojnim vrijednostima i numeričkih parametara testirana je Spearman rang korelacijom i regresijskom analizom. Preživljenje presatka je analizirano Kaplan-Meierovom metodom. Rezultati dobiveni statističkom obradom prikazani su grafički i tablično. Statističko testiranje provedeno je na razini značajnosti od 95% ($\alpha=0,05$). To znači, da je pouzdanost statističkih rezultata dobivenih na ovom uzorku 95%, a dozvoljena statistička pogreška najviše 5% (0,05). Ako je p-vrijednost, dobivena statističkim testiranjem, manja od statističke pogreške 0,05 ($p<0,05$) tada postoji statistički značajna razlika između promatranih pokazatelja, a ako je $p>0,05$ tada ta razlika nije statistički značajna.

5. REZULTATI

5.1. OBILJEŽJA ISPITANIKA

Prosječna dob bolesnika u trenutku transplantacije bila je 40,3 godine. Od 59 ispitanika, 51% su bili muškarci. Nadomještanje bubrežne funkcije hemodijalizom je bilo zastupljeno u 91% ispitanika. Prosječno trajanje nadomještanja bubrežne funkcije prije transplantacije bubrega iznosilo je 182,4 mjeseca. Obilježja ispitivane skupine detaljnije su prikazana u tablici 9., a raspodjela osnovne bolesti ispitanika prikazana je u tablici 10.

Tablica 9. Obilježja ispitivane skupine

Obilježje	Vrijednost
Dob u trenutku transplantacije	40.3 godine
Spol	51% muškarci 49% žene
Nadomještanje bubrežne funkcije prije transplantacije	91% HD 9% PD
Duljina nadomještanja bubrežne funkcije (mjeseci) prije transplantacije	182,4 mjeseca
Infekcija hepatitsom B	7%
Infekcija hepatitisom C	14 %
Broj ranijih transplantacija	
0	88%
1	8.5%
2	3.5%

Tablica 10. Raspodjela osnovne bolesti u ispitivanoj skupini

Osnovna bolest bubrega	Broj ispitanika	%
Kronični GNf bez biopsije	32	54,2
VUR+litijaza	7	11,9
SLE	4	6,8
FSGS	4	6,8
Policistična bolest bubrega	4	6,8
Membranoproliferativni GNf	3	5,1
IgA	2	3,4
DM	1	1,7
TTP	1	1,7
Sy Goodpasture	1	1,7
Ukupno	59	100,0

Indikacije za kirurško uklanjanje presatka uključivale su životno ugrožavajuća stanja poput krvarenja ili tromboze krvnih žila presatka, teške infekcije zbog kojih je bila nužna potpuna obustava imunosupresivne terapije, razvoj akutnog odbacivanja presatka nakon zatajenja njegove funkcije i nakon što je kod bolesnika započeto nadomještanje bubrežne funkcije dijalizom. Od ostalih indikacija tu je razvoj rezistentne hipertenzije ili anemije kod koje nije bilo kliničkog odgovora na liječenje visokim dozama eritropoetina u bolesnika kod kojih je nastupila kronična insuficijencija presatka i koji su započeli nadomještanje bubrežne funkcije nekom od metoda dijalize. Podjela indikacija za kirurško uklanjanje presatka navedena je u tablici 11.

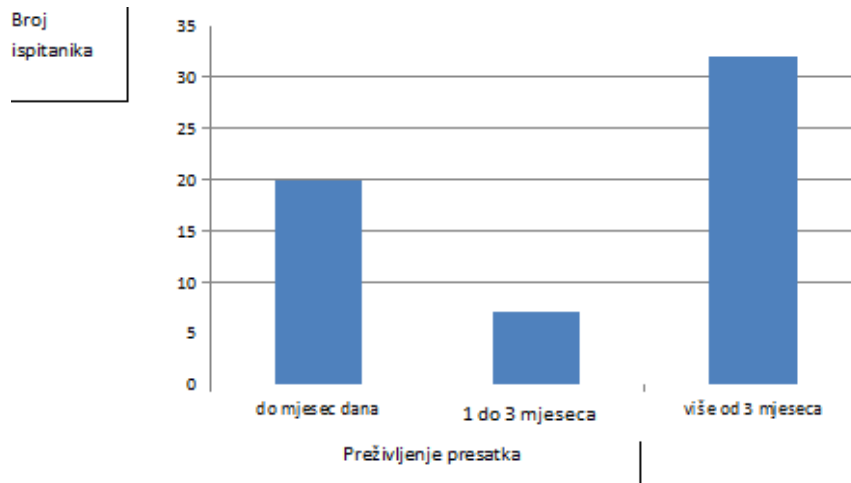
Tablica 11. Indikacije za kirurško uklanjanje prestaka

Uzrok kirurškog uklanjanja presatka	Broj	%
kronična disfunkcija presatka	22	37,3
životno ugrožavajuća infekcija	11	18,6
tromboza krvnih žila presatka	9	15,3
životno ugrožavajuće krvarenje	7	11,9
akutno odbacivanje	7	11,9
tumor presatka	2	3,4
povrat osnovne bolesti	1	1,7
Ukupno	59	100,0

Za potrebe istraživanja indikacije za kirurško uklanjanje presatka prema vremenu nakon transplantacije možemo podijeliti na rane (do mjesec dana nakon transplantacije), srednje (1 do 3 mjeseca od transplantacije) i kasne (više od 3 mjeseca nakon transplantacije) (121).

Među rane indikacije ubrajaju se tromboza krvnih žila ili krvarenje koje nije moguće kirurški liječiti. Indikaciju u srednjem vremenu nakon transplantacije mogu predstavljati akutno odbacivanje u bolesnika s potencijalno smrtonosnim infekcijama, ali i promjene na krvnim žilama koje nije moguće kirurški liječiti. U kasne indikacije ubrajamo zloćudne novotvorine bolesnika koji radi toga ne mogu nastaviti imunosupresivno liječenje te sve one indikacije koje se javljaju u bolesnika koji su nakon zatajivanja funkcije presatka ponovno započeli s nadomještanjem bubrežne funkcije nekom od metoda dijalize.

Analizom dužine preživljenja presatka, odnosno vremena proteklog od transplantacije do kiruškog uklanjanja presatka uočeno je da je prosječno preživljenje presatka bilo 38,6 mjeseci. Raspodjela ispitanika prema dužini trajanja presatka izraženo u mjesecima prikazana je na slici 8.



Slika 8. Raspodjela broja ispitanika ovisno o duljini preživljenja presatka

Kod svih ispitanika, odnosno kiruški uklonjenih presadaka, patohistološkom analizom utvrđen je stupanj odbacivanja i proširenost kroničnih promjena prema Banff klasifikaciji. Obzirom da su podaci prikupljeni iz arhive, odnosno povijesti bolesti ispitanika, patohistološki nalazi starijeg datuma su određeni prema Banff klasifikaciji iz 2007. godine, a ostali prema revidiranoj Banff klasifikaciji iz 2013. godine. Prilikom analize u obzir su uzete karakteristike donora bubrega: dob, spol, uzrok smrti. Podaci su dobiveni pregledom arhive Zavoda za tipizaciju tkiva KBC-a Zagreb te baze Eurotransplanta.

Prosječna dob donora bubrega bila je 49,8 godina. Sa 68% su bili zastupljeni muškarci, njih 40, dok je svega 32% donora bubrega bilo ženskog spola, njih 19. Svi ispitanici su primili bubreg od donora sa kucajućim srcem obzirom da se u našoj ustanovi ne prihvaćaju bubrezi donora sa nekucajućim srcem. Uzrok smrti donora prikazan je u tablici 12.

Tablica 12. Uzrok smrti donora.

Uzrok smrti	Broj	%
Subarahnoidalno krvarenje	20	33,9
Trauma	16	27,1
Intracerebralno krvarenje	15	25,4
Kardiovaskularni incident	7	11,9
Srčani arest	1	1,7
Ukupno	59	100,0

Obzirom na važnost podudarnosti između donora bubrega i primatelja, kako za planiranje imunosupresivne terapije tako i za kasnije preživljenje presatka i razvoj komplikacija u smislu odbacivanja presatka, u analizu su uzete i HLA podudarnosti.

U tablicama 13. i 14. prikazan je broj ukupnih podudarnosti po ispitanicima kao i izdvojene podudarnosti u skupini DR.

Tablica 13. Ukupan broj podudarnosti u ispitivanoj skupini.

Broj podudarnosti (ukupno)	Broj ispitanika	%
2	10	16,9
3	25	42,4
4	18	30,5
5	6	10,2
Ukupno	59	100,0

Tablica 14. Podudarnost u DR skupini

Podudarnost DR	Broj ispitanika	%
0	4	6,8
1	41	69,5
2	14	23,7
Ukupno	59	100,0

Za sve ispitanike prikupljeni su podaci o protokolu imunosupresivnog liječenja, odnosno jesu li primili indukcijsku terapiju i koju, te kakav je bio protokol terapije održavanja (tablica 15.).

Tablica 15. Raspodjela indukcijske terapije kod ispitanika

indukcija atg 1, basiliximab 2, bez indukcije 0	Broj ispitanika	%
0	35	59,3
1	4	6,8
2	13	22,0
Nije poznato	7	11,9
Ukupno	59	100,0

Svi su ispitanici imali trojnu imunosupresivnu terapiju održavanja koja se sastojala od kortikosteroida koji su imali svi ispitanici, inhibitora kalcineurina (ciklosporina ili takrolimusa), s tim da je kod nekih bolesnika u tijeku liječenja jedan inhibitor kalcineurina zamjenjen drugim te mikofenolat mofetila ili azatioprina kao trećeg lijeka. Zastupljenost pojedinih lijekova po ispitanicima prikazana je u tablicama 16. i 17.

Tablica 16. Raspodjela mikofenolata i azatioprina kod ispitanika

Antiproliferativni lijek	Broj ispitanika	%
Mikofenolat	47	79,2
Azatioprin	12	20,8
Ukupno	59	100,0

Tablica 17. Raspodjela ciklosporina i takrolimusa kod ispitanika

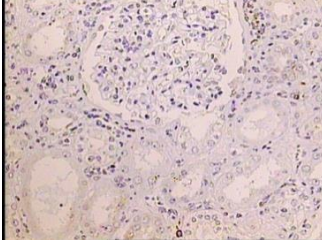
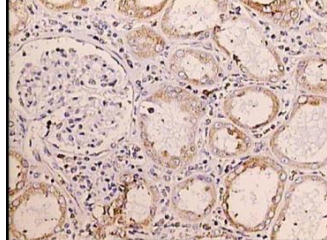
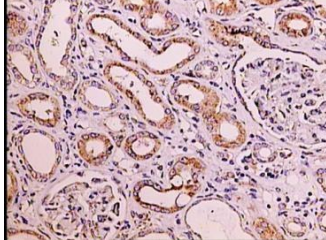
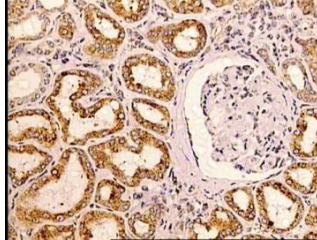
Inhibitor kalcineurina	Broj ispitanika	%
Ciklosporin	43	72,9
Takrolimus	14	23,7
Nije poznato	2	3,4
Ukupno	59	100,0

Za analizu utjecaja trajanja hladne ishemije na izražaj Wnt 4 i preživljenja presatka prikupljeni su podaci o 31 bolesniku iz registra Eurotransplanta (za ranije transplantirane bolesnike nismo uspjeli prikupiti podatke). Bolesnici su podijeljeni u dvije skupine, prvo prema trajanju hladne ishemije, kraće i duže od 16 sati (12 vs 19 bolesnika), te prema izražaju Wnt 4, slabom (0 i 1) te jakom (2 i 3) (13 vs 18 bolesnika).

5.2. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE NA Wnt 4

Imunohistokemijskim bojanjem prikazana je izraženost Wnt 4 u tkivu kiruški odstranjenih transplantiranih bubrega te u zdravom tkivu bubrega kontrolne skupine. U zdravom tkivu bubrega kontrolne skupine pokazana je snažna izraženost Wnt 4 koji je bio pozitivan u više od 50 % stanica (++), a kod većine uzoraka i u više od 75 % stanica (+++) proksimalnih, distalnih i kanalića srži.

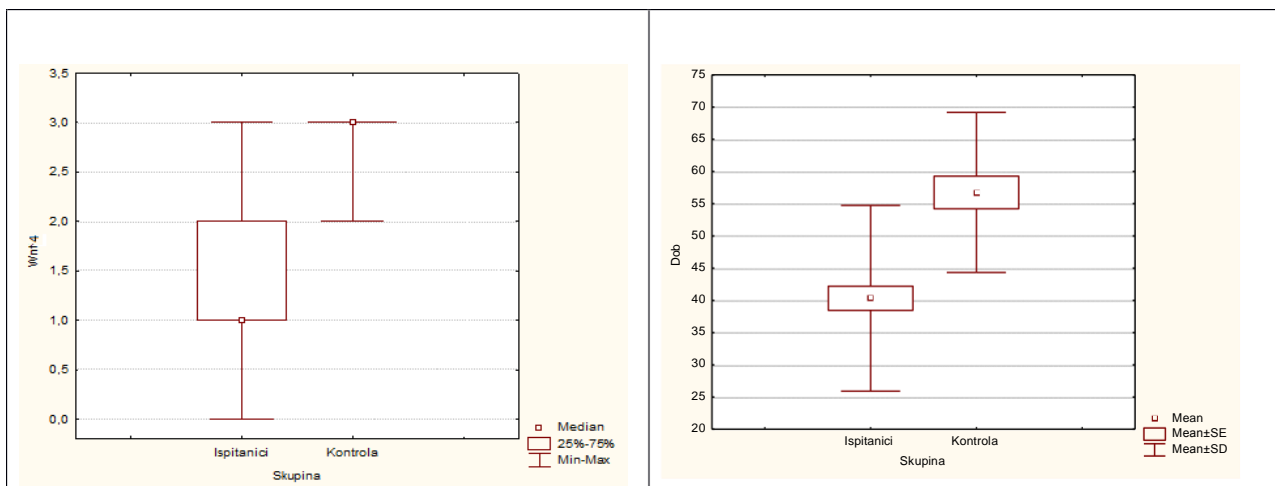
Kod uzoraka u kojima je bojanjem prikazana izraženost Wnt 4 uočen je citoplazmatski pozitivitet epitelnih stanica proksimalnih, distalnih i kanalića srži, dok su stanice Bowmanove čahure i glomerula bile negativne. Za razliku od kontrolne skupine izraženost Wnt 4 u ispitivanoj skupini bio je statistički značajno manji, izraženost Wnt 4 u ispitivanoj skupini te utjecaj drugih mogućih faktora na njegovu izraženost analizirati ćemo dalje u tekstu. Primjeri imunohistokemijskog bojanja uzoraka na Wnt 4 prikazani su na slici 9.

Wnt 4 -	Wnt 4 +	Wnt 4 ++	Wnt 4 +++
			
<p>Imunohistokemijsko bojanje s Wnt 4 je negativno</p>	<p>Citoplazme epitelnih stanica kanalića blago su pozitivne na Wnt 4</p>	<p>Epitel kanalića pokazuje umjereni citoplazmatski pozitivitet na Wnt 4</p>	<p>Jaki citoplazmatski pozitivitet epitelnih stanica kanalića na Wnt 4.</p>

Slika 9. Primjeri imunohistokemijskog bojanja uzoraka na Wnt 4.

5.2.1. Usporedba izraženosti Wnt 4 u ispitivanoj i kontrolnoj skupini

Izraženost Wnt 4 statistički je ($p < 0,05$) značajno viša u kontrolnoj u odnosu na ispitivanu skupinu. Prilikom analize rezultata uzeli smo u obzir dobne karakteristike pojedinih skupina, iz dobivenih podataka možemo vidjeti da je dob kontrolne skupine statistički značajno viša u odnosu na ispitivanu skupinu (slika 10.; tablica 18.).



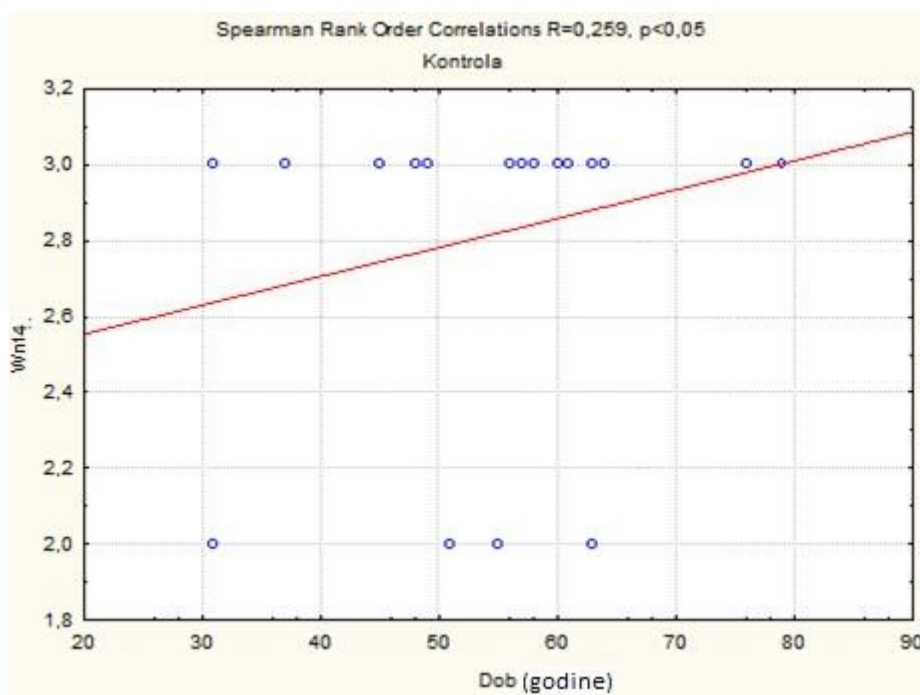
Slika 10. Mann-Whitney U test pokazuje da su vrijednosti Wnt 4 statistički značajno više u kontrolnoj skupini nego kod ispitanika ($p < 0,05$). Dob kontrolne skupine je statistički značajno viša u odnosu na ispitanu skupinu.

Tablica 18. Studentov t-test za nezavisne uzorke pokazuje da je dob u kontrolnoj skupini statistički značajno viša od dobi ispitanika ($p < 0,05$).

Raspodjela ispitanika po dobi prema skupinama

Dob	N	Prosjek	Medijan	Minimum	Maximum	Std.Dev.
Ispitanici (u trenutku transplantacije)	59	40,3	43,0	13	68	14,42
Kontrola	24	56,8	57,5	31	79	12,42

Dob ima utjecaja na izraženost Wnt 4, jer kao što je prikazano na slici 11, izraženost Wnt 4 statistički značajno raste s dobi kontrolne skupine.



Slika 11. Izraženost Wnt 4 raste s dobi kontrolne skupine.

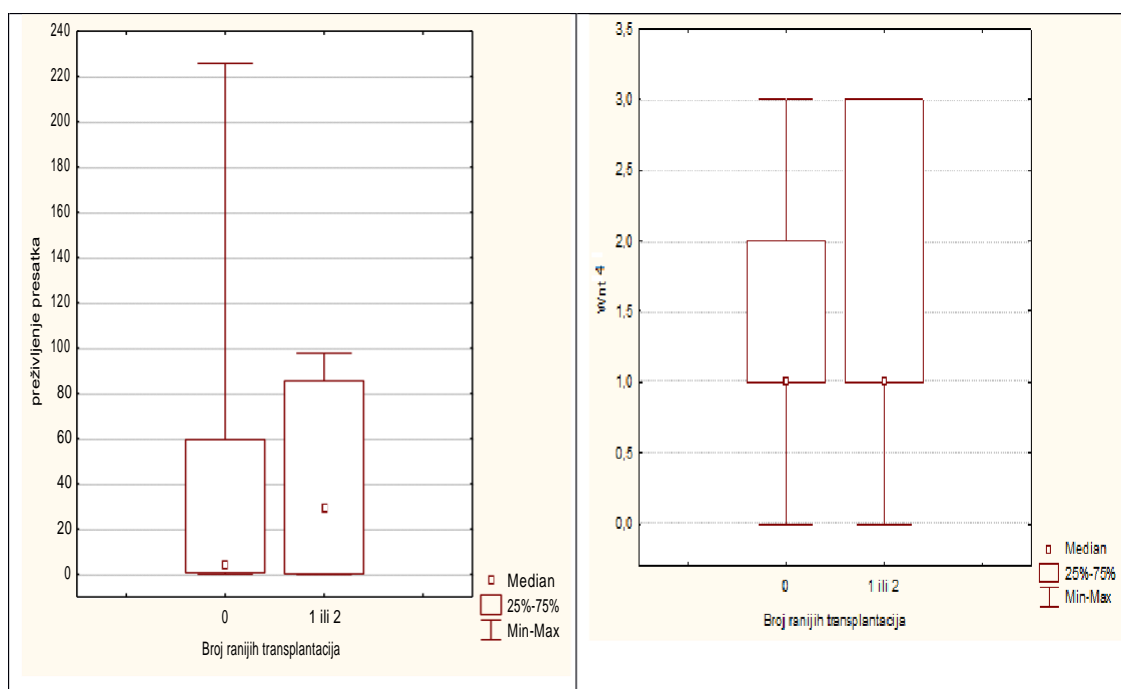
5.2.2. Obilježja ispitivane skupine prije transplantacije bubrega i utjecaj na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4

Da bi vidjeli što sve može utjecati na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4 u tkivu kiruški uklonjenog presatka analizirali smo čimbenike za koje se smatra da imaju na to utjecaja. Prije svega smo u obzir uzeli osnovnu bolest bubrega te metodu nadomještanja bubrežne funkcije prije transplantacije. Iz tablice 10 (str. 45) vidimo da više od 50 % ispitanika u trenutku započinjanja nadomještanja bubrežne funkcije nije imalo postavljenu dijagnozu osnovne bubrežne bolesti već su vođeni pod dijagnozom kronični glomerulonefritis bez biopsije. Za bolesnike kojima je postavljena dijagnoza osnovne bolesti nije nađena statistički značajna razlika izraženosti Wnt 4 u ovisnosti o osnovnoj bolesti.

Bubrežna funkcija je kod većine ispitanika nadomješšana hemodijalizom. Samo kod 5 ispitanika bubrežna funkcija je nadomješšana peritonejskom dijalizom. Niti u te dvije skupine nije nađena značajna razlika u izraženosti Wnt 4.

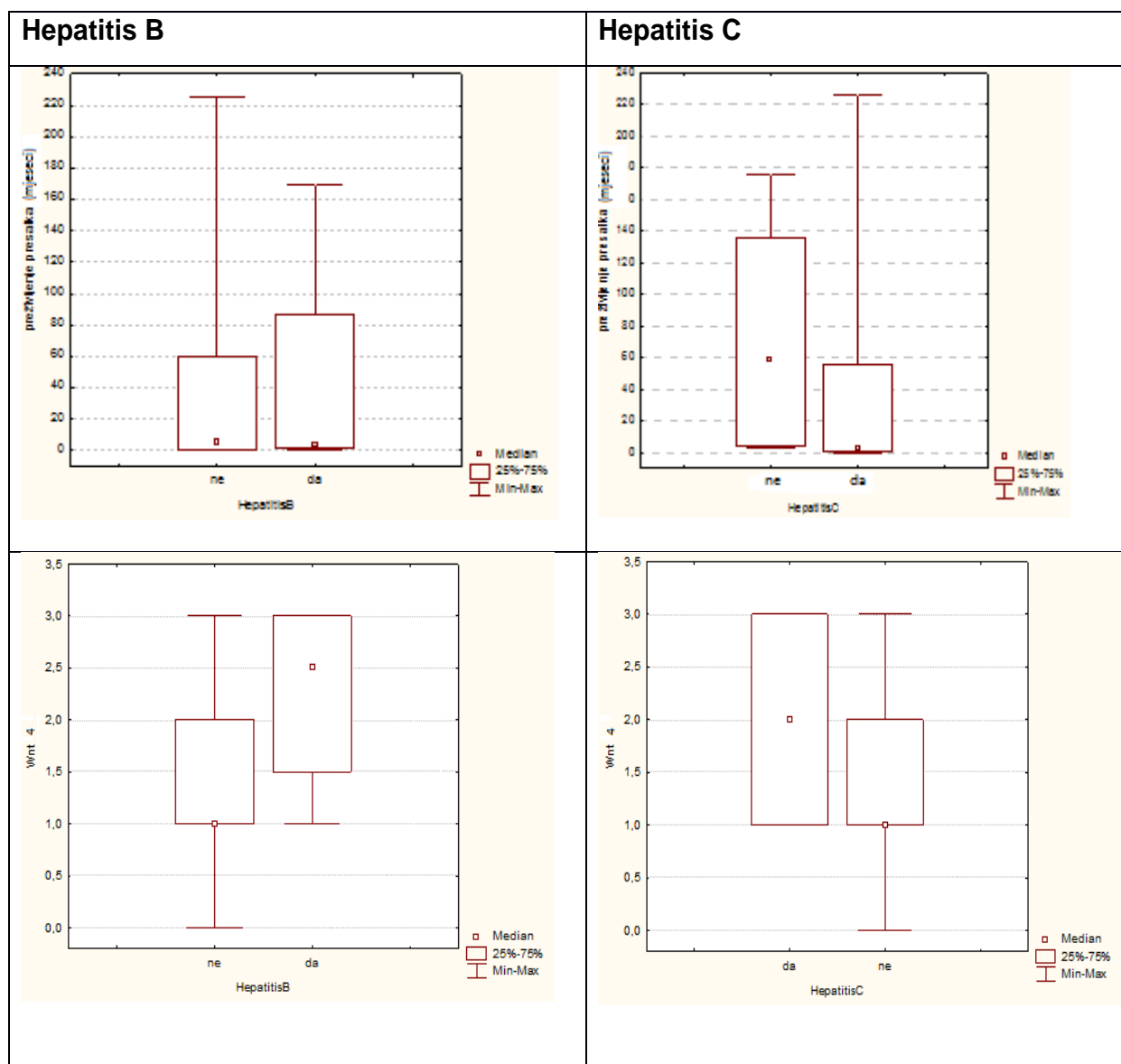
Prosječno trajanje nadomještanja bubrežne funkcije dijalizom prije transplantacije iznosilo je 182,4 mjeseca (najkraće 6,3 mjeseca, a najduže 383,5 mjeseci). Izraženost Wnt 4 među ispitanicima se nije razlikovala u odnosu na duljinu dijalize prije transplantacije.

Petero ispitanika je imalo ranije jednu (tablica 9, str. 45), a dvoje ispitanika dvije transplantacije bubrega, te smo kod njih u obzir uzeli utjecaj ranijih transplantacija na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4. Kao što je prikazano na slici 12, nije nađena razlika niti u duljini preživljenja presatka niti u izraženosti Wnt 4 kod ispitanika koji su imali jednu ili dvije transplantacije u odnosu na one kod kojih se radilo o prvoj transplantaciji.



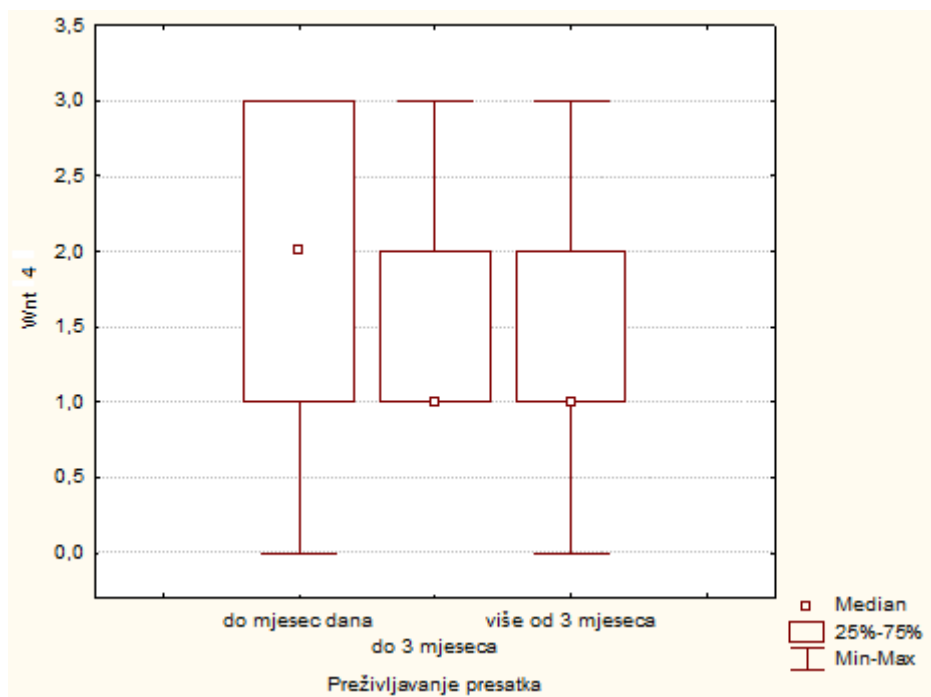
Slika 12. Mann-Whitney U test pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika između ispitanika bez ranijih transplantacija i ispitanika sa jednom ili dvije ranije transplantacije u odnosu na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4 ($p > 0,05$).

Četiri bolesnika su imali infekciju virusom hepatitisa B, a osmero bolesnika je imalo infekciju virusom hepatitisa C (tablica 9, str. 45). Kao što je vidljivo na slici 13, nije nađena statistički značajna razlika u duljini preživljenja presatka niti u izraženosti Wnt4 kod bolesnika koji su imali hepatitis B infekciju u odnosu na one bez infekcije. Kod onih bolesnika koji su imali hepatitis C infekciju nije nađeno razlike u izraženosti Wnt4 u odnosu na one koji nisu imali infekciju, no postoji statistički značajna razlika u duljini preživljenja presatka.



Slika 13. Mann-Whitney U test pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika između ispitanika koji nisu imali hepatitis B i ispitanika koji su imali hepatitis B u odnosu na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4 ($p > 0,05$). Ne postoji statistički značajna razlika između ispitanika koji nisu imali hepatitis C i ispitanika koji su imali hepatitis C u odnosu na izraženost Wnt 4 ($p > 0,05$), ali postoji statistički značajna razlika u odnosu na duljinu preživljenja presatka ($p < 0,05$).

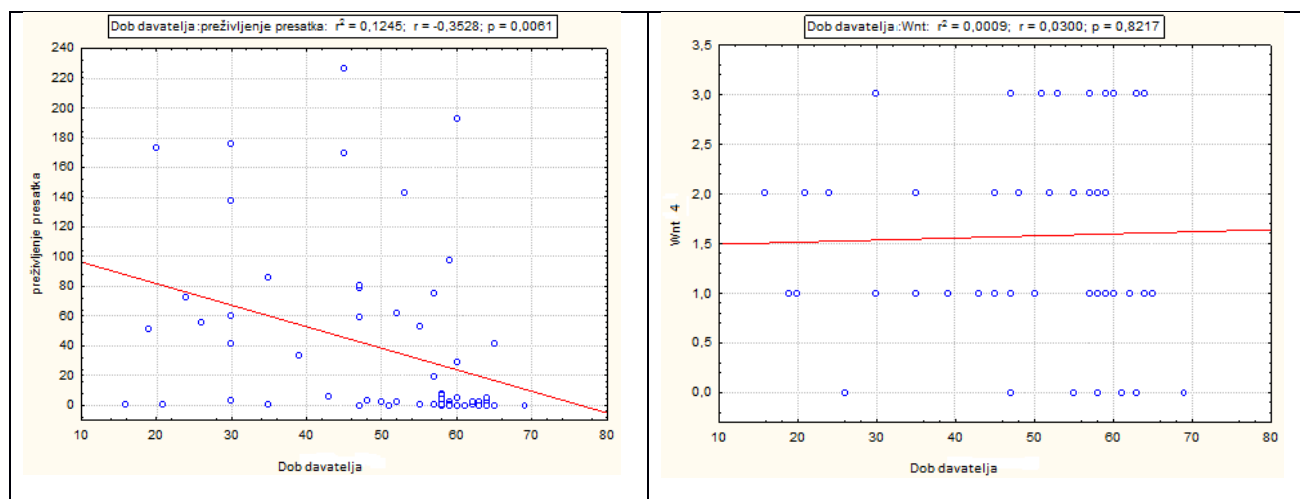
Za potrebne daljnje analize izraženosti Wnt 4, duljinu preživljenja presatka podjelili smo u tri skupine, ovisno o vremenskom razdoblju koje je proteklo od transplantacije do kirurškog uklanjanja presatka. Prvu skupinu čine oni presatci koji su uklonjeni unutar mjesec dana od transplantacije, u drugoj skupini su oni koji su uklonjeni unutar jedan do tri mjeseca nakon transplantacije, a u trećoj skupini su oni koji su bili u primatelju duže od tri mjeseca po transplantaciji (slika 8, str. 47). Analizom smo dobili statistički značajno veću izraženost Wnt 4 u uzorcima bubrega koji su uklonjeni u prvom mjesecu nakon transplantacije (slika 14).



Slika 14. Kruskal-Wallis ANOVA pokazuje da je izraženost Wnt 4 statistički značajno veća kod presatka do mjesec dana od transplantacije nego nakon toga ($p=0,052$).

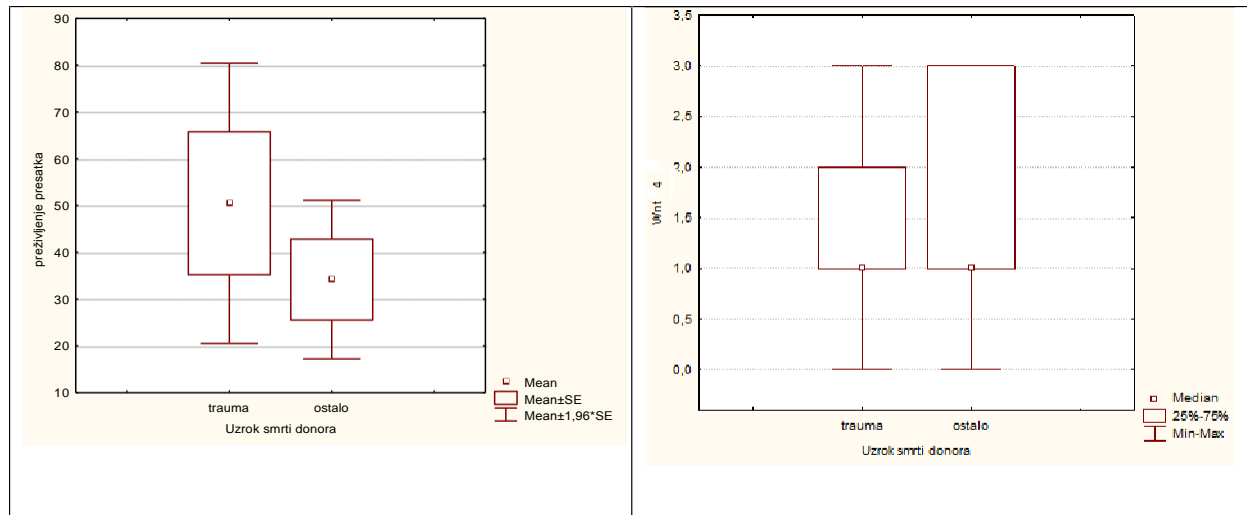
5.2.3. Obilježja darovatelja organa i utjecaj na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt4

Daljnjom analizom ispitivane skupine u obzir smo uzeli obilježja darovatelja bubrega, što u velikoj mjeri utječe na kvalitetu i duljinu preživljenja presatka. Prosječna dob darovatelja bila je 49,8 godina (najmanja 16, a najveća 69 godina), 67,8% je bilo muškog spola. Regresijskom analizom pokazano je da duljina preživljenja presatka statistički značajno pada s porastom dobi darovatelja, dok izraženost Wnt 4 ne korelira dobi darovatelja (slika 15.).



Slika 15. Preživljenje presatka značajno opada s dobi darovatelja (A), dok nije uočen utecaj dobi darovatelja na izraženost Wnt 4 (B).

U obzir je uzet i uzrok smrti darovatelja (tablica 12, str 48). Iz slike 16 je vidljivo da je duljina preživljenja presatka duža kod traume (50 mjeseci) nego kod ostalih uzroka (34 mjeseca) smrti darovatelja. T - testom za nezavisne uzorke nije dokazano da je ova razlika statistički značajna. Najvjerojatnije zato jer je broj trauma (16) znatno manji nego broj ostalih uzroka smrti darovatelja (43).



Slika 16. Utjecaj uzroka smrti darovatelja bubrega na preživljenje presatka i izraženost Wnt 4.

5.2.4. Utjecaj HLA podudarnosti na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4

U obzir smo uzeli ukupan broj podudarnosti u lokusima A, B i DR (tablica 13, str.49), posebno smo izdvojili broj podudarnosti u skupini DR koja se smatra najimunogenijom (tablica 14, str 49.). Najviše je bolesnika imalo 3 ili 4 podudarnosti, dok je najmanji broj podudarnosti iznosio 2. Nitko od ispitanika nije imao 6/6 podudarnosti (tablica 13, str. 49).

U skupini DR većina ispitanika imala je 1 podudarnost, a samo 4 ispitanika nisu imala podudarnost u DR skupini (tablica 14.).

Spearman rang korelacija nije pokazala statistički značajnu povezanost ukupne podudarnosti i podudarnosti u DR s duljinom preživljenja presatka, izraženosti Wnt 4 i C4d ($p > 0,05$).

5.2.5. Utjecaj imunosupresivne terapije na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4

Iako neophodna, imunosupresivna terapija ima neželjene učinke, poput dobro poznate nefrotoksičnosti, najviše opisivane uz dugotrajnu upotrebu inhibitora kalcineurina. No i ostali lijekovi, odnosno terapijski režimi, mogu uvelike utjecati na funkciju presađenog organa i na njegov patohistološki nalaz. Odgovarajuća razina imunosupresivne terapije nužna je za što bolju i dugotrajniju funkciju presađenog organa, ali je i odgovorna za pobol i duljinu preživljenja bolesnika. U našoj grupi ispitanika analizirali smo imunosupresivne lijekove te njihov utjecaj na duljinu preživljenja presatka, komplikacije u smislu akutnih odbacivanja, liječenje akutnih odbacivanja i na koji način se to sve odražava na izraženost Wnt 4.

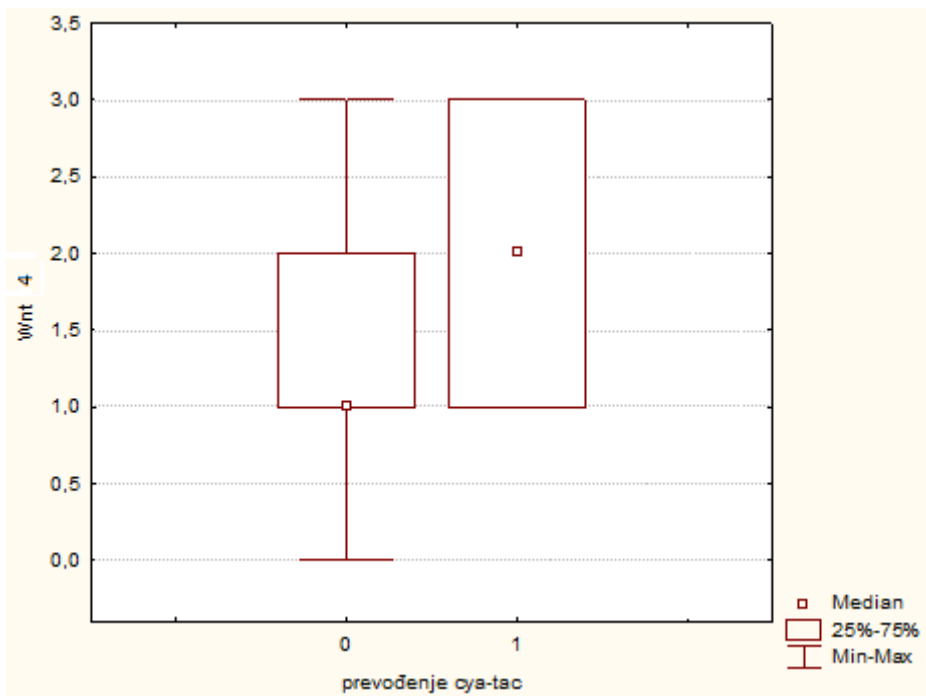
U našem centru standardna imunosupresivna terapija se sastoji od tri lijeka: inhibitora kalcineurina, mikofenolat mofetila ili mikofenolat natrija ili (danas vrlo rijetko) azatioprina te kortikosteroida. Prije samog transplantacijskog postupka u posljednje vrijeme se primjenjuje indukcijska terapija, ovisno o imunološkom profilu bolesnika, antitimocitnim globulinom ili inhibitorima interleukina 2. No, kao što je vidljivo iz rezultata dobivenih analizom imunosupresivne terapije (tablica 15, str. 49), nisu svi ispitanici primili indukcijsku terapiju obzirom da se prijašnjih godina, prema protokolu centra, indukcijska terapija davala samo u bolesnika sa procijenjenim višim imunološkim rizikom.

5.2.5.1. Indukcijska terapija

Većina ispitanika, nije primila indukcijsku terapiju. O onih koji su primili tu terapiju većina je dobila inhibitor interleukina 2, dok su samo 4 ispitanika primila antitimocitni globulin (tablica 15, str. 49).

5.2.5.2. Inhibitori kalcineurina

Prema analiziranim podacima 43 ispitanika su primala ciklosporin, 14 bolesnika je bilo čitavo vrijeme na terapiji takrolimusom, dok je kod 7 ispitanika tijekom liječenja ciklosporin zamjenjen takrolimusom, nakon epizode akutnog odbacivanja presatka. Statističkom analizom nije nađena razlika u izraženosti Wnt4 kod bolesnika koji su uzimali ciklosporin u odnosu na one koji su uzimali takrolimus. Također nije nađena statistički značajna razlike u izraženosti Wnt 4 kod onih bolesnika kojima je ciklosporin zamjenjen takrolimusom (slika 17.).

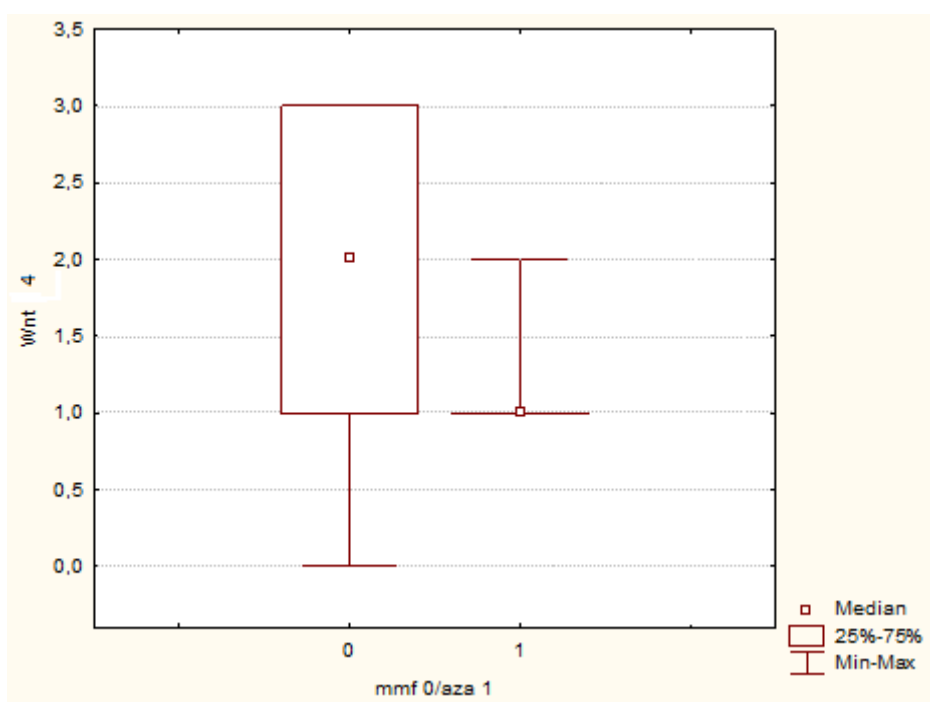


Slika 17. Utjecaj inhibitora kalcineurina na izraženost Wnt 4. Mann-Whitany U test pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika između ispitanika koji su čitavo vrijeme bili na terapiji ciklosporinom (0) u odnosu na ispitanike kojima je ciklosporin zamjenjen takrolimusom (1) ($p=0,334$).

5.2.5.3. Antiproliferativni lijekovi

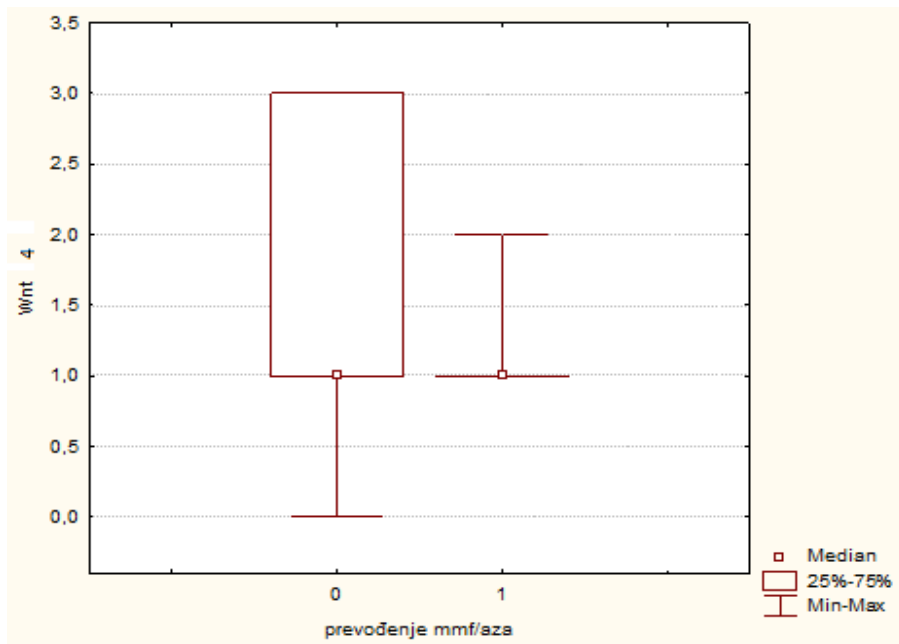
Pregledom medicinske dokumentacije utvrđeno je da je 47 ispitanika u terapiji primalo mikofenolat mofetil ili mikofenolat natrij kao antiproliferativni lijek, dok je njih 12 u terapiji kao antiproliferativni lijek dobivalo azatioprin, a kod 7 ispitanika je tijekom liječenja mikofenolat zamjenjen sa azatioprinom zbog različitih indikacija.

Kao što je vidljivo i iz slike 18. izraženost Wnt 4 se nije statistički značajno razlikovala kod ispitanika koji su u terapiji imali mikofenolat u odnosu na one koji su bili na terapiji azatioprinom.



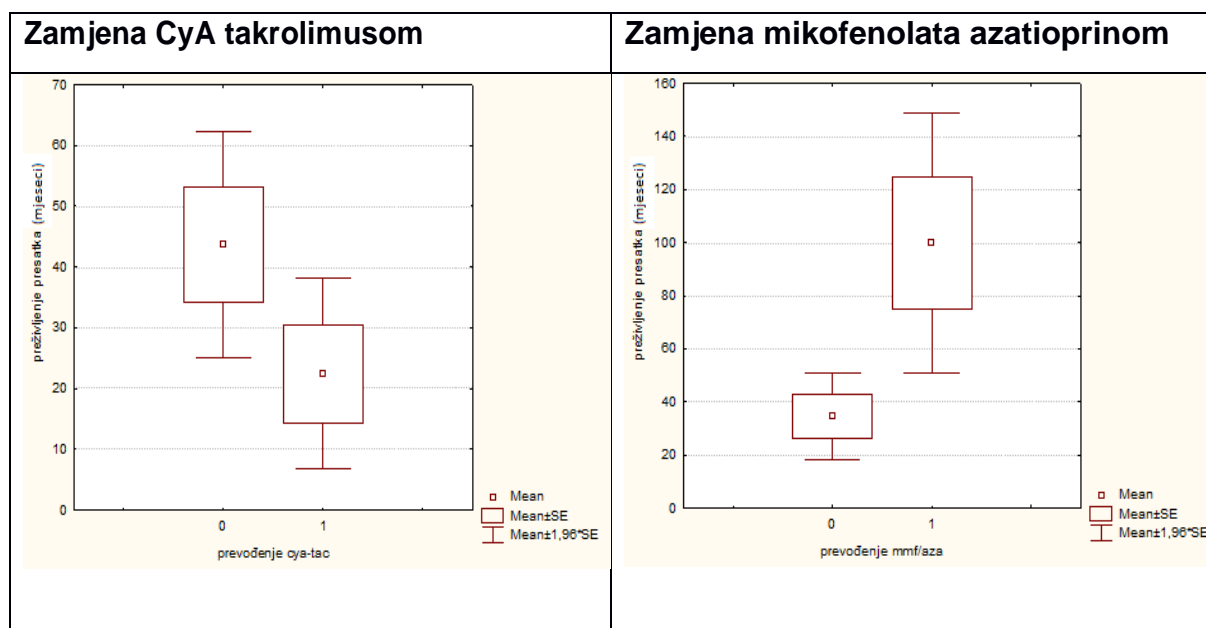
Slika 18. Utjecaj antiproliferativnih lijekova na izraženost Wnt 4. Mann-Whitany U test pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u izraženosti Wnt 4 kod ispitanika koji su imali mikofenolat u terapiju o odnosu na one sa azatioprinom ($p=0,183$).

Statistički značajne razlike u izraženosti Wnt 4 nije nađeno ni kod onih bolesnika kojima je u nekoj od faza liječenja mikofenolat zamjenjen azatioprinom što je prikazano na slici 19.



Slika 19. Utjecaj zamjene antiproliferativnih lijekova na izraženost Wnt 4. Mann-Whitany U test pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u izraženosti Wnt 4 između ispitanika koji su čitavo vrijeme bili na terapiji mikofenolatom (0) u odnosu na one kojima je mikofenolat zamjenjen azatioprinom (1) ($p=0,313$).

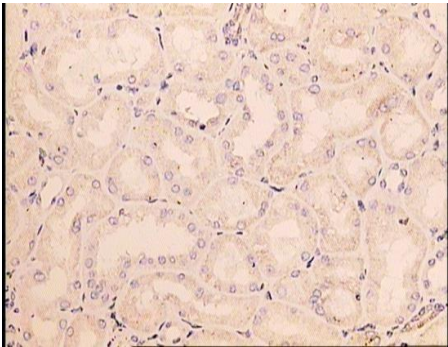
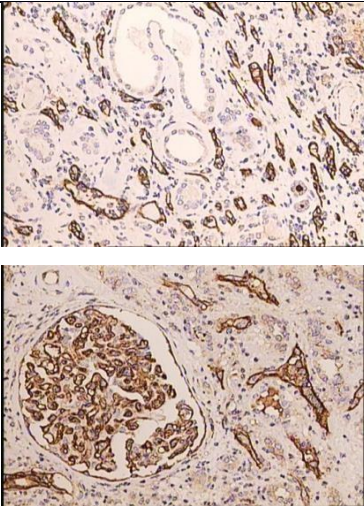
Kod onih bolesnika kojima je tijekom liječenja mikofenolat zamjenjen azatioprinom u usporedbi sa bolesnicima koji su bili isključivo na mikofenolatu t-test za nezavisne uzorke pokazao je da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju presatka u skupini bolesnika koji su u terapiji dobili azatioprin ($p<0,05$), dok ne postoji statistički značajna razlika u duljini preživljenja presatka kod onih ispitanika kojima je ciklosporin zamjenjen takrolimusom ($p>0,05$) (slika 20.).



Slika 20. Utjecaj zamjene imunosupresivne terapije na duljinu preživljenja presatka. CyA, ciklosporin A, tac-takrolimus, mmf-mikofenolat, aza-azatioprin. T-test za nezavisne uzorke pokazuje da postoji statistički značajna razlika u preživljavanju presatka kod onih bolesnika kojim je mikofenolat zamjenjen azatioprinom (1) u odnosu na one koji su isključivo dobivali mikofenolat u terapiji (0) ($p < 0,05$). Nije nađena statistički značajna razlika u preživljenju presatka kod bolesnika koji su uzimali ciklosporin (0) u odnosu na one kojima je ciklosporin zamjenjen takrolimusom (1) ($p > 0,05$).

5.3. IMUNOHISTOKEMIJSKO BOJANJE NA C4d

Imunohistokemijskim bojanjem prikazana je izraženost C4d u tkivu kirurški odstranjenih transplantiranih bubrega te u zdravom tkivu bubrega kontrolne skupine. Svi uzorci kontrolne skupine bili su negativni na C4d. Kod osam uzoraka ispitivane skupine imunohistokemijskim bojanjem na C4d uočen je citoplazmatski pozitivitet endotelnih stanica glomerularnih i peritubularnih kapilara (slika 21). Kod 5 uzoraka histološkom analizom utvrđeno je akutno odbacivanje posredovano protutijelima, a kod 3 uzorka se radilo o kroničnom aktivnom odbacivanju posredovanom protutijelima (tablica 19, str. 69). Daljnje analize nisu rađene obzirom na mali broj uzoraka.

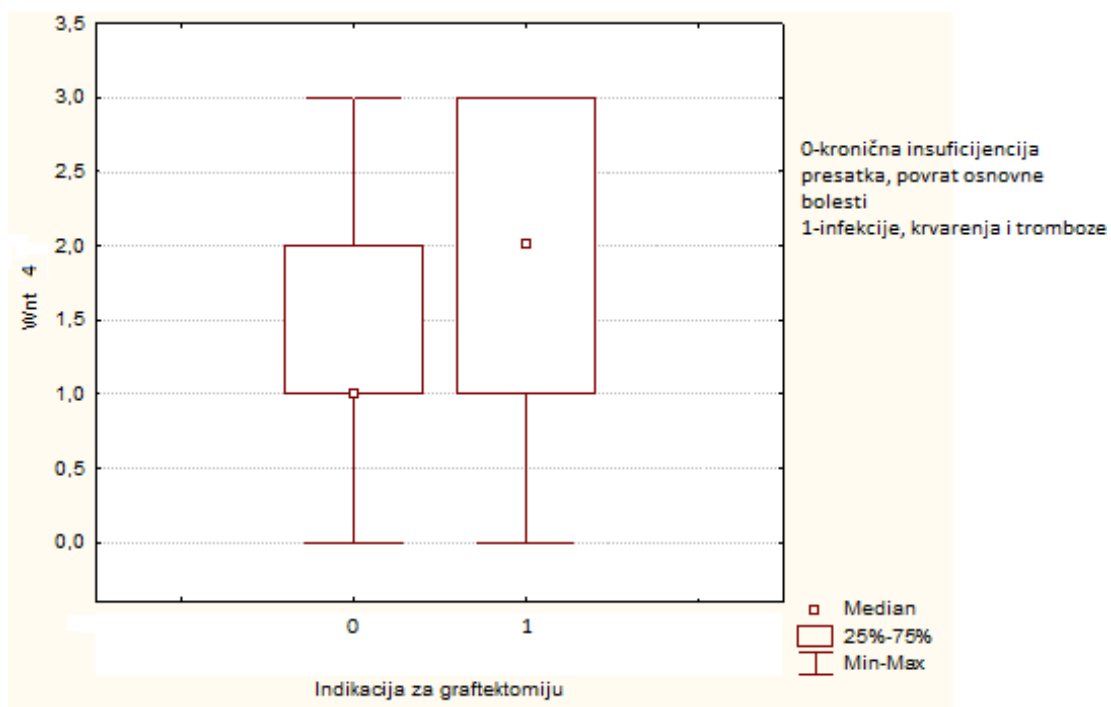
C4d -	C4d +++
	
<p>Peritubularne kapilare negativne su na C4d (povećanje 400x)</p>	<p>Imunohistokemijsko bojanje na C4d pokazuje jaki citoplazmatski pozitivitet endotelinih stanice glomerularnih i peritubularnih kapilara (povećanje 400x)</p>

Slika 21. Imunohistokemijsko bojanje na C4d.

5.4. INDIKACIJE ZA KIRUŠKO UKLANJANJE PRESATKA

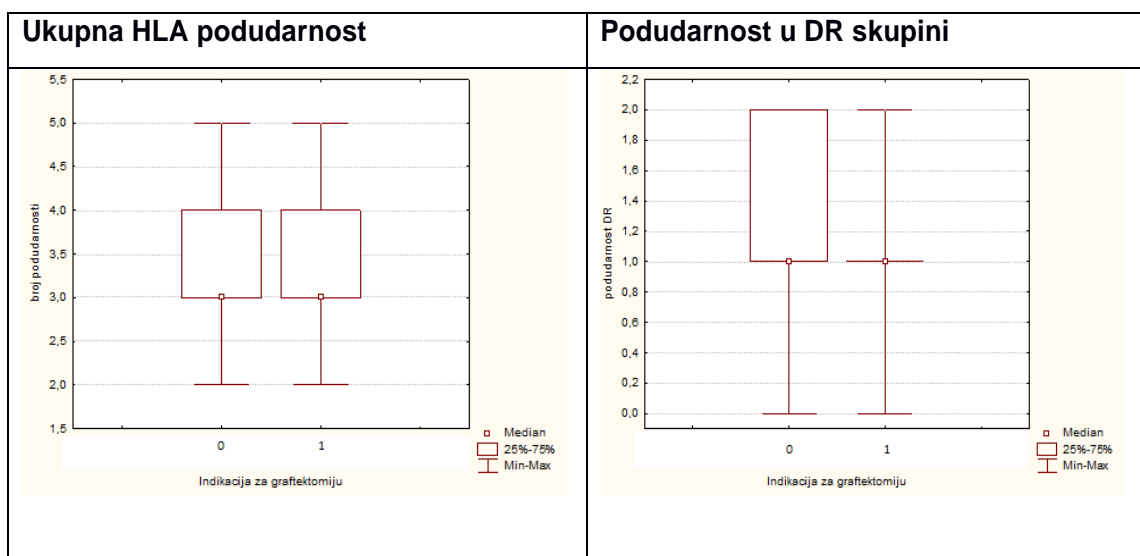
Kao što je već navedno u tablici 11, str. 46, najčešća indikacija za kiruško uklanjanje presatka bila je kronična disfunkcija presatka sa 37,3%, na drugom mjestu se nalazi životno ugrožavajuća infekcija sa 18,6%, dok su na trećem mjestu tromboze bubrežne vene sa 15,3%.

Kako bi dobili skupine ispitanika dovoljno velike za daljnju statističku obradu uzroke kirušskog uklanjanja presatka podjelili smo u dvije velike skupine: kroničnu disfunkciju presatka, te ostale uzroke koji su obuhvaćali infekcije, krvarenja i tromboze krvnih žila presadaka. U navedene dvije skupine indikacija za kiruško uklanjanje presatka usporedili smo izraženost Wnt 4 (slika 22). Nije nađena značajna razlika u uspoređivanim skupinama.



Slika 22. Izraženost Wnt 4 u odnosu na indikacije za kiruško uklanjanje presatka. Mann-Whitany U test pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u izraženosti Wnt 4 između dvije skupine indikacija za grafektomiju $p=0,172$.

Usporedili smo i dvije skupine uzroka kiruškog uklanjanja presatka sa brojem ukupne HLA podudarnosti i podudarnosti u DR skupini. Niti tu nije nađena značajna razlika (slika 23).



Slika 23. Utjecaj broja HLA podudarnosti na indikacije za kiruško uklanjanje presatka. Mann-Whitany U test pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika ukupne HLA podudarnosti i indikacija za graftektomiju $p=0,280$. Također ne postoji statistički značajne razlike niti u utjecaju broj podudarnosti u DR skupini u odnosu na uzrok graftektomije $p=0,458$. Stupac 0 označava kroničnu insuficijenciju presatka i povrat osnovne bolesti kao uzrok za graftektomiju, dok stupac 1 označava infekcije, krvarenja i tromboze kao uzrok graftektomije.

5.5. ANALIZA FUNKCIJE PRESATKA, PATOHISTOLOŠKIH NALAZA I EPIZODA ODBACIVANJA PRIJE KIRUŠKOG UKLANJANJA PRESATKA

Kod većine ispitanika, njih 76,3%, uspostavljena je odmah uredna funkcija presatka. Statističkom obradom (Mann-Whitney U Test) pokazano je da ne postoji statistički značajna povezanost odgođene funkcije presatka sa brojem HLA podudarnosti, podudarnosti u skupini DR, izraženosti Wnt 4 i C4d ($p>0,05$).

Pregledom povijesti bolesti utvrđeno je da je nalaz biopsije prije kiruškog uklanjanja presatka zbog pogoršanja funkcije presatka imalo 28 ispitanika. U tablici 19 su prikazani patohistološki nalazi tih biopsija.

Tablica 19. Nalazi biopsije prije kiruškog uklanjanja presatka

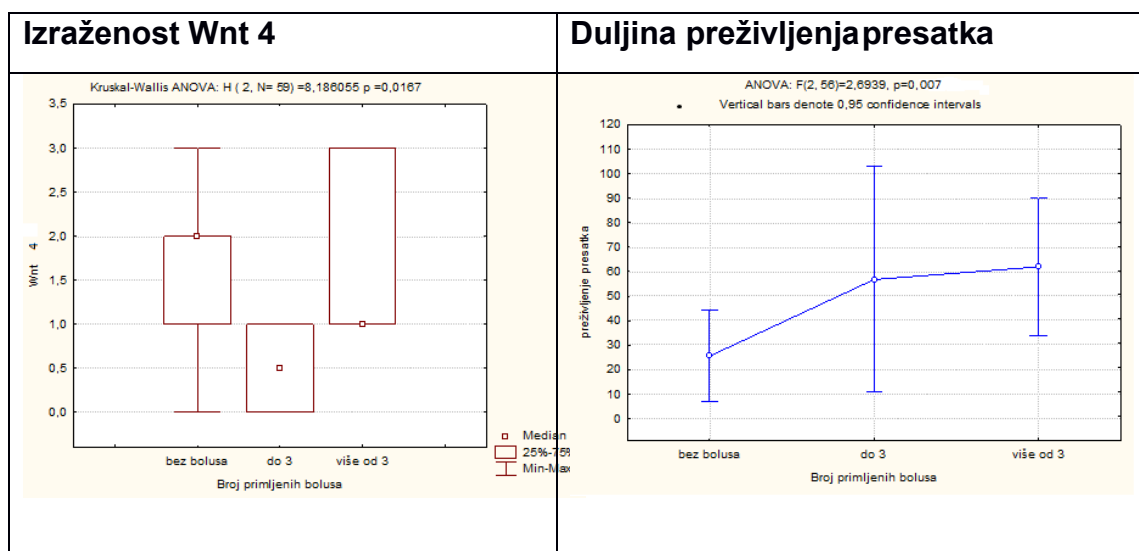
Nalaz biopsije	Broj ispitanika
Akutno odbacivanje posredovano stanicama	16
Akutno odbacivanje posredovano protutijelima	5
Kronično aktivno ABMR	3
Kronično aktivno odbacivanje posredovano T-limfocitima	1
Uredan nalaz	4
Izražena toksičnost inhibitora kalcijneurina	3
Transplantacijska glomerulopatija	3

Daljnjom analizom prikupljenih podataka usporedili smo patohistološke nalaze biopsije učinjenje prije kiruškog uklanjanja presatka s patohistološkim nalazima kiruški odstranjenih presadaka.

Od 28 ispitanika koji su imali nalaz biopsije prije kiruškog uklanjanja presatka na patohistološkim nalazima kiruški uklonjenih presadaka njih 14 je imalo znakove akutnog staničnog odbacivanja, dok je raspodjela kroničnih promijena te toksičnosti CNI bila usporediva sa ranijim nalazom biopsije. Neki su bolesnici imali više patohistoloških promjena koje su se međusobno preklapale na nalazu biopsije tablica 19.

Također smo pratili utjecaj liječenja epizoda akutnog odbacivanja prije kiruškog uklanjanja presatka na izraženost Wnt 4 u uzorcima kiruški uklonjenih presadaka te na duljinu preživljenja presatka. 28 ispitanika je imalo zbog indikacije učinjenu biopsiju presatka prije kiruškog uklanjanja. Kod 16 bolesnika pronađene su promjene u smislu akutnog odbacivanja posredovanog stanicama, a kod 5 bolesnika akutno odbacivanje posredovano protutijelima. Potom smo analizirali terapiju koju su primili u sklopu liječenja akutnog odbacivanja. U obzir smo uzeli broj primljenih bolusa kortikosteroida te liječenje terapijskom izmjenom plazme (plazmaferezom). 16 bolesnika je primilo u terapiji više od 3 bolusa, njih 6 do 3 (uključivo i tri bolusa), a 4 bolesnika su liječena plazmaferezom.

Broj primljenih bolusa bio je statistički značajno povezan sa izraženosti Wnt 4 i duljinom preživljenja presatka ($p < 0,05$) (slika 24).



Slika 24. Utjecaj liječenja akutnog odbacivanja bolusima kortikosteroida na izraženost Wnt 4 i preživljenje presatka. Nađena je statistički značajna povezanost promatranih parametara (slika lijevo), bolesnici koji su primili 1-3 bolusa i >3 bolusa su imali manju izraženost Wnt 4 u odnosu na bolesnike koji nisu liječeni bolusima ($p=0.0167$). Bolesnici koji su primili 1-3 bolusa i >3 bolusa su imali dulje preživljenje presatka u odnosu na one koji nisu liječeni bolusima kortikosteroida (slika desno) ($p=0.007$).

5.6. NALAZ HISTOLOGIJE NAKON KIRUŠKOG UKLANJANJA PRESATKA

Zbog lakše statističke obrade podataka patohistološke nalaze podjelili smo u dvije skupine: one kod kojih su nađene akutne promjene što podrazumjeva akutno odbacivanje posredovano stanicama ili protutijelima, te skupinu uzoraka na kojima su nađene kronične promjene u smislu intersticijske fibroze i atrofije tubula (IFTA) te promjene uzrokovane primjenom imunosupresivne terapije.

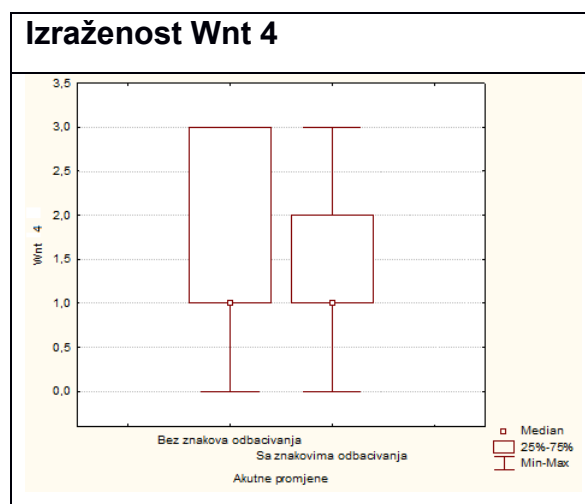
5.6.1. Akutne promjene u patohistološkom nalazu nakon kiruškog uklanjanja presatka

U 44.1% uzoraka nađene su akutne promjene u smislu odbacivanja presatka. U 24 je uzorka verificirano akutno odbacivanje posredovano stanicama. U dva uzorka nalaz je bio suspektan na akutno odbacivanje posredovano stanicama, dok su samo u jednom uzorku pronađene promjene koje upućuju na akutno odbacivanje posredovano protutijelima (tablica 20).

Tablica 20. Raspodjela patohistoloških nalaza prema postojanju ili odsutnosti akutnog odbacivanja, uz subanalizu samih akutnih odbacivanja.

Akutne promjene	Broj ispitanika	%
nema akutnih promjena u smislu odbacivanja	33	55,9
granične promjene suspektne na odbacivanje	2	2,4
TCMR IA	1	1,7
TCMR IIA	4	6,8
TCMR IIB	17	28,8
TCMR III	1	1,7
ABMR IIB	1	1,7
Ukupno	59	100,0

Potom smo analizirali ima li nalaz akutnog odbacivanja utjecaja na izraženost Wnt 4 i C4d. Nije dokazana razlika u izraženosti Wnt 4 kod ispitanika s potvrđenim akutnim odbacivanjem u odnosu na uzorke ispitanika bez akutnog odbacivanja (slika 25). Izraženost C4d je bila viša u bolesnika sa odbacivanjem posredovanim protutijelima (1 bolesnik).



Slika 25. Mann-Whitney U Test pokazuje da ne postoji statistički značajna povezanost akutnog odbacivanja sa izraženošću Wnt 4 ($p > 0,05$).

5.6.2. Kronične promjene u patohistološkom nalazu nakon kiruškog uklanjanja presatka

Kod 50.8 % ispitanika nisu nađene kronične promjene. U druge polovice ispitivanih uzoraka su nađene promjene u smislu intersticijske fibroze i atrofije tubula sa najvećom zastupljenošću IFTA-e stadija II i III. Kod jednog dijela uzoraka su opisane nespecifične kronične promjene koje nisu svrstane niti u jednu kategoriju (tablica 21).

Tablica 21. Patohistološki nalaz kroničnih promjena u uzorcima kiruški odstranjenih presadaka.

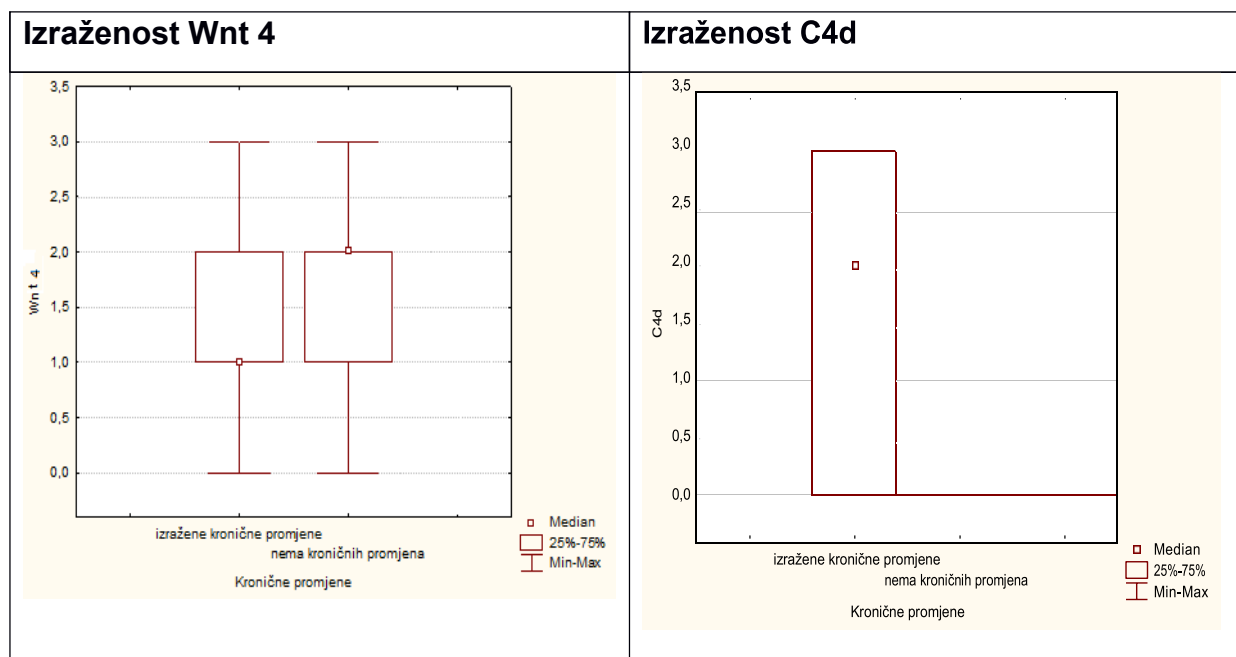
Kronične promjene	Broj ispitanika	%
nema kroničnih promjena	30	50,8
IFTA III	12	8,5
IFTA II	9	5,1
Kronične promjene nespecificirane	5	15,3
IFTA I	3	20,3
Ukupno	59	100,0

Radi daljnje statističke analize uzorke smo podijelili u dvije velike kategorije, one kod kojih su nađene kronične promjene (tu smo uključili i uzorke s opisanim nespecifičnim promjenama) te uzorke u kojima nije nađeno kroničnih promjena (tablica 22).

Tablica 22. Raspodjela ispitanika u dvije skupine, ovisno o izraženosti kroničnih promjena na uzorcima kirurški uklonjenih presadaka.

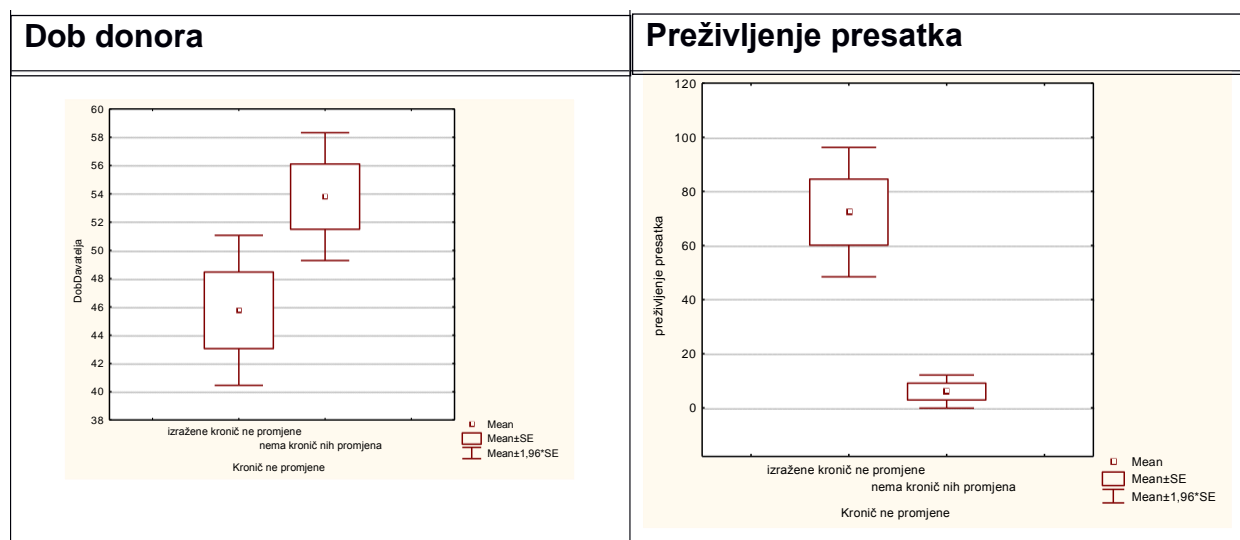
Kronične promjene	Broj ispitanika	%
izražene kronične promjene	29	49,2
nema kroničnih promjena	30	50,8
Ukupno	59	100,0

Na tako podijeljenim uzorcima analizirali smo imali li pojava kroničnih promjena utjecaja na izraženost Wnt 4 i C4d. Mann-Whitney U Test pokazuje da ne postoji statistički značajna povezanost kroničnih promjena sa izraženosti Wnt 4 i C4d ($p > 0,05$) (slika 26).



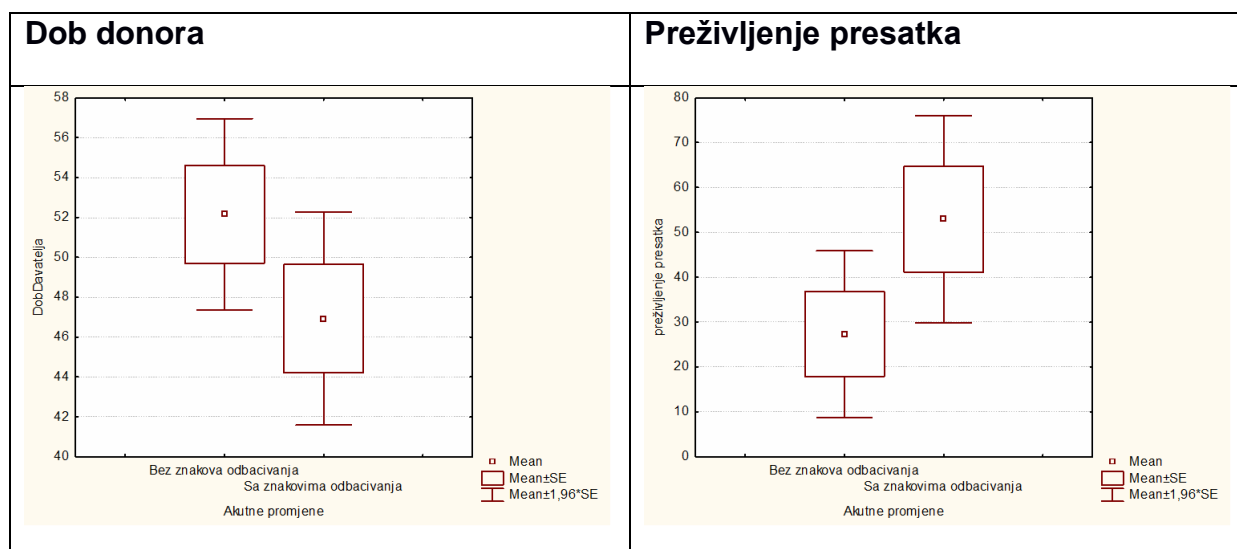
Slika 26. Utjecaj prisutnosti patohistoloških kroničnih promjena na izraženost Wnt 4 i C4d. Mann-Whitany U test pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u izraženosti Wnt 4 u odnosu na patohistološku prisutnost kroničnih promjena ($p=0,970$). Također ne postoji statistički značajna razlika u izraženosti C4d u odnos na patohistološku prisutnost kroničnih promjena ($p=0,153$).

Ispitali smo ima li starost transplantiranog organa utjecaja na pojavu kroničnih promjena te imaju li utjecaja kronične promjene na duljinu preživljenja presatka. T-test za nezavisne uzorke pokazuje postojanje statistički značajne razlike u dobi darovatelja i duljini preživljenja presatka kod izraženih kroničnih promjena i kada nema kroničnih promjena ($p<0,05$) (slika 27).



Slika 27. Utjecaj dobi darovatelja presatka na prisutnost kroničnih promjena (graf lijevo), kronične promjene i duljina preživljenja presatka (graf desno). T- test za nezavisne uzorke pokazuje statistički značajnu razliku u izražaju kroničnih promjena u odnosu na dob darovatelja presatka $p=0,027$.

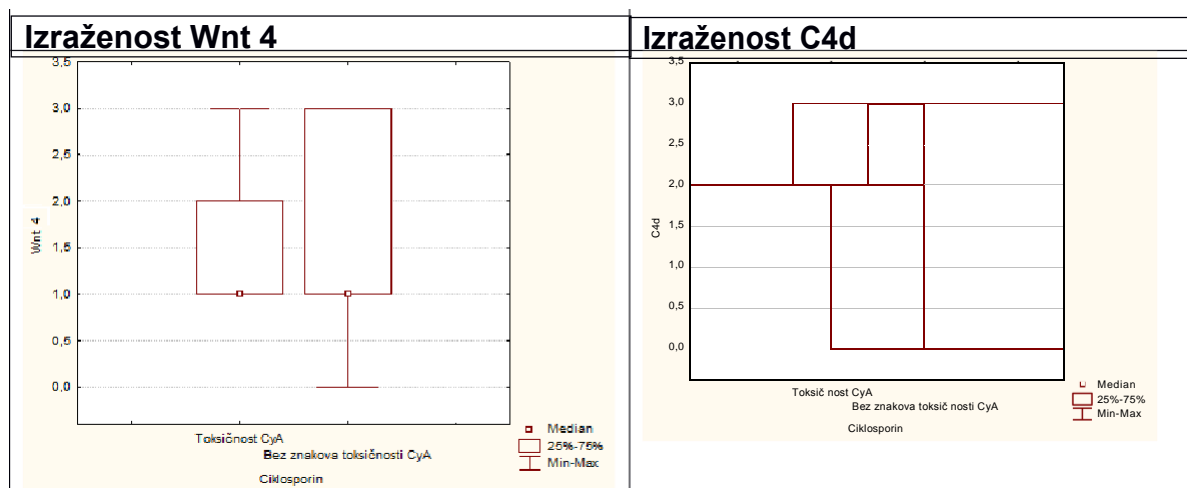
S obzirom na dobivene rezultate utjecaja dobi darovatelja presatka na prisutnost kroničnih promjena dodatno smo analizirali međudnos dobi darovatelja organa i pojave akutnog odbacivanja, te ispitali utječe li akutno odbacivanje na duljinu preživljenja presatka. T-test za nezavisne uzorke pokazao je da ne postoji značajna razlika u dobi darovatelja i pojavi akutnih odbacivanja te da preživljenje presatka nije značajno duže kod bolesnika koji nisu imali odbacivanje ($p>0,05$) (slika28).



Slika 28. Usporedbom dobi donora i patohistološki verificiranih akutnih odbacivanja T testom za nezavisne uzorke nije nađena statistički značajna razlika ($p=0.159$) (slika lijevo). Patohistološkom analizom verificirana akutna odbacivanja nisu imala utjecaj niti na duljinu preživljenja presatka (slika desno) ($p=0.092$).

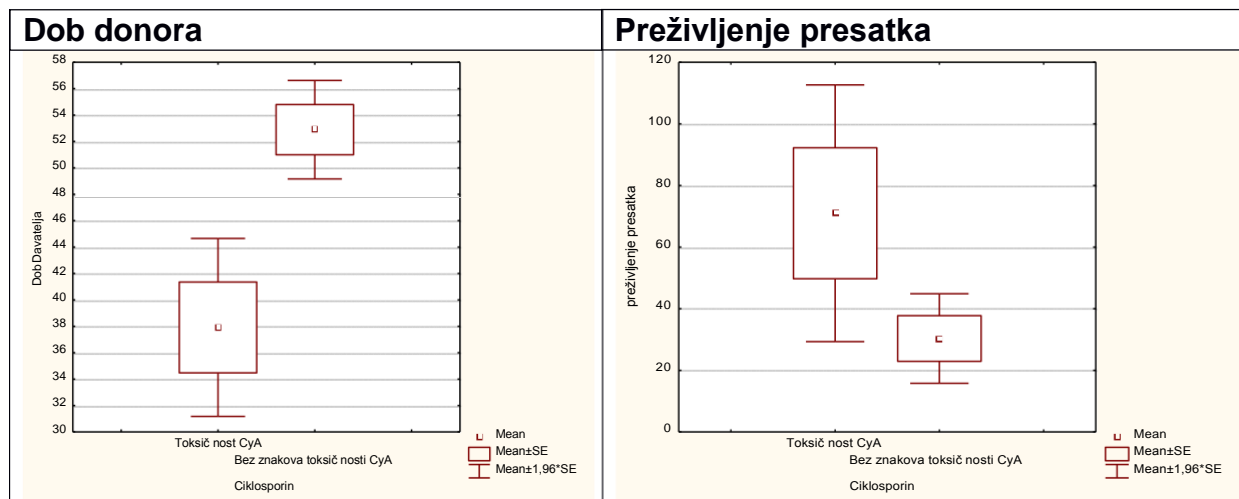
5.6.3. Patohistološki nalaz toksičnosti lijekova na uzorcima kirurški uklonjenih presađenih bubrega

Obzirom na poznato nefrotoksično djelovanje imunosupresivnih lijekova, prije svega inhibitora kalcineurina, u uzorcima kirurški uklonjenih bubrega analizirali smo nalaze specifične za toksičnost kalcineurina te ima li izražena toksičnost kalcineurina utjecaja na izražaj Wnt 4. Kod 20,3 % ispitanih uzoraka nađeni su znakovi kalcineurinske toksičnosti. Mann-Whitney U Test pokazuje da ne postoji statistički značajna povezanost toksičnosti kalcineurina sa izraženosti Wnt 4 ($p>0,05$), dok postoji statistički značajna povezanost nalaza toksičnosti kalcineurina sa izraženosti C4d ($p<0,05$) (slika 29). C4d je statistički značajno viši kod ispitanika s verificiranom toksičnošću kalcineurina.



Slika 29. Utjecaj toksičnosti kalcineurina na izraženost Wnt 4 i C4d. Mann-Whitney U Test pokazuje da ne postoji statistički značajna povezanost izraženosti Wnt 4 i toksičnosti kalcineurina ($p=0,829$), dok postoji statistički značajna povezanost izraženosti C4d i prisutnosti toksičnosti kalcineurina ($p=0,008$). CyA.

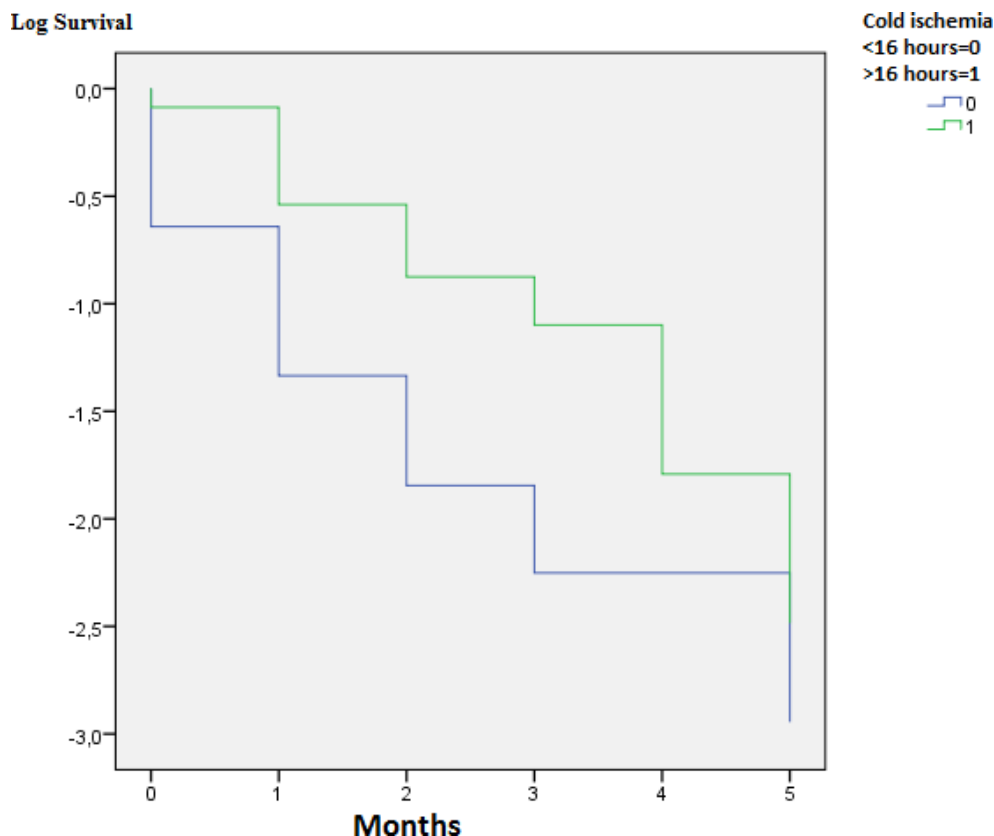
T-test za nezavisne uzorke pokazuje da postoji statistički značajna razlika u dobi davatelja i preživljavanja presatka između toksičnosti CyA i bez znakova toksičnosti CyA ($p<0,05$) (slika 30).



Slika 30. Lijevo: utjecaj dobi donora na izraženost toksičnosti kalcineurina. T-test za nezavisne uzorke pokazuje da postoji statistički značajna razlika u dobi darovatelja obzirom na prisutnost toksičnosti kalcineurina ($p=0,0006$). Desno: T-test za nezavisne uzorke pokazuje da presadci sa duljim preživljenjem imaju izraženije promjene zbog toksičnosti kalcineurina ($p=0,028$).

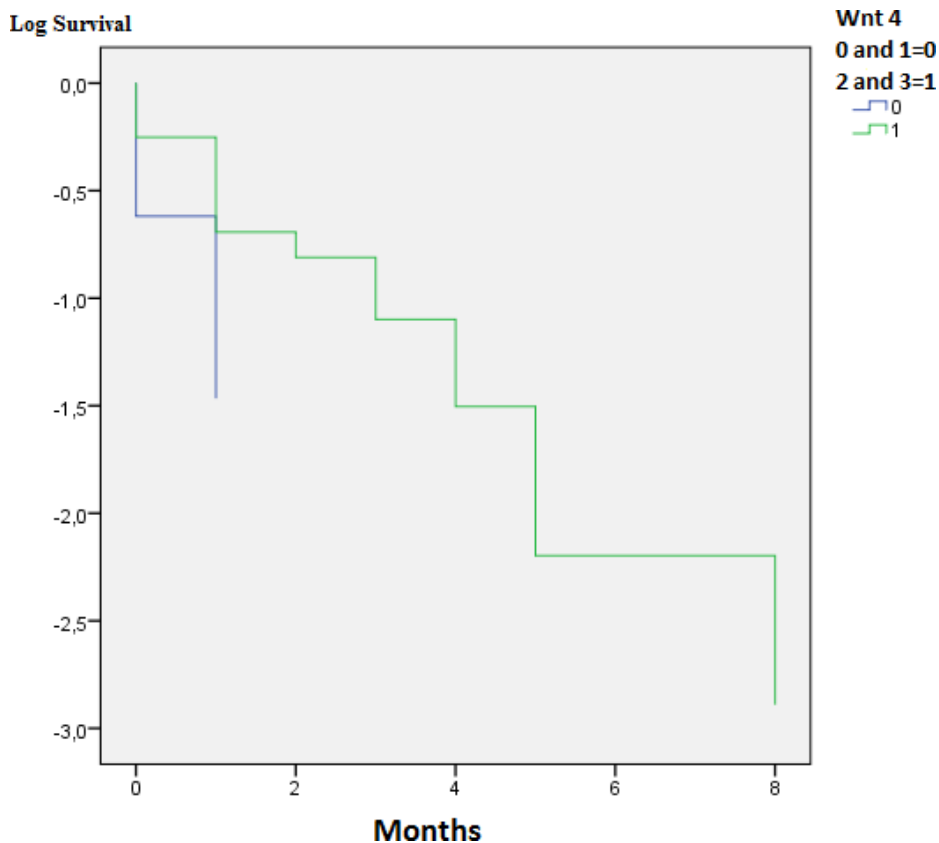
5.6.4. Trajanje hladne ishemije i njen utjecaj na duljinu preživljenja presatka i izraženost Wnt 4

Obzirom na dostupnost podataka iz Eurotransplanta od 2007. godine, analizirali smo ukupno 31 bolesnika s podacima o trajanju hladne ishemije. Ispitanike smo podijelili u dvije skupine. Prvu skupinu s trajanjem hladne ishemije duže od 16 sati (12 ispitanika) i drugu skupinu s trajanjem hladne ishemije kraćom od 16 sati (19 ispitanika). Bolesnici s trajanjem ishemije dužom od 16 sati su imali veću izraženost Wnt 4 u odnosu na skupinu bolesnika s ishemijom kraćom od 16 sati (χ^2 test $p=0.002$). Drugih značajnih statističkih razlika, uspoređujući ove dvije skupine, nismo pronašli, osim značajno više dobi darovatelja u skupini bolesnika s trajanjem ishemije kraćom od 16 sati ($p<0.001$). Nismo pronašli značajnu razliku u vremenu preživljenja presatka između dvije skupine bolesnika ($p>0.05$, log rank 1.78) (slika 31).



Slika 31. Utjecaj duljine hladne ishemije na duljinu preživljenja presatka. Kaplan-Meier survival analiza preživljenja pokazuje da ne postoji statistički značajna razlika u utjecaju duljine hladne ishemije na duljinu preživljenja presatka ($p>0.05$, log rank 1.78).

Kada smo ispitanike podijelili u skupine prema izraženosti Wnt 4, skupinu sa slabijom izraženosti (0 i 1; 13 ispitanika) te skupinu s jakom izraženosti (2 i 3; 18 ispitanika), izraženost Wnt 4 je bila statistički značajnija kod trajanja hladne ishemije duže od 16 sati ($p=0.047$), a nije bila statistički značajno povezana niti s dobi primatelja niti s dobi darovatelja (svi $p>0.05$). Vrijeme preživljenja presatka je bilo značajnije duže u bolesnika s jačom izraženošću Wnt 4 (0.7 vs 3.2 mjeseci; $p=0.01$, log rank 6.69) (slika 32).



Slika 32. Duljina preživljenja presatka ovisno o izraženosti Wnt 4. Kaplan-Meier survival analiza preživljenja pokazuje da postoji statistički značajna razlika u utjecaju jačine Wnt 4 izraženosti na duljinu preživljenja presatka ((0.7 vs 3.2 mjeseci; $p=0.01$, log rank 6.69).

6. RASPRAVA

U ovom radu analizirali smo izraženost Wnt 4 u uzorcima kiruški odstranjenih transplantiranih bubrega. Ispitivanu skupinu činilo je 59 ispitanika kojima je, zbog razvoja završnog stadija kronične bubrežne bolesti, kao metoda nadomještanja bubrežne funkcije učinjena transplantacija bubrega. U istraživanje smo uključili one ispitanike kojima je, zbog različitih indikacija, učinjeno kiruško uklanjanje bubrežnog presatka. U ovom retrospektivnom istraživanju prikupljeni su uzorci tkiva bubrega koji su transplantirani i kiruški odstranjeni iz bolesnika u periodu od 1988. godine do lipnja 2015. godine. Gotovo polovici ispitanika transplantacija bubrega je učinjena nakon pristupanja Republike Hrvatske Eurotransplantu u kolovozu 2007. godine.

Važno je istaknuti dugo vremensko razdoblje u kojem su ispitivani uzorci sakupljeni, obzirom da to ima velikog utjecaja na dobivene rezultate, prvenstveno na trajanje nadomještanja bubrežne funkcije dijalizom, kao i prilikom analize imunosupresivne terapija koju su bolesnici dobivali.

Analizirali smo i izraženost Wnt 4 u kontrolnoj skupini u koju su uključeni uzorci tkiva bubrega dobiveni nefrektomijom kod bolesnika s lokaliziranim tumorima bubrega veličine do 4 cm. Uzorak za naše istraživanje uzet je sa mjesta najudaljenijeg od tumora, a histološki je imao karakteristike zdravog tkiva bubrega. Smatra se da je kod veličine tumora do 4 cm dovoljno učiniti pošteđni zahvat (tzv. nephron sparing surgery), budući da se povrat bolesti javlja u svega 0-3% ispitanika, bolest nije uznapredovala, multifokalna pojavnost javlja se do 5 % slučajeva te se smatra da je okolno tkivo zdravo (116,117,118).

Iz osnovnih podataka prikupljenih o ispitanicima vidimo da je njih 51% bilo muškog spola, prosječna dob ispitanika u trenutku transplantacije iznosila je 40,3 godine. Najučestalija vodeća dijagnoza osnovne bolesti bila je kronični glomerulonefritis bez učinjene biopsije, u 54,2 % ispitanika.

Uglavnom se radi o nedefiniranoj osnovnoj bubrežnoj bolesti. Smatra se da je ona originalno bubrežnog podrijetla. No obzirom da su se bolesnici prezentirali u već podmakloj fazi bolesti, biopsija nije učinjena.

Na drugom mjestu, prema zastupljenosti, nalazi se vezikoureteralni refluks sa 11,9%. Ostale bolesti zastupljene s malim brojem ispitanika uključivale su biopsijom dokazani membranoproliferativni glomerulonefritis, policističnu bolest bubrega, sistemski lupus, trombotičnu trombocitopeničnu purpuru, IgA nefropatiju, sindrom Goodpasture i šećernu bolest. Interesantno, od 59 ispitanika samo se kod jednog radilo o šećernoj bolesti kao uzroku zatajenja funkcije bubrega, što nije u skladu sa učestalošću dijabetičke nefropatije kao vodećeg uzroka zatajenja bubrežne funkcije (119, 120). Porast dijabetičke nefropatije kao uzroka završnog stadija KBB posljedica je kontinuirana povećanja ukupne pojavnosti (prevalencije) šećerne bolesti, posebno tipa 2, koji se javlja u 85-90% slučajeva oboljelih, produljenja životnog vijeka oboljelih i činjenice da je i kod njih danas moguće uspješno nadomjestiti bubrežnu funkciju (120,121). Prema podacima Hrvatskog registra nadomještanja bubrežne funkcije iz 2012. godine 29 % bolesnika kojima je potrebno nadomještanje bubrežne funkcije su bolesnici sa šećernom bolesti, slijedi ju vaskularna bolest te glomerulonefritisi. Naš podatak o samo jednom ispitaniku s dijabetičkom nefropatijom kao osnovnom bolešću bubrega vjerojatno možemo objasniti činjenicom da su prije 2007. godine, odnosno prije ulaska Republike Hrvatske u sustav Eurotransplanta, liste čekanja na presađivanje bubrega bile izrazito duge, a prosječno vrijeme čekanja na dijalizi za ispitanu skupinu iznosilo je 182,4 mjeseca, te su vjerojatno ti bolesnici oboljeli i umrli prije same mogućnosti za transplantaciju od posljedica komplikacija osnovne bolesti.

Bubrežna funkcija prije transplantacije je u većine bolesnika (91%) nadomješšana hemodijalizom, dok je kod samo 9% ispitanika korištena peritonealna dijaliza.

Prema podacima Hrvatskog registra za nadomještanje bubrežne funkcije, 2012. godine u Republici Hrvatskoj je bubrežna funkcija nadomješšana u 58,7 % bolesnika hemodijalizom, u 4,1 % peritonejskom dijalizom, a 37,2 % bolesnika je imalo funkcionirajući presadak (120). Jednu raniju transplantaciju je imalo 8,5% ispitanika, a njih 3,5% dvije prethodne transplantacije bubrega. Navedeni podaci uzeti su u razmatranje tijekom tumačenja dobivenih rezultata.

Svi ispitanici su primili organ od moždano mrtvog darovatelja. Ovi su podaci u skladu sa statistikom našeg transplantacijskog centra gdje je 92% transplantacija od preminulog darovatelja, a 8% od živog, srodnog ili nesrodnog darovatelja.

Kao što je već spomenuto, uzorci ispitivane skupine dobiveni su nakon kirušskog uklanjanja presađenih bubrega iz bolesnika. U našoj ustanovi indikacije za kiruško uklanjanje presatka uključuju: životno ugrožavajuće infekcije kada je potrebna potpuna obustava imunosupresivne terapije; životno ugrožavajuća stanja poput masivnih krvarenja ili tromboze krvnih žila presatka; razvoj akutnog odbacivanja nakon završnog zatajenja funkcije presatka kada je već kod bolesnika započeto nadomještanje bubrežne funkcije nekom od metoda dijalize; razvoj rezistentne hipertenzije ili anemije neosjetljive na liječenje eritropoetinom kod završnog stadija zatajenja funkcije presatka. Prema literaturi, 80% bolesnika s transplantiranim bubregom preboli tijekom prve godine po transplantaciji neku infekciju, a imunosupresivno liječenje se smatra glavnim rizičnim čimbenikom, osobito u ranom posttransplantacijskom razdoblju kada je imunosupresivna terapija intenzivnija (122,123).

Prema našim podacima, najčešća indikacija za kiruško uklanjanje presatka bila je kronična disfunkcija presatka (37,3%), potom životno ugrožavajuća infekcija (18,6%), na trećem mjestu je tromboza krvnih žila presatka (15,3%), na četvrtom mjestu su životno ugrožavajuće krvarenje i akutno odbacivanje (11,9%). Prema literaturnim podacima, nakon prve godine po transplantaciji, 50% presadaka gubi se zbog kronične disfunkcije presatka (58).

Učestalost posjedinih indikacija za kiruško uklanjanje presadaka razlikuje se prema vremenu proteklom od transplantacije do uklanjanja presatka. Većina ispitivanih uzoraka dobivena je kiruškim uklanjanjem presadaka u periodu više od tri mjeseca od transplantacije, što je i u skladu sa najčešćom indikacijom za uklanjanje presatka, kroničnom disfunkcijom presatka. Na drugom mjestu se nalazi uklanjanje presadaka u periodu unutar mjesec dana od transplantacije zbog krvarenja odnosno tromboza krvnih žila bubrega. U literaturi se navodi da zbog tromboze arterije ili vene bubrega dolazi do gubitka 2-7% presadaka u ranom posttransplantacijskom razdoblju, obično unutar prvih 48 sati (124,125). Na trećem se mjestu nalaze indikacije u srednjem vremenu (unutar 1-3 mjeseca po transplantaciji) koje uključuju životno ugrožavajuće infekcije ili razvoj akutnih odbacivanja koja nije bilo moguće liječiti medikamentozno. Imunosupresivna terapija je jedan od najvažnijih čimbenika rizika za razvoj infekcije u ranom posttransplantacijskom razdoblju (126).

Budući da se radilo o skupini graftektomiranih presadaka prosječno preživljenje presadaka bilo je nisko, 38,6 mjeseci.

To je očekivano značajno manje nego u ostatku populacije bolesnika s transplantiranim bubregom. Naime, prema posljednjim dostupnim podacima našeg centra jednogodišnje preživljenje presatka iznosi 96%, a primatelja 98 %. Prema posljednjim podacima iz 2017. godine petogodišnje preživljenje presatka u našem centru je 85%, a desetogodišnje 62%. Prema literaturi jednogodišnje preživljenje presađenih bubrega u Europi iznosi 91%, petogodišnje 77% a desetogodišnje 56% (127).

Prema dobivenim rezultatima, kod većine uklonjenih presađaka došlo je do razvoja kronične disfunkcije presatka te je u skladu s time hipoteza ovog rada bila istražiti utjecaj izraženosti Wnt 4 na razvoj kroničnih promjena u kirurški uklonjenim presađenim bubrezima. Temeljem dosadašnjih istraživanja znamo da je kronična disfunkcija vodeći uzrok kasnih gubitaka presađenih bubrega, a karakterizira ju progresivna tubularna atrofija i intersticijska fibroza kao i mikrovaskularna i glomerularna oštećenja što se očituje postupnim pogoršanjem funkcije presatka u mjesecima ili godinama nakon transplantacije (69). Incidencija varira od 23% u prvih pet posttransplantacijskih godina, pa sve do 60 % nakon 10 godina po transplantaciji (128, 129, 130).

Za sada se terapija zasniva na agresivnom liječenju hipertenzije i dijabetesa te modifikaciji imunosupresivne terapije u smislu minimizacije inhibitora kalcineurina. To su sve nespecifični terapijski postupci. Potrebna je usmjerena terapija kako bi se ograničilo napredovanje tubularne atrofije i intersticijske fibroze (131). Dodatne histopatološke promjene koje govore u prilog kroniciteta su: transplantacijska glomerulopatija, podvostručenje bazalnih membrana glomerularnih kapilara (cg), proširenje matriksa mezangija (mm), kronične promjene na arterijama (cv) i hijalinoza arteriola (ah) (132). Do razvoja intersticijske fibroze i tubularne atrofije dovode kombinacija imunoloških i neimunoloških zbivanja (72). Pod imunološka zbivanja ubrajamo odbacivanja posredovana stanicama ili protutijelima te infekcije, prije svega citomegalovirusom i BK poliomavirusom. Od neimunoloških zbivanja utjecaj imaju kvaliteta doniranog organa, na koju utječe dob darovatelja i komorbiditeti, vrijeme hladne ishemije, razvoj odgođene funkcije presatka, imunosupresivno liječenje te čimbenici zavisni od samog primatelja organa poput dijabetesa, arterijske hipertenzije, osnovne bubrežne bolesti te suradljivosti u uzimanju terapije.

Kao konačan rezultat bilo kojeg od navedenih zbivanja ili više njih zajedno dolazi do inicijalne ozljede tubularnih epitelnih stanica koja rezultira upalom, koja potom može pokrenuti proces epitelno-mezenhimalne tranzicije (133,134). Mi smo u našem istraživanju u obzir uzeli gore navedene moguće imunološke i neimunološke čimbenike te analizirali njihov utjecaj na izraženost Wnt 4.

Imunohistokemijskim bojanjem prikazali smo izraženost Wnt 4 u tkivu kirurški ukolonjenih presađenih bubrega kao i u zdravom tkivu bubrega kontrolne skupine. Prema našim rezultatima u zdravom tkivu bubrega kontrolne skupine izraženost Wnt 4 je snažna. U svim uzorcima više od 50 % stanica, a kod većine uzoraka i u preko 75% stanica proksimalnih, distalnih i kanalića srži pokazan je pozitivitet na Wnt 4. U odnosu na kontrolnu skupinu, u ispitivanoj skupini izraženost Wnt 4 je bila značajno manja. Kako bismo pokušali donijeti zaključke o mogućim faktorima koji utječu na izraženost Wnt 4 analizirali smo brojne čimbenike. Prije svega, analizirali smo dob ispitanika i kontrolne skupine. Dob kontrolne skupine je značajno viša (prosječno 56,8 godina) u odnosu na ispitanike čija je prosječna dob bila 40,3 godine u trenutku transplantacije.

Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da se Wnt 4 normalno nalazi u zdravom tkivu bubrega. Temeljem dosadašnjih podataka ne možemo zaključiti ima li njegova izraženost pozitivan utjecaj na funkciju bubrega ili se njegova pojavnost može dovesti u vezu sa starenjem organa i postupnim opadanjem bubrežne funkcije kao normalnog fiziološkog procesa starenja. Primjerice, Klotho ima zaštitnu ulogu, a poznato je da inhibira Wnt signalni put (135). Povezanost Wnt 4 i Klotho u procesu starenja bubrega tek treba istražiti. Kada smo korelirali dob sa jačinom izraženosti Wnt 4 u kontrolnoj skupini pokazano je da se njegova izraženost povećava sa starošću. Kada uspoređujemo dob kao mogući čimbenik koji utječe na izraženost Wnt 4 u tkivu bubrega onda u obzir moramo uzeti i dob darovatelja bubrega koja je prosječno iznosila 49,8 godina što je značajno manje u odnosu na dob kontrolne skupine. Korelirajući dob darovatelja organa sa izraženosti Wnt 4 nismo dobili statistički značajne razlike, što upućuje da se izraženost Wnt 4 ponaša drugačije u presađenom organu za razliku od zdravog tkiva bubrega. Mogući razlozi uključuju promjene izraženosti uslijed patoloških promjena u presatku, ali i zbog primjene imunosupresijske terapije. Dob darovatelja ima statistički značajan utjecaj na duljinu preživljenja presatka, što je i očekivani rezultat obzirom na bolju kvalitetu organa mlađeg darovatelja s manje komorbiditeta.

Utjecaja na izraženost Wnt 4 nije imao ni uzrok smrti darovatelja. Uzrok smrti darovatelja imao je statistički značajan utjecaj na duljinu preživljenja presatka gdje su značajno dulje preživljenje imali oni presadci darovatelja umrlih zbog traume. To se može objasniti značajno nižom dobi darovatelja stradalih zbog traume i time opterećenih sa znatno manje komorbiditeta u odnosu na darovatelje umrle zbog intrakranijalnog krvarenja. Nakon što smo u obzir uzeli obilježja darovatelja koja mogu imati utjecaja na izraženost Wnt 4 u presatku, pokušali smo analizirati i obilježja primatelja koja bi mogla utjecati na promjenu izraženosti Wnt 4. Prije svega, tu smo obratili pažnju na osnovnu bubrežnu bolest primatelja koja je uzrokovala zatajenje bubrežne funkcije, duljinu nadomještanja bubrežne funkcije prije transplantacije te metodu kojom je bubrežna funkcija nadomješšana. Kao što je već i ranije spomenuto, vrlo veliki broj ispitanika nije imao jasno definiranu dijagnozu osnovne bolesti, njih 54,2% su se vodili pod dijagnozom kroničnog glomerulonefritisa bez biopsije, dok za ostale ispitanike, odnosno njihove osnovne bolesti, analizom nije pokazana značajna razlika u izraženosti Wnt 4.

Vrijeme provedeno na dijalizi prije transplantacije bilo je izrazito dugo s prosjekom od 182,4 mjeseca. To objašnjavamo činjenicom da je većina uzoraka ispitivane skupine iz vremena kada Republika Hrvatska nije bila članica Eurotransplanta i kada je lista čekanja na kadaveričnu transplantaciju bubrega bila izrazito duga. Nije nađeno razlike u izraženosti Wnt 4 ovisno o vremenu nadomještanja bubrežne funkcije prije transplantacije. Utjecaja na izraženost Wnt 4 nije imala niti metoda kojom je bubrežna funkcija nadomješšana, u preko 90% ispitanika bubrežna funkcija nadomješšana je hemodijalizom, tek kod njih nekoliko je nadomješšana peritonealnom dijalizom. Kronična infekcija virusom hepatitisa B ili C nije imala utjecaj na izraženost Wnt 4. No, oni ispitanici koji su imali kroničnu infekciju virusom hepatitisa C su imali značajno kraće preživljenje presađenog bubrega. Navedeno je u skladu sa podacima iz literature gdje se smatra da infekcija HCV pogoduje nastanku transplantacijske glomerulopatije, a ponekad je teško razlikovati transplantacijsku glomerulopatiju od hepatitisom C uzrokovanog membranoproliferativnog glomerulonefritisa (136).

Poznat je vrlo važan utjecaj imunoloških zbivanja na duljinu preživljenja presatka, prije svega prisutnost anti HLA protutijela kod senzibiliziranih bolesnika (137,138). Neki od naših ispitanika su imali iza sebe jednu ili dvije ranije transplantacije bubrega, no navedeno nije imalo utjecaja na izraženost Wnt 4 u presatku kao niti na duljinu preživljenja presatka.

Osim broja ranijih transplantacija, analizirali smo i utjecaj HLA podudarnosti između darovatelja i primatelja na izraženost Wnt 4 i duljinu preživljenja presatka. Najveći broj ispitanika imao je ukupno 3 ili 4 podudarnosti u lokusima A, B i DR. Posebno smo izdvojili broj podudarnosti u lokusu DR za koji se smatra da je najimunogeniji (139,140). Nije utvrđena povezanost broja ukupnih podudarnosti, niti podudarnosti u DR, sa duljinom preživljenja presadaka, kao niti s izraženosti Wnt 4 u ispitivanim uzorcima.

Svi ispitanici su primali trojnu imunosupresivnu terapiju koja se sastojala od inhibitora kalcineurina (ciklosporin ili takrolimus), antiproliferativnog lijeka (mikofenolat ili azatioprin) i kortikosteroida. Indukcijsku terapiju nije primila većina ispitanika, njih 71,2% što je u skladu sa vremenom kada su ti ispitanici transplantirani. Naime, tada se, prema protokolu našeg centra, indukcijska terapija davala isključivo bolesnicima s procijenjenim visokim imunološkim rizikom. Danas je režim imunosupresivne terapije drugačiji te se prema KDIGO smjernicama preporuča primjena indukcijske terapije antagonistima IL-2 receptora T limfocita kod svih bolesnika osim u onih sa visokim imunološkim rizikom, kada se preporuča primjena antitimocitnog globulina (32). Prema navedenim smjernicama takrolimus i mikofenolat su lijekovi izbora u imunosupresiji (141,142). Od onih bolesnika koji su primili indukcijsku terapiju njih 22% je primilo inhibitor interleukina 2 basiliximab, a svega 6,8% antitimocitni globulin. Nismo našli razlike u duljini preživljenja presadaka kod ispitanika koji nisu dobili indukcijsku terapiju u odnosu na one koju su je primili. Indukcijska terapija nije imala utjecaja niti na izraženost Wnt 4. Kao inhibitor kalcineurina 44 bolesnika su primala ciklosporin, što je također u skladu s vremenom kada je transplantacija učinjena i kada je ciklosporin bio jedini dostupan inhibitor kalcineurina. Kod 7 ispitanika je tijekom liječenja ciklosporin zamjenjen takrolimusom. No, uzimanje bilo kojeg od inhibitora kalcineurina nije imalo utjecaja na izraženost Wnt 4. Kao antiproliferativni lijek 43 ispitanika su primala mikofenolat mofetil, a 9 azatioprin, dok je kod 7 ispitanika tijekom liječenja mikofenolat mofetil zamjenjen azatioprinom zbog različitih indikacija. Odabir antiproliferativnog lijeka nije imao utjecaja na izraženost Wnt 4.

Izraženost Wnt 4 se u ispitivanim uzorcima nije razlikovala niti ovisno o indikaciji za kiruško uklanjanje presatka. Analizom funkcije presadaka, odnosno postojanja odgođene funkcije presatka, ustanovljeno je da je kod 76,3% ispitanika funkcija presatka odmah uspostavljena. No, to nije imalo utjecaja na izraženost Wnt 4.

Kod 28 ispitanika učinjena je biopsija presatka prije kirušskog uklanjanja presatka. Indikaciju za biopsiju presatka predstavljalo je pogoršanje funkcije presatka u smislu porasta serumskog kreatinina ili razvoja proteinurije. Kod 16 ispitanika, kojima je učinjena biopsija, nađeno je akutno odbacivanje posredovano stanicama, kod 5 akutno odbacivanje posredovano protutijelima, dok su po tri ispitanika imala izraženu toksičnost inhibitora kalcineurina i znakove kronične transplantacijske glomerulopatije. Analizom navedenih podataka našli smo da su oni bolesnici kojima je akutno odbacivanje liječeno bolusima kortikosteroida imali značajno dulje preživljenje presatka, a izraženost Wnt 4 je u tim uzorcima bila značajno viša. Kod onih bolesnika kojima je zbog akutnog odbacivanja posredovanog protutijelima učinjena terapijska izmjena plazme nije uočeno razlike u izraženosti Wnt 4 u odnosu na uzorke kod kojih nije zabilježeno akutno odbacivanje.

Analizom histoloških nalaza nakon kirušskog uklanjanja presatka kod 44,1% ispitivanih uzoraka pronađene su akutne promjene u smislu akutnog odbacivanja jačine od graničnih promjena pa sve do odbacivanja III stupnja. U uzorcima u kojima su nađene promjene u smislu odbacivanja, u odnosu na uzorke u kojima nije bilo znakova odbacivanja, nije nađeno razlike u izraženosti Wnt 4. 49,2% ispitanika je imalo određeni stupanj kroničnih promjena, u rasponu od gradusa I do III. No, nalaz kroničnih promjena nije imao utjecaja na izraženost Wnt 4. Kod 20,3 % ispitivanih uzoraka verificirani su histopatološkom analizom znakovi toksičnosti inhibitora kalcineurina, no to nije imalo utjecaja na izraženost Wnt 4. Temeljem navedenih rezultata možemo zaključiti da se nakon duljeg vremenskog perioda, izraženost Wnt 4 u transplantiranom bubregu gubi i ne ovisi o akutnim odnosno kroničnim zbivanjima u presatku.

To može biti posljedica s jedne strane razvoja kroničnih promjena, a s druge strane primjene imunosupresivne terapije. Nema literaturnih podataka o utjecaju imunosupresivne terapije na izraženost Wnt 4. No, sve je više podataka o izazivanju tolerancije djelovanjem na Wnt signalne puteve (143, 144, 145, 146). Tobi moglo biti značajno i za transplantacijsku medicinu.

Kada smo kiruški uklonjene presađene bubrege podijelili u tri skupine, ovisno o vremenu proteklom od transplantacije kada su uklonjeni iz bolesnika, izraženost Wnt 4 bila je najveća u onim uzorcima koji su uklonjeni iz bolesnika u kratkom vremenskom razdoblju od transplantacije, unutar mjesec dana od transplantacije. Temeljem navedenog možemo zaključiti da duljim preživljenjem presatka izraženost Wnt 4 u tkivu pada, štoviše njegova izraženost je niži već i u onim uzorcima tkiva bubreaga uklonjenim unutar prvog mjeseca po transplantaciji u odnosu na kontrolnu skupinu. Moguće da je inicijalna ozljeda, odnosno hladna ishemija, ta koja doprinosi većoj izraženosti Wnt4 u bubrežnim stanicama. U literaturi možemo naći podatak da je upravo ozljeda tubularnih stanica početna točka u procesu propadanja bubrežnog presatka (142). Nakon ishemije i upale stanice tubula odumiru apoptozom. Apoptoza stanica je potrebna da bi se bubreg mogao remodelirati i regenerirati. No, kada broj stanica koje odumru pređe regenerativni kapacitet bubreaga nastupa slabljenje funkcije bubreaga i brže napreduje gubitak presatka (147,148,149). Nedavnim istraživanjima spoznalo se da je ozljeda tubularnih epitelnih stanica povezana sa razvojem fibroblasta koji imaju svojstva poput miocita u intersticiju bubreaga (150). Tubularne epitelne stanice kao odgovor na ozljedu prolaze kroz fenotipske promjene procesom epitelno-mezenhimalne tranzicije. Za proces epitelno-mezenhimalne tranzicije je dokazano da se javlja i u drugim kroničnim bubrežnim bolestima povezanim sa fibrozom, kao i u epitelnim stanicama drugih organa. Proces epitelno-mezenhimalne tranzicije je dobro poznat i opisan tijekom embrionalnog razvoja gdje dolazi do tranzicije mezenhimalnih u epitelne stanice. U transplantiranom bubregu dolazi do disregulacije ovog procesa (151). Prema nedavnim istraživanjima, potvrđeno je da je eksperimentalnim tretiranjem sa BMP 7 (bone morphogenetic protein 7) došlo do smanjenja fibroze i poboljšanja bubrežne funkcije (152). Dokazano je da su u odsutnosti BMP 7 bubrezi miša znatno osjetljiviji na ozljedu stanica tubula i nastanak fibroze (153). Također je poznato da ciklosporin potiče proces epitelno-mezenhimalne tranzicije *in vitro* u kulturama stanica proksimalnih tubula (154,155).

U biopsijama humanih uzoraka potvrđena je prisutnost procesa epitelno-mezenhimalne tranzicije, osobito u onim uzorcima gdje je vodeći histološki nalaz bio tubularna atrofija i intersticijska fibroza (156,157). Biopsije bubrežnih presađena učinjene tri mjeseca nakon transplantacije su pokazale da su u 40% uzoraka markeri epitelno-mezenhimalne tranzicije bili izraženi. Dakle, to je proces koji započinje vrlo rano po učinjenoj transplantaciji.

Osobita povezanost izraženosti markera epitelno-mezenhimalne tranzicije uočena je kod onih uzorka kod kojih su nađeni znakovi akutnog odbacivanja te onih uzoraka kod kojih je vrijeme hladne ishemije bilo produljeno (158). Dosadašnjim istraživanjima o ulozi gena obitelji Wnt u nastanku fibroze u bubregu na eksperimentalnim životinjskim modelima pretpostavljene su dvije oprečne funkcije Wnt-a kao odgovora na ozljedu bubrega. S jedne strane opisana je najjača izraženost Wnt 4 unutar 24 sata od ishemijsko-reperfuzijske ozljede i tu se pretpostavilo da je njegova aktivacija ključna u procesu regeneracije bubrežnog tkiva (95). S druge strane, Surendran i suradnici dokazali su najveću izraženost Wnt 4 na uzorcima tkiva životinja gdje su pomoću različitih mehanizama uzrokovali nastanak tubularne atrofije i intrsticijske fibroze. Temeljem navedenog pretpostavila se njegova uloga u nastanku fibroze bubrega (96). Hladna ishemija *per se*, točnije njeno trajanje, je neovisan faktor rizika za odgođenu funkciju i gubitak presatka (158,159). Kao glavni patofiziološki uzrok gubitka presatka se navodi akutna tubularna nekroza (160,161,162). Rizik raste s trajanjem hladne ishemije. Prema istraživanju Opelza i suradnika (163) kao kritično vrijeme navodi se 18 sati hladne ishemije. Postoje i oprečni rezultati nekih istraživanja, u odnosu na ranije navedene, koji pokazuju da trajanje hladne ishemije ne mora dovesti do kraćeg života bubrežnog presatka (163,164). S tim se slažu i rezultati našeg istraživanja koji su pokazali kako trajanje hladne ishemije, čak i produženo, ne dovodi do značajno kraćeg preživljenja presatka. Rezultati dobiveni našim istraživanjem su potvrdili važnost izraženosti Wnt 4 kao vjerojatnog faktora u regeneraciji bubrežnog tkiva te posljedično tome u preživljenju presatka i njegovu pojačanu izraženost kod produženog trajanja hladne ishemije. Terada i suradnici (95) su svojim istraživanjem na miševima pokazali pojačanu izraženost Wnt 4 kod ishemije bubrežnog tkiva te njegovu ulogu u oporavku stanica bubrežnih tubula i kod akutne tubularne nekroze.

Kuncewich i suradnici (165) su slične rezultate pokazali na humanim modelima oporavka hepatocita nakon ishemijske ozljede jetre, te su predložili uvođenje agonista Wnt receptora koji bi mogli doprinijeti oporavku od ozljede nakon perioda ishemije. Iako je Wnt 4 u našoj skupini bolesnika bio značajno izražen s porastom dobi, njegova najznačajnija povezanost je s trajanjem hladne ishemije. Prema našim rezultatima, a uvidom u dostupnu literaturu, ovo je prvi dokaz u ljudi o ulozi jače izraženosti Wnt 4 i boljem preživljenju bubrežnog presatka kao čimbenika regeneracije tkiva nakon perioda ishemije.

To otvara čitavo područje istraživanja uvođenja moguće terapije Wnt agonista u liječenju ishemijske ozljede bubrega u transplantiranih bolesnika, a moguće i kod ishemijskih ozljeda bubrega općenito. Osim te hipoteze, ne može se isključiti niti mogući utjecaj nekog od imunosupresiva na izraženost Wnt 4, prije svega inhibitora kalcineurina. Nadalje, možda u ranom razdoblju nakon transplantacije imunosupresivna terapija, ali i imunološki sustav primatelja ne stignu djelovati na izraženost Wnt 4 zbog čega vrijednost ostaje slična onoj u zdravim bubrezima.

Važno je napomenuti da se obitelj Wnt gena sastoji od 19 do sada poznatih članova čija uloga još nije razjašnjena. Mi smo naše istraživanje ograničili na Wnt 4, temeljem gore navedenih istraživanja na životinjama, gdje je upravo Wnt 4 opisan kao ključan za regeneraciju odnosno oporavak funkcije bubrega. Uloga ostalih članova Wnt obitelji nije poznata i ostaje razjasniti da li kontinuirana aktivacija Wnt beta kateninskog signalnog puta ili potpuni gubitak Wnt vodi u nastanak fibroze i koji od članova obitelji Wnt gena, ili nekih od njih, su ključni u navedenom procesu. Temeljem naših rezultata možemo zaključiti da se u tkivu presađenih bubrega vrlo rano gubi izraženost Wnt 4, dok u zdravom tkivu bubrega je on prisutan i korelira sa starošću. Temeljem toga bi se mogla pretpostaviti njegova uloga u održavanju strukture i funkcije bubrega. No, svakako su potrebna dodatna daljnja istraživanja i biopsije velikog broja uzoraka bubrežnih presađaka, moguće čak i u različitim vremenima trajanja hladne ishemije, kako bismo vidjeli u kojem trenutku se njegova izraženost gubi. Isto tako potrebno je istražiti ostale članove Wnt obitelji, jer Wnt 4 možda samostalno nema funkciju, već u koordinaciji sa ostalim članovima obitelji dolazi do njegove aktivacije ili supresije.

7. ZAKLJUČCI

Ovim istraživanjem nismo potvrdili hipotezu da postoji povećana izraženost Wnt 4 u presađenim u odnosu na zdrave bubrege. Već naprotiv izraženost Wnt 4 je veća u zdravim nego u transplantiranim bubrezima.

1. U tkivu presađenih bubrega vrlo rano se gubi izraženost Wnt 4, dok je u zdravom tkivu bubrega on prisutan i korelira sa starošću. Temeljem toga bi se mogla pretpostaviti njegova uloga u održavanju strukture i funkcije bubrega tijekom života.
2. Dob darovatelja organa nije značajno korelirala sa izraženosti Wnt 4. To upućuje da se izraženost Wnt 4 ponaša drugačije u presađenom organu u odnosu na zdravo tkivo bubrega.
3. Značajno dulje preživljenje imaju presatci darovatelja umrlih zbog traume što je najvjerojatnije uzrokovano značajno nižom dobi darovatelja stradalih zbog traume i sa znatno manje komorbiditeta u odnosu na druge darovatelje.
3. Broj ukupnih podudarnosti i podudarnosti u DR nije povezan sa duljinom preživljenja presadaka kao niti s izraženosti Wnt 4.
4. Terapija indukcije nema utjecaj na izraženost Wnt 4 niti preživljavanje transplantiranih bubrega. Niti jedan inhibitor kalcineurina nema utjecaj na izraženost Wnt 4 kao i niti jedan antiproliferativni lijek.
5. Skupina bolesnika kojima je akutno odbacivanje liječeno bolusima kortikosteroida je imala značajno dulje preživljenje presatka i veću izraženost Wnt 4.
6. Izraženost Wnt 4 bila je najveća u onim uzorcima tkiva bubrega koji su uklonjeni iz bolesnika u kratkom vremenskom razdoblju od transplantacije odnosno unutar mjesec dana od transplantacije. Duljim preživljenjem presatka izraženost Wnt 4 u tkivu pada, a njegova izraženost je niža već i u onim uzorcima tkiva bubrega uklonjenim unutar prvog mjeseca po transplantaciji u odnosu na kontrolnu skupinu.
7. Bolesnici s trajanjem ishemije dužom od 16 sati su imali jaču izraženost Wnt 4 u odnosu na skupinu bolesnika s ishemijom kraćom od 16 sati. No, samo trajanje hladne ishemije, čak i produženo, ne dovodi do značajnije kraćeg preživljenja presatka. Vrijeme preživljenja presatka je bilo značajno duže u bolesnika s jačom izraženosti Wnt 4.

8. SAŽETAK

Postupnim razvojem moderne medicine preživljenje i kvaliteta života oboljelih od bubrežnih bolesti se značajno popravlja. Velik dio presađenih bubrega se gubi zbog kroničnih promjena u parenhimu presatka za koji se pretpostavlja da su s jedne strane posljedica neželjenih učinaka imunosupresivnih lijekova, a s druge strane kasnih kroničnih imunoloških zbivanja. Obitelj Wnt (od eng. wingless-type MMTV integration site family) gena ima ključnu ulogu u embionalnom razvoju bubrega. Pretpostavljena je i njihova uloga tijekom života prilikom ozljede bubrega, te procesa oporavka od ozljede ili procesa fibroze. U dosadašnjim istraživanjima, nije jasna njihova uloga niti izraženost u transplantiranim bubrezima. Cilj ovog istraživanja je bio analizirati postoji li povećana izraženost Wnt 4 u presađenim u odnosu na zdrave bubrege, te razlikuje li se u odnosu na uzrok graftektomije. Pratili smo izraženost Wnt 4 u tkivu zdravih (nativnih) bubrega te u tkivu kirurški odstranjenih transplantiranih bubrega u ovisnosti o različitim čimbenicima, za koje smatramo da mogu imati utjecaja na njegovu izraženost. U istraživanje smo uključili 59 bolesnika kojima je zbog završnog stadija zatajenja bubrežne funkcije učinjena transplantacija bubrega s umrle osobe. Kao kontrolna skupina uzeti su uzorci zdravog tkiva bubrega, dobiveni nefrektomijom 24 bolesnika s lokaliziranim tumorom bubrega. Dobiveni rezultati nisu potvrdili našu hipotezu, već suprotno, temeljem naših rezultata možemo zaključiti da se u tkivu presađenih bubrega vrlo rano gubi izraženost Wnt 4 dok je u zdravom tkivu bubrega on prisutan i korelira sa starošću. Temeljem toga bi se mogla pretpostaviti njegova uloga u održavanju strukture i funkcije bubrega. Naše istraživanje je pokazalo kako trajanje hladne ishemije, čak i produženo, ne dovodi do značajnije kraćeg preživljenja presatka. Potvrđena je pojačana izraženost Wnt 4 kod produženog trajanja hladne ishemije, te njegova važnost kao vjerojatnog faktora u regeneraciji bubrežnog tkiva i posljedično tome preživljenja presatka. Prema našim rezultatima, a uvidom u dostupnu literaturu, ovo je prvi dokaz u ljudi o ulozi jače izraženosti Wnt 4 i boljem preživljenju bubrežnog presatka kao faktora regeneracije tkiva nakon perioda ishemije. To otvara čitavo područje istraživanja uvođenja moguće terapije Wnt agonista u liječenju ishemijske ozljede bubrega u transplantiranih bolesnika.

Ključne riječi: transplantacija bubrega, hladna ishemija, Wnt 4 gen, preživljenje presatka, graftektomija, imunosupresivna terapija

9. SUMMARY

Expression of Wnt 4 in transplant kidneys

With the gradual development of modern medicine the overall survival and quality of life of patients with chronic kidney disease significantly improved. Kidney transplantation significantly enhanced the treatment of end-stage renal disease patients. However, many transplanted kidneys are lost due to chronic graft changes caused by immunosuppression therapy or occurrence of late chronic immunologic response. The family of Wnt (wingless-type MMTV integration site family) genes are constituted of 19, till now, described members. Some of these proteins are present in kidney development but also in the process of kidney injury and repair. Due to these published results it is assumed that the same molecules responsible for the regulation of nephrogenesis also participate in the pathophysiology of tubulointerstitial kidney disease. It is still not clear which Wnt gene is responsible for protection and which for damage especially in transplanted kidneys. The aim of this study was to analyze whether Wnt 4 expression is increased in transplanted kidneys compared to healthy kidney samples and is it dependent of different causes of graftectomies. In this study we have included 59 kidney transplanted patients from deceased donors and 24 nephrectomized patients due to localized kidney tumours as a control group. The obtained results did not confirm our hypothesis. On the contrary, the Wnt 4 expression was significantly lower in the kidney transplanted patients group compared to healthy kidney tissue samples which was strongly correlated with age. Although the Wnt 4 expression was correlated with higher age, its most independent and significant correlation was with longer cold ischemia time. This is, at least to our knowledge, the first results which reported higher Wnt 4 expression and better kidney graft survival and its possible role as a factor in kidney graft regeneration especially in prolonged ischemia time and acute tubular necrosis. These results emphasize the importance of future studies of different Wnt receptors agonists as a novel therapy in treating tissue ischemia injuries.

Key words: kidney transplantation, cold ischemia, Wnt 4 gene, graft survival, graftectomy, immunosuppressive therapy

10. POPIS LITERATURE

1. Sadler TW. Langmanova medicinska embriologija. Prijevod 10. izd. Zagreb: Školska knjiga;2008, str. 231-240.
2. Merkel E, Karner M, Carrol T. Molecular regulation of kidney development: is the answer blowing in the Wnt? *Pediatr Nephrol* 2007;22:1825-38.
3. Kobayashi A, Kwan KM, Carrol TJ i sur. Distinct and sequential tissue-specific activities of the LIM-class homeobox gene *Lim1* for tubular morphogenesis during kidney development. *Development* 2005;132:2809-23.
4. Kispert A, Vainio S, McMahon P. Wnt 4 is a mesenchymal signal for epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney. *Development* 1998;125:4225-34.
5. Mori K, Yang J, Barasch J. Ureteric bud controls multiple steps in the conversion of mesenchyme to epithelia. *Semin Cell Dev Biol* 2003;14:209-216.
6. Mesar I, Kes P, Bašić Jukić N. Uloga Wnt u razvoju i funkciji bubrega. *Acta Med Croatica* 2012;66(Supp. 2):56-58.
7. Kasper DL, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrisons principles of internal Medicine – 19th edition*. McGrawHill;2012 (figure 332e-1)
8. Krmpotić-Nemanić J. *Anatomija čovjeka*. Zagreb: Medicinska naklada; 1993, str. 829.
9. Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. *Osnove histologije* 7 izd. Zagreb: Školska knjiga;1999, str. 373-395.
10. Guyton, JE Hall. *Medicinska fiziologija*. 11. izd. Zagreb: Medicinska naklada;2006, str. 291-418.
11. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, Loscalzo J. *Harrisons principles of internal Medicine – 17th edition*. McGrawHill;2008, str.1748-1750.
12. Gamulin S, Marušić M i sur. *Patofiziologija*, 4. Izd. Zagreb: Medicinska naklada 1998, 705-739.
13. Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž i Vucelić B. *Interna medicina*. Zagreb: Medicinska naklada,2008.
14. National Kidney Foundation. *K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification*. *Am J Kidney Dis* 2002;39(Suppl 1):1-266.

15. Levy AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y i sur. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int* 2005;67:2089-2100.
16. Coresh J, Astor BC, Greene T, Eknoyan G, Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease and decreased kidney function in the adult US population: Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Kidney Dis* 2003;41:1-12.
17. Coresh J, Selvin E, Stevens LA. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA* 2007;7:298;2038-47.
18. de Jong PE, van der Velde M, Gansevoort RT, Zoccali C. Screening for chronic kidney disease: where does Europe go? *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:616-23.
19. <http://www.hdndt.org/registar>
20. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Traditional and emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. *Kidney Int* 2003;63(Suppl 85):105-10.
21. Rački S, Maleta I. Role of renal anemia in progression of chronic kidney disease. *Acta Med Croatica* 2009;63(Suppl1):33-7.
22. Pelletier S, Chapurlat R. Optimizing bone health in chronic kidney disease. *Maturitas* 2010;65:325-33.
23. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis* 2002;39:S1–266.
24. Levey AS, Atkins R, Coresh J. Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* 2007;72:247-59.
25. KDIGO CKD-MBD Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease - Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int* 2009;76(Suppl 113):S1–130.
26. Williams ME. Chronic Kidney disease/bone and mineral metabolism. The imperfect storm. *Semin Nephrol* 2009;29:97-104.
27. Andress DL. Adynamic bone in patients with chronic kidney disease. *Kidney Int* 2008;73:1345-54.
28. Said G. Uremic neuropathy. *Handb Clin Neurol* 2013;115:607-12.
29. Zingraff JJ, Noel LH, Bardin T i sur. Beta 2-microglobulin amyloidosis in chronic renal failure. *N Engl J Med* 1990;323(15):1070-1.
30. Grantham JJ. Acquired cystic kidney disease. *Kidney Int* 1991;40(1):143-52

31. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Transplant Work Group. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant* 2009;9(Suppl 3):S1-155.
32. European Renal Best Practice (ERBP) Guideline on the Management and Evaluation of the Kidney Donor and Recipient. *Nephrol Dial Transplant* 2013;28(Suppl 2):1-71.
33. Bašić Jukić N, Bubić Filipi Lj, Kerhin Brkljačić V i sur. Nacionalne smjernice za obradu, odabir i pripremu mogućih primatelja bubrežnog presatka 2006. Zagreb:Ministarstvo zdravstva i socijalne skrbi Republike Hrvatske;2006.
34. <http://www.eurotransplant.org/?id=kidney>
35. <http://www.hdndt.org/hdndtindex.htm>
36. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW. The detailed distribution of HLA A,B,C antigens in normal human organs. *Transplantation* 1984;38:287-92.
37. Daar AS, Fuggle SV, Fabre JW. The detailed distribution of MHC class II antigens in normal human organs. *Transplantation* 1984;38:293-8.
38. Strominger JL. Structure of Class I and Class II HLA Antigens. *Br Med Bull* 1987;43:81-93.
39. Opelz G, Wujciak T, Dohler B, Scherer S, Mytilineos J. HLA compatibility and organ transplant survival. Collaborative Transplant Study. *Rev Immunogenet* 1999;1:334-342
40. Susal C, Opelz G. Current role of HLA matching in organ transplantation. *Curr Opin Organ Transpl* 2013;18:438-4.
41. Susal C, Roelen DL, Fischer G i sur. Algorithms for the determination of unacceptable HLA antigen mismatches in kidney transplant recipients. *Tissue Antigens* 2013;82:83-92.
42. Susal C, Opelz G, Morath C. Role and value of luminex-detected HLA antibodies before and after kidney transplantation. *Transfus Med Hemother* 2013;40:190-5.
43. Hyun J, Park KD, Yoo Y i sur. Effects of different sensitization events on HLA alloimmunization in solid organ transplantation patients. *Transplant Proc* 2012;44:222-5.
44. Bašić Jukić N, Kaštelan Ž i sur. Transplantacija bubrega. Zagreb. Medicinska naklada; 2016: str. 145.
45. Brennan DC, Flavin K, Lowell JA i sur. Leukocyte response to thymoglobulin or atgam for induction immunosuppression in a randomized, double-blind clinical trial in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1999;31(Suppl3):16-18.

46. Acott PD, Lawen JG, Lee S, Crocker JFS. Basiliximab reduces herpes virus and rejection rates compared to ATG/ALG. XIX Congress of the Transplantation Society, Miami,2002, Abstract 12.
47. Hartle JE, Bisordi JE, Chao S, Freeland MJ, West JC. The addition of basiliximab to cellcept, neoral and steroids resulted in significant reduction in acute renal allograft rejection. Abstract 177. Transplantation 2000;69(Suppl 8):159.
48. Sutnathiran M, Morris RE, Storm TB. Immunosuppressants: cellular and molecular mechanisms of action. Am J Kidney Dis 1996;28:159-72.
49. Wood KJ, Goto R: Mechanisms of rejection: current perspectives. Transplantation 2012;93(1):1-10.
50. Rhen T, Cidalski JA. Antiinflammatory action of glucocorticoids-new mechanisms for old drugs. N Engl J Med 2005;353:1711-23.
51. Ransom JT. Mechanism of action of mycophenolate mofetil. Therapeutic Drug Monitoring 1995;17:681-4.
52. Knight SR, Russell NK, Barcena L, Morris PJ. Mycophenolate mofetil decreases acute rejection and may improve graft survival in renal transplant recipients when compared with azathioprine:a systematic review. Transplantation 2009;87:785-94.
53. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. Clin J Am Soc Nephrol 2009;4:481-509.
54. Wijdicks EF. Neurotoxicity of immunosuppressive drugs. Liver Transpl 2001;7:937-42.
55. Hardinger KL, Brennan DC. Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation. World J Transplant 2013;3(4):68-77.
56. Prommool S, Jhangiri GS, Cockfield SM, Halloran PF. Time dependency of factors affecting renal allograft survival. J Am Soc Nephrol 2000;11:565-73.
57. Oosterlee A, Rahmel A. Eurotransplant International Foundation, Annual Report 2011. CIP-Gegevens Koninklijke bibliotheek, Den Haag;1-116.
58. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. N Engl J Med 2002;346(8):580-90.
59. Ponticelli C, Moia M, Montagnino G. Renal allograft thrombosis. Nephrol Dial Transplant 2009;24:1388-93.
60. Akbar SA, Jafri SZ, Amendola MA, Madrazo BL, Salem R, Bis KG. Complications of renal transplantation. Radiographics 2005;25:1335-56.

61. Buturović Ponikvar J. Renal transplant artery stenosis. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(Suppl 5):74-7.
62. Kahan BD, Ponticelli C. Principles and practice of renal transplantation. London, England: Martin Dunitz, 2000;41-251.
63. Roberts DM, Jiang SH, Chadban SJ. The treatment of acute antibody-mediated rejection in kidney transplant recipients-a systematic review. *Transplantation* 2012;94:775-83.
64. Nankivell BJ, Alexander SI. Rejection of the kidney allograft. *N Engl J Med* 2010;363 (15):1451-62.
65. Bhowmik DM, Dinda AK, Mahanta P, Agarwal SK. The evolution of the Banff classification schema for diagnosis renal allograft rejection and its implication for clinicians. *Indian J Nephrol* 2010;20:2-8.
66. Solez K, Colvin RB, Racusen LC i sur. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *Am J Transplant* 2008;8:753-60.
67. Haas M, Sis B, Racusen LC i sur. Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report: inclusion of C4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014;14(2):272-83.
68. Loupy A, Haas M, Solez K i sur. The Banff 2015 Kidney Meeting Report: Current Challenges in Rejection Classification and Prospects for Adopting Molecular Pathology. *Am J Transplant* 2017;17(1):28-41.
69. Avery RK. Infectious disease following kidney transplant: core curriculum 2010. *Am J Kidney Dis* 2010;55:755-71.
70. Fishman JA, Rubin RH. Infection in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 1998;338(24):1741-51.
71. Solez K, Colvin RB, Racusen LC i sur. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007;7(3):518-26.
72. Thuillier R, Mannon RB: The immunology of chronic allograft injury. N.I.Ahsan. Eureka Bioscience Database Chronic Allograft Failure: Natural History, Pathogenesis, Diagnosis and Management, Landes Biosciences, 2007.
73. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Hallaron PF. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: The role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant* 2005;5:1367-1374.
74. Johnston O, Rose C, Landsberg D, Gourlay WA, Gill JS. Nephrectomy after transplant failure: current practice and outcomes. *Am J Transplant* 2007;7(8):1961-7.

75. Touma NJ, Sener A, Caumartin Y, Warren J, Nguan CY, Luke PP. Extracapsular versus intracapsular allograft nephrectomy: impact on allosensitization and surgical outcomes. *Can Urol Assoc J* 2011;5(1):49-52.
76. He W, Dai C, Li Y, et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:765–776.
77. Hwang I, Seo EY, Ha H. Wnt/beta-catenin signaling: a novel target for therapeutic intervention of fibrotic kidney disease. *Arch Pharm Res* 2009;32:1653–1662.
78. Rao TP, Kuhl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ Res* 2010;106:1798–1806.
79. Karner CM, Chirumamilla R, Aoki S i sur. Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis. *Nat Genet.* 2009;41:793–799.
80. Burn SF, Webb A, Berry RL i sur. Calcium/NFAT signalling promotes early nephrogenesis. *Dev Biol* 2011;352:288–298.
81. Liu H, Fergusson MM, Castilho RM i sur. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 2007;317:803–806.
82. Satoh M, Nagasu H, Morita Y i sur. Klotho protects against mouse renal fibrosis by inhibiting Wnt signaling. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;303:F1641–F1651.
83. Wang D, Dai C, Li Y i sur. Canonical Wnt/beta-catenin signaling mediates transforming growth factor-beta1-driven podocyte injury and proteinuria. *Kidney Int* 2011;80:1159–1169.
84. Roderick J Tan, Dong Zhou, Lili Zhou and Youhua Liu. Wnt beta-catenin signaling and kidney fibrosis. *Kidney Int Suppl* 2011;4(1):84-90.
85. Kang YS, Li Y, Dai C i sur. Inhibition of integrin-linked kinase blocks podocyte epithelial-mesenchymal transition and ameliorates proteinuria. *Kidney Int* 2010;78:363–373.
86. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol* 2002;3(1):REVIEWS3001
87. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998;14:59–88.
88. Nathans J, Nusse R. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 1996;382:225–30.
89. Burrus L. Wnt as a short range signaling molecule. *BioEssays* 1994;16:155-7.
90. Roelink H, Nusse R. Expression of two members of Wnt gene family during mouse development-restricted temporal and spatial patterns in the developing neural tube. *Genes Dev* 1991;5:381-8.

91. Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle E. A Wnt 4 mutation associated with Mullerian duct regression and virilization in a 46XX woman. *N Eng J Med* 2004;351:792-8.
92. Philbert P, Biason-Lauber A, Rouzier R, Pienkowski C, Paris F, Konrad D. Identification and functional analysis of a new Wnt 4 gene mutation among 28 adolescent girls with primary amenorrhea and Mullerian duct abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:895-900.
93. Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon A. Female development in mammals is regulated by Wnt 4 signaling. *Nature* 1999;397:405-9.
94. Zhou D, Li Y, Lin L i sur. Tubule-specific ablation of endogenous beta-catenin aggravates acute kidney injury in mice. *Kidney Int* 2012;82:537–547.
95. Terada Y, Tanaka H, Okado T i sur. Expression and function of the developmental gene Wnt-4 during experimental acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(5):1223-33
96. Surendran K, Schiavi S, Hruska KA. Wnt-dependent beta-catenin signaling is activated after unilateral ureteral obstruction, and recombinant secreted frizzled-related protein 4 alters the progression of renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:2373–2384.
97. von Toerne C, Schmidt C, Adams J i sur. Wnt pathway regulation in chronic renal allograft damage. *Am J Transplant* 2009;9:2223–2239.
98. Toualbi K, Guller MC, Mauriz JL i sur. Physical and functional cooperation between AP-1 and beta-catenin for the regulation of TCF-dependent genes. *Oncogene* 2007;26:3492–3502.
99. Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nat Rev Nephrol* 2011;7:684–696.
100. Boutet A, De Frutos CA, Maxwell PH i sur. Snail activation disrupts tissue homeostasis and induces fibrosis in the adult kidney. *EMBO J.* 2006;25:5603–5613.
101. Yoshino J, Monkawa T, Tsuji M i sur. Snail1 is involved in the renal epithelial-mesenchymal transition. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;362:63–68.
102. Surendran K, Simon TC, Liapis H i sur. Matrilysin (MMP-7) expression in renal tubular damage: association with Wnt4. *Kidney Int* 2004;65:2212–2222.
103. Eddy AA, Fogo AB. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action. *J Am Soc Nephrol* 2006;17:2999–3012.
104. Cao W, Zhou QG, Nie J i sur. Albumin overload activates intrarenal renin-angiotensin system through protein kinase C and NADPH oxidase-dependent pathway. *J Hyperten* 2011;29:1411–1421.

105. Dai C, Stolz DB, Kiss LP i sur. Wnt/beta-catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1997–2008.
106. Li Z, Xu J, Xu P i sur. Wnt/beta-catenin signalling pathway mediates high glucose induced cell injury through activation of TRPC6 in podocytes. *Cell Prolif* 2013;46:76–85.
107. Gourishankar S, Halloran PF. Late deterioration of organ transplants. A problem in injury and homeostasis. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:576-583.
108. Freese P, Svalander CT, Molne J, Norden G, Nyberg G. Chronic allograft nephropathy-biopsy findings and outcome. *Nephrol Dial Transplant* 2001;16:2401-2406.
109. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Hallaron PF. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: The role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant* 2005;5:1367-1374.
110. Roxburgh SA, Murphy M, Pollock CA i sur. Recapitulation of embryological programmes in renal fibrosis. The importance of epithelial cell plasticity and developmental genes. *Nephron Physio* 2006; 103(3):139-48.
111. Kalluri R, Neilson EG: Epithelial- mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112(12);1776-84.
112. Liu Y: Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(1):1-12.
113. Hao S, He W, Li Y i sur. Targeted inhibition of beta-catenin/CBP signaling ameliorates renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:1642–1653.
114. de Borst MH, Hajhosseiny R, Tamez H i sur. Active vitamin D treatment for reduction of residual proteinuria: a systematic review. *J Am Soc Nephrol* 2013;24:1863–1871.
115. Furic-Cunko V, Kes P, Coric M, Hudolin T, Kastelan Z, Basic-Jukic N. Expression of bone morphogenetic proteins 4, 6 and 7 is downregulated in kidney allografts with interstitial fibrosis and tubular atrophy. *Int Urol Nephrol* 2015;47(7):1219-29.
116. Uzzo RG, Novick AC. Nephron sparing surgery for renal tumors: indications, techniques and outcomes. *J Urol* 2001;166(1):6-18.
117. Joniau S, Vander Eeckt K, Van Poppel H. The Indications for Partial Nephrectomy in the Treatment of Renal Cell Carcinoma. *Nat Clin Pract Urol* 2006;3(4):198-205.
118. Martorana G, Lupo S, Brunocilla E, Concetti S, Malizia M, Vece E. Role of nephron sparing surgery in the treatment of centrally located renal tumors. *Arch Ital Urol Androl* 2004;76(2):51-5.

119. World Health Organization, Global Report on Diabetes. Geneva, 2016. Accessed 30 August 2016.
120. Hrvatski registar nadomještanja bubrežne funkcije 2012. <http://www.hdndt.org>
121. Melmed S, Polonsky K, Reed Larsen P, Kronenberg H. Williams textbook of endocrinology - 12th edition. Philadelphia: Elsevier/Saunders;2011, str.1371–1435.
122. Snyder JJ, Israni AK, Peng Y, Zhang L, Simon TA, Kasiske BL: Rates of first infection following kidney transplant in the United States. *Kidney Int* 2009;75:317–326.
123. Kahwaji J: Cause of death with graft function among renal transplant recipients in intergrated healthcare system. *Transplantation* 2011;91:225-230.
124. Ponticelli C, Moia M, Montagnino G. Renal allograft thrombosis. *Nephrol Dial Transplant* 2009;4:1388-93.
125. Balachandra S, Tejani A. Recurrent vascular thrombosis in an adolescent transplant recipient. *J Am Soc Nephrol* 1997;8:1477-81.
126. Patel R, Paya CV. Infections in solid-organ transplant recipients. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:86-124.
127. Stel VS, Kramer A, Zoccali C, Jager KJ. The 2007 ERA-EDTA Registry Anual Report. *NDT Plus* 2009;2:514-521.
128. Harris S, Coupes BM, Roberts SA, Roberts IS, Short CD, Brenchley PE: TGF – beta 1 in chronic allograft nephropathy following renal transplantation. *J Nephrol* 2007;20:177-185.
129. Nankivell BJ, Borrows R, Fung CL, O, Connell PJ, Allen RD, Chapman JR: The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 2003;349:2326-2333.
130. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S i sur. Chronic humoral rejection: Identification of antibody – mediated chronic renal rejection by C4d deposits in peritubular capillares. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:574-582.
131. Jevnikar A., Mannon B. Late kidney allograft loss: what do we know about it and what we can do about it. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008;3:56-67.
132. Racusen LC, Solez K, Colvin RB i sur. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int* 1999;55:713–723.
133. Cheng O, Thuillier R, Sampson E i sur. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *Am J Transplant* 2006;6:2292–2306.

134. Melk A, Schmidt BM, Vongwiwatana A, Rayner DC, Halloran PF. Increased expression of senescence-associated cell cycle inhibitor p16INK4a in deteriorating renal transplants and diseased native kidney. *Am J Transplant* 2005;5:1375–1382.
135. Xu Y, Sun Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocr Rev* 2015;36(2):174-93.
136. Baid-Agrawal S, Farris AB, Pascual M i sur. Overlapping pathways to transplant glomerulopathy: Chronic humoral rejection, hepatitis C infection, and thrombotic microangiopathy. *Kidney Int* 2011;80:879–885.
137. Susal C, Opelz G. Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens. *Transplantation* 2002;73:1269–1273.
138. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: A prospective trial. *Am J Transplant* 2004;4:438–443.
139. Gilks WR, Bradley BA, Gore SM, Klouda PT. Substantial benefits of tissue matching in renal transplantation. *Transplantation* 1987;43(5):669-74.
140. Doxiadis II, de Fijter JW, Mallat MJ, Haasnoot GW, Ringers J, Persijn GG, Claas FH. Simpler and equitable allocation of kidneys from postmortem donors primarily based on full HLA-DR compatibility. *Transplantation* 2007;83(9):1207.
141. Kainz A, Heinze G, Korbely R, Schwarz C, Oberbauer R. Mycophenolate mofetil use is associated with prolonged graft survival after kidney transplantation. *Transplantation* 2009;88(9):1095-100.
142. Opelz G, Dohler B. Collaborative Transplant Study. Influence of immunosuppressive regimens on graft survival and secondary outcomes after kidney transplantation. *Transplantation* 2009;87:795-802.
143. Swafford D, Manicassamy S. Wnt signaling in dendritic cells: its role in regulation of immunity and tolerance. *Discov Med* 2015;19(105):303-10.
144. Suryawanshi A, Manicassamy S. Tumors induce immune tolerance through activation of β -catenin/TCF4 signaling in dendritic cells: A novel therapeutic target for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2015;4(12):e1052932
145. Kogut MH, Arsenault RJ. A Role for the Non-Canonical Wnt- β -Catenin and TGF- β Signaling Pathways in the Induction of Tolerance during the Establishment of a *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Persistent Cecal Infection in Chickens. *Front Vet Sci* 2015;2:33.
146. Suryawanshi A, Tadagavadi RK, Swafford D, Manicassamy S. Modulation of Inflammatory Responses by Wnt/ β -Catenin Signaling in Dendritic Cells: A Novel Immunotherapy Target for Autoimmunity and Cancer. *Front Immunol* 2016;7:460.
147. Pagtalunan ME, Olson JL, Tilney NL, Meyer TW. Late consequences of acute ischemic injury to a solitary kidney. *J Am Soc Nephrol* 1999;10:366–373.

148. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:301–308.
149. Ortiz A, Lorz C, Catalan MP i sur. Expression of apoptosis regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture or following acute renal failure. *Kidney Int* 2000;57:969–981.
150. Ortiz A. Nephrology forum: Apoptotic regulatory proteins in renal injury. *Kidney Int* 2000;58:467–485.
151. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003;112:1776–1784.
152. Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem* 2005;280:8094–8100.
153. Zeisberg M, Hanai J, Sugimoto H i sur. BMP-7 counteracts TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and reverses chronic renal injury. *Nat Med* 2003;9 :964–968.
154. Lin J, Patel SR, Cheng X i sur. Kielin/chordin-like protein, a novel enhancer of BMP signaling, attenuates renal fibrotic disease. *Nat Med* 2005;11:387–393.
155. McMorrow T, Gaffney MM, Slattery C, Campbell E, Ryan MP. Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrol Dial Transplant* 2005;20:2215–2225.
156. Slattery C, Campbell E, McMorrow T, Ryan MP. Cyclosporine A-induced renal fibrosis: A role for epithelial-mesenchymal transition. *Am J Pathol* 2005;167:395–407.
157. Vongwiwatana A, Tasanarong A, Rayner DC, Melk A, Halloran PF. Epithelial to mesenchymal transition during late deterioration of human kidney transplants: The role of tubular cells in fibrogenesis. *Am J Transplant* 2005;5:1367–1374.
158. Hertig A, Verine J, Mougnot B i sur. Risk factors for early epithelial to mesenchymal transition in renal grafts. *Am J Transplant* 2006;6:2937–2946.
159. Ojo A, Wolfe R, Held P i sur. Delayed graft function: Risk factors and implications for renal allograft survival. *Transplantation* 1997;63:968–974.
160. Abdulla K. Salahudeen, Haider N, and May W. Cold ischemia and the reduced long-term survival. *Kidney Int* 2004;65:713–718.
161. Lim EC, Terasaki PI. Early graft function. *Clin Transpl* 1991;401-407.
162. Opelz G, Döhler B. Multicenter analysis of kidney preservation. *Transplantation* 2007; 83:247-53.

163. Troppmann C, Gillingham KJ, Gruessner RW i sur. Delayed graft function in the absence of rejection has no long-term impact. A study of cadaver kidney recipients with good graft function at 1 year after transplantation. *Transplantation* 1996; 61:1331-7.
164. Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV i sur. Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet* 1999;354:1147-52.
165. Kuncewitch M1, Yang WL, Molmenti E, Nicastro J, Coppa GF, Wang P. Wnt agonist attenuates liver injury and improves survival after hepatic ischemia/reperfusion. *Shock* 2013;39(1):3-10.

11. BIOGRAFIJA

Rođena sam 1984. godine u Bjelovaru. Opću i muzičku osnovnu školu sam završila u Bjelovaru. Srednju školu sam završila u Zagrebu. Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2002. godine, a završila 2008. godine. Obavezni pripravnički staž u trajanju od godinu dana obavila sam u KB Sveti Duh. Nakon položenog državnog ispita 2009. godine radila sam šest mjeseci kao liječnik u Sveučilišnoj Klinici Vuk Vrhovac. Znanstveni poslijediplomski studij "Biomedicina i zdravstvo" na Medicinskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2011. godine i položila sve propisane ispite. Specijalistički ispit iz interne medicine položila sam 2014. godine, a iste godine sam počela subspecijalizaciju iz nefrologije. Sudjelovala sam u nekoliko znanstveno-istraživačkih projekata vezanih uz transplantaciju bubrega, kroničnu hemodijalizu, kontinuirane metode nadomjesnog bubrežnog liječenja, te liječenje i praćenje bolesnika u terminalnim stadijima kronične bubrežne bolesti. Sudjelovala sam aktivno na više domaćih i inozemnih stručnih i znanstvenih skupova. Autor i ko-autor sam više radova objavljenih u međunarodno indeksiranim časopisima. Član sam više domaćih i stranih stručnih društava.