Čimbenici rizika za razvoj eritricitoze nakon transplantacije bubrega

Mustapić, Željka

Doctoral thesis / Disertacija

2013

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:105:639396

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-23**

Repository / Repozitorij:

Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Željka Mustapić

Čimbenici rizika za razvoj eritrocitoze nakon transplantacije bubrega

DISERTACIJA

Zagreb, 2013.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET

Željka Mustapić

Čimbenici rizika za razvoj eritrocitoze nakon transplantacije bubrega

DISERTACIJA

Zagreb, 2013.

Klinički dio doktorske disertacije izrađen je u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju, Klinike za unutarnje bolesti, KBC Zagreb.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Petar Kes

Zahvaljujem se svom mentoru, prof.dr.sc. Petru Kesu koji je ne gubeći nadu i strpljenje bio podrška kada je god to trebalo.

Posebno se zahvaljujem prof.dr.sc. Nikolini Bašić-Jukić bez čije stručne i moralne podrške od mojih početaka, ovaj rad ne bi ugledao svjetlo dana.

Od srca se zahvaljujem sestrama Mirjani Kozini,Karitas Majić i Sanji Klačinski na nesebičnoj pomoći i trudu pri obradi bolesnika uz uvijek prisutan osmijeh i srdačnost bez kojih ovo ne bi bilo moguće.

Zahvaljujem se i dragim prijateljima Nikici i Ivanu Tomašiću na strpljenju, pomoći i statističkoj obradi podataka.

Ovaj rad posvećujem svom suprugu, sinovima Brunu i Leonu i kćeri Tonki bez čije svakodnevne podrške i razumijevanja ne bi bilo ni mog uspjeha.

SADRŽAJ

POPIS OZNAKA I KRATICA

1. UVOD
    1.1. Transkripcijski čimbenici hematopoetskog sustava 2
    1.2. Čimbenici rasta hematopoetskog sustava i njihovi receptori 4
        1.2.1. Eritropoetin 4
            1.2.1.1.Građa 4
            1.2.1.2.Fiziologija 4
            1.2.1.3.Molekularni mehanizmi ekspresije potaknuti hipoksijom 6
            1.2.1.4.Sistemski učinci 8
            1.2.1.5.Učinci na nehematopoetska tkiva 10
        1.2.2. Građa i aktivacija receptora za eritropetin 14
        1.2.3. Interleukin 3 16
        1.2.4. Građa i aktivacija receptora za interleukin 3 17
    1.3. Fiziologija i patofoziologija hematopoetskog sustava 20
        1.3.1. Eritrocitopoeza 23
    1.4. Kronično zatajenje bubrega 25
        1.4.1. Definicija 25
        1.4.2. Klasifikacija 26
        1.4.3. Čimbenici rizika 27
        1.4.4. Učestalost i pojavnost 29
        1.4.5. Patogeneza 30
    1.5. Transplantacija bubrega 33
        1.5.1. Imunosupresivni lijekovi 35
            1.5.1.1.Kortikosteroidi 36
            1.5.1.2.Antiproliferativni lijekovi 37
                1.5.1.2.1. Inhibitori sinteze purina 37
                1.5.1.2.2. mTOR inhibitori 38
            1.5.1.3.Kalcineurinski inhibitori 39
            1.5.1.4.Poliklonalna i monoklonalna antilimfocitna protutijela 41

1.5.1.5.Selektivni inhibitor T stanica 43
1.5.2. Hematološke komplikacije transplantacije bubrega 44
1.5.2.1.Posttransplantacijska anemija 44
1.5.2.2.Posttransplantacijska eritrocitoza 46
2. HIPOTEZA 50
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA 52
4. ISPITANICI I METODE 54
4.1. Ispitanici 55
4.2. Metode 56
4.2.1. Pristanak za sudjelovanje u ispitivanju 56
4.2.2. Istraživani parametri 56
4.3. Statistička analiza podataka 62
5. REZULTATI 63
5.1. Osnovna obilježja bolesnika 64
5.2. Eritrocitoza i istraživani biokemijski parametri 67
5.3. Klinička obilježja bolesnika s eritrocitozom 81
5.4. Osobitosti terapije bolesnika s eritrocitozom 84
5.5. Ovisnost hematokrita o promatranim varijablama 85
5.6. PTH kao čimbenik rizika za razvoj eritrocitoze 88
6. RASPRAVA 89
6.1. Osnovna obilježja bolesnika 90
6.2. Eritrocitoza kao čimbenik rizika za srčanožilne bolesti 91
6.3. Eritrocitoza i istraživani biokemijski parametri 94
6.4. Ovisnost hematokrita o istraživanim varijablama 97
6.5. PTH kao čimbenik rizika za razvoj eritrocitoze 99
7. ZAKLJUČAK 101
8. SAŽETAK 104
9. ABSTRACT 105
10. LITERATURA 107
11. ŽIVOTOPIS 130

POPIS OZNAKA I KRATICA

ABCA1	- engl. ATP-binding cassette (ABC) transporter A1
ABCG1	- engl. ATP-binding cassette (ABC) transporter G1
AIM	- akutni infarkt miokarda
AMKL	- engl. acute megakaryoblastic leukemia
AT_1R	- engl. angiotensin 1 receptor
BFU-E	- engl. burst forming units erythroid
CFU-E	- engl. colony forming unit-erythroid
CKD-EPI	- engl. Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
c-myb	- engl. c-myeloblastosis
CSF	- engl. colony stimulating factor
EKLF	- engl. erythroid kruppel-like factor
eNOS/NOS3	- engl. endothelial nitric oxide sintase
EPAS1	- engl. endothelial PAS domain-containing protein 1
EPCs	- engl. endothelial progenitor cells)
EPO	- eritropoetin
EPOR	- engl. erythropoietin receptor
ERBP	- engl. European Renal Best Practise
FIH-1	- engl. factor inhibiting HIF
FK506 / FKBP12	- engl FK binding protein 12
GF	- glomerularna filtracija
Hb	- hemoglobin
HCGF	- engl. hematopoietic growth factor
HIF -	- engl. hypoxia inducible transcription factor
HLA	- engl. human leukocyte antigens
IGF-1	- engl. insulin like growth factor-1
IL	- engl.interleukin
JAK2	- engl. Janus kinases 2
KDIGO	- engl. Kidney Disease Improving Global Outcome
KZB	- kronično zatajivanje bubrega

KZS	- kronično zatajenje srca
L-NAME	- engl. N-nitro-L-arginin metil ester
mAb	- engl. monoclonal antibodies
MCGF	- engl. mast cell growth factor
MDRD	- engl. Modification of Diet in Renal Disease
MHC	- engl. major histocompatibility complex
MPA	- engl. mycophenolic acid
MPS	- engl. mycophenolate sodium
mRNA	- engl. messenger RNA
mTOR	- engl. mammalian target of rapamycin
NFkβ	- engl. nuclear factor kappa β
NK	- engl. natural killer
NKF-KDOQI -	- National Kidney Foundation-Kidney Disease Outcome Quaility Iniciative
PHD	- engl. prolil hydroxylases
PI3K	- engl. phosphatidylinositide 3-kinases
PKI	- perkutana koronarna intervencija
PU.1	- engl. purine-rich nucleic acid binding protein
RAS	- engl. renin angiotensin system
Rbtn2/LMO2	-engl. rhombotin2/LIM only2
SC	- engl. stem cells
SHPT	- sekundarni hiperparatireoidizam
STAT	- engl. signal transducer and activator of transcription
Tal-1/SCL	- engl. T-cell acute lymphoblastic leukemia 1/ stem cell leukemia
TCR	- engl. T cell receptor
TGF- β1	- engl. transforming growth factor β1
TMD	- engl. transient mieloablative disorder
TMMRTSG	- Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group
TPMT	- engl. tiopurin S-metil transferase
VHL	- engl. von Hipel Lindau

1. UVOD

1.1. TRANSKRIPCIJSKI ČIMBENICI HEMATOPOETSKOG SUSTAVA

Transkripcijski čimbenici su bjelančevine koje reguliraju izražaj različitih gena. Mogu biti nespecifični i specifični za pojedini gen. Vezanjem za promotorsku regiju gena dovode do prijepisa tripleta nukleotida u mRNA (*engl. messenger RNA*), a time i sinteze ciljne bjelančevine, proizvoda gena, na ribosomu. Transkripcijski čimbenici također su pod pozitivnom i/ili negativnom povratnom spregom drugih molekula.

Zahvaljujući razvoju znanosti, mnogo se naučilo o temeljnoj ulozi nekoliko transkripcijskih čimbenika kroz studije u kojima se proučavala njihova aktivacija prilikom translokacija u slučaju leukemija, kao i učinak prekida gena u embrijskim matičnim stanicama [1]. Važni čimbenici uključuju *Tal-1/SCL (engl. T-cell acute lymphoblastic leukemia 1/ stem cell leukemia), Rbtn2/LMO2 (engl. rhombotin2/ LIM only2) i GATA* obitelj transkripcijskih čimbenika koji su dobili ime po DNA slijedu na koju se vežu, '*GATA*'

Tal-1/SCL — *Tal-1/SCL* je gen izražen u leukemijama (bifenotipskim i T staničnim), primitivnim hematopoetskim prastanicama i zrelijim eritroidinim, mastocitnim, megakariocitnim i endotelnim stanicama [2]. Ciljano uništenje ovog gena u miševa dovodi do intrauterine smrti zbog nepostojanja hematopoeze. Ovo saznanje, zajedno s izostankom razvoja mijeloidnih stanica *in vitro* i podataka koji upućuju na sudjelovanje *Tal-1/SCL* u angiogenezi [3] govore u prilog vrlo rane važne uloge ovog gena, najvjerojatnije na razini pluripotentne ili mijeloidno-eritroidne matične stanice.

Zanimljivo je kako prekid ovog gena u odraslih miševa pokazuje da *Tal-1/SCL* nije potreban za održavanje ili samoobnavljanje odraslih matičnih stanica, ali je potreban za diferenciranje eritroidnih i megakariocitnih linija [2]. Pojačan izražaj ovog čimbenika u eritroidnim ili bipotentnim staničnim linijama dovodi do pojačane eritroidne diferencijacije [2,4], ali za sada nema podataka o pojačanom izražaju u odraslim hematopoetskim matičnim stanicama.

Rbtn2/LMO2 **–** transkripcijski čimbenik uključen u T-staničnim akutnim limfoblastičnim leukemijama (T-ALL) je *LIM* i to samo njegova domena jezgrinog proteina rhombotin 2 (*Rbtn2/LMO2*) [2]. Miševi koji nemaju ovaj čimbenik također umiru intrauterino zbog nedostatka krvi kao i životinje s manjkom *Tal-1/SCL* [5]. Neka su istraživanja pokazala kako *LMO2* funkcionira u kompleksu s *Tal-1/SCL* [6] što upućuje i na njihovu interakciju *in vivo*.

GATA-2 gen je jako izražen u eritroidnim progenitornim stanicama [7]. Pojačan izražaj *GATA-2* u kokošjim eritroidnim pretečama dovodi do pojačane proliferacije na račun diferencijacije. Međutim, ciljani prekid *GATA-2* gena dovodi do smanjene primitivne hematopoeze u žumanjčanoj vreći i smrti embrija do 10 ili 11 dana [8]. Hematopoeza u jetri i koštanoj srži je izrazito oštećena zbog gubitka svih linija, a podatci o *in vitro* diferencijaciji otkrivaju značajan manjak konačnih eritroidnih i mastoidnih kolonija te reducirane kolonije makrofaga. Ova saznanja upućuju da *GATA-2* služi kao regulator gena koji kontroliraju odgovor na hematopoetske čimbenike rasta ili proliferaciju matičnih i/ili prastanica [2].

Nalaz značajno smanjene ekspresije *GATA-2* mRNA u CD34+ stanica kod bolesnika s aplastičnom anemijom, upućuje da neadekvatan izražaj ovog transkripcijskog čimbenika može biti odgovoran za razvoj ove bolesti [8]. Smanjen izražaj *GATA-2* također može upućivati na gubitak matičnih stanica; postat će bitno mjeriti izražaj u subpopulaciji CD34+ stanicama koje su obogaćene aktivnošću matičnih stanica [9].

Izražaj gena ***GATA-1*** ograničen je na multipotentne prastanice i na eritroidne, megakariocitne, mastocitne i eozinofilne linije [2]. Iz nekoliko studija vidljiva je njihova važna funkcija u razvoju eritrocita obzirom da u slučaju manjka *GATA-1* čimbenika, embrijske matične stanice nisu bile u mogućnosti razviti se u smjeru eritroidnih stanica, ali jesu u druge hematopoetske linije i tkiva [10, 11]. Daljnja ispitivanja *in vitro* pokazuju zastoj na razini proeritroblasta i apoptozu ovih stanica [12]. Mišji embriji kojima nedostaje *GATA-1* umiru uslijed teške anemije kao posljedice zastoja u sazrijevanju primitivne eritroidne stanice, dok gubitak *GATA-1* u odraslih miševa dovodi do stanja nalik krizi aplastične anemije kod ljudi [11].

Dojenčad koja boluje od sindroma Down i prolaznog mijeloablativnog poremećaja (TMD*, engl. transient mieloablative disorder*) ili akutne megakarioblastične leukemije (AMKL, od *eng. acute megakaryoblastic leukemia*) imaju stečenu mutaciju u 5' regiji *GATA-1* [13]. Ove su mutacije gotovo uvijek prirođene, odnosno stečene *in utero*, i javljaju se u oko 10% novorođenčadi sa sindromom Down bez znakova TMD ili AMKL.

Da li će se matična stanica usmjeriri u eritroidnu ili mijeloidnu liniju može djelomično ovisiti o međudjelovanju *GATA* bjelančevina (*GATA-1 i GATA-2*) i *PU.1* (od *eng. purine-rich nucleic acid binding protein*), kasnije bjelančevine esencijalne za razvoj mijeloidnih stanica [14].

1.2. ČIMBENICI RASTA HEMATOPOETSKOG SUSTAVA

Regulacija kako proliferacije, tako i sazrijevanja eritroidnih prastanica ovisi o međudjelovanju brojnih čimbenika rasta (*CSF, engl. colony stimulating factor*). Posljednjih godina, dostupnost rekombiniranih čimbenika rasta, obogaćivanje ciljnih prastanica, korištenje definiranih *"serum-free*" uvjeta u kulturama kao i ciljana disrupcija čimbenika i njihovih receptora omogućuju uvid u njihovu funkciju za vrijeme hematopoeze.

1.2.1 Eritropoetin

Eritropoetin (EPO) je čimbenik rasta neophodan za konačno sazrijevanje eritroidnih stanica čija je primarna funkcija prenositi kisik iz pluća do tkiva. Povezanost hipoksije i eritropoeze prvi je puta opisana 1890. godine od strane francuskog anatoma Francois-Gilbert Viaulta koji je uočio povećanje broja crvenih krvnih stanica na putovanju visokim nadmorskim visinama u Peruu [15].

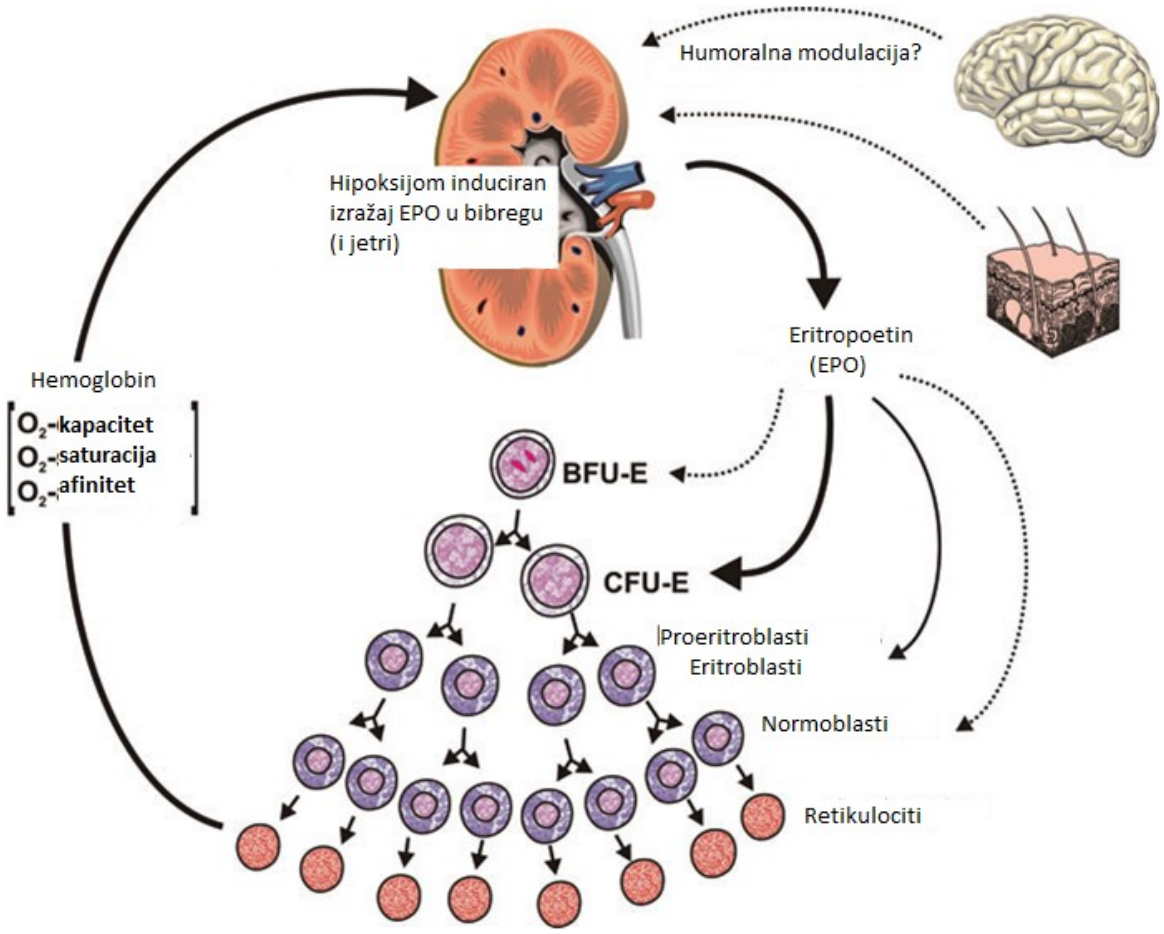
1.2.1.1 Građa

Istraživanje građe ljudskog EPO otkrila su da se radi o polipeptidu koji je građen od 165 aminokiselina presavijenih u 4 alfa-uzvojnice vezane s dva disulfidna mosta između cisteina na 6 i 161 te između cisteina na 26 i 33 mjestu. Sastav EPO čini oko 60% proteina i 40% ugljikohidrata. Cirkulirajući EPO ima više glikoziliranih izoformi koje se razlikuju u električnom naboju i biološkoj aktivnosti. Koncentracija EPO se uobičajeno izražava u internacionalnim jedinicama (IU), a referentne vrijednosti za cirkulirajući EPO u plazmi određuje laboratorij, ali se u 95% pojedinaca s urednom crvenom krvnom slikom nalaze se u rasponu od 4-32 IU/L [15].

1.2.1.2 Fiziologija

EPO se najranije izlučuje iz hepatocita u fetalnom životu. Uz stvaranje EPO u fetalnoj jetri, ekspresija gena za EPO u bubregu počinje od 18. tjedna gestacije u ljudi. Nakon rođenja, kada se eritropoeza seli u koštanu srž, bubreg postaje glavni organ stvaranja EPO. Stanice bubrega koje stvaraju EPO su intersticijske peritibularne stanice s neuralnim karakteristikama [16].

Hipoksično poticanje stvaranja EPO u bubrezima od 150 puta ili više, posljedica je povećanja broja stanica koje stvaraju EPO, a ne povećanja proizvodnje EPO po stanici [17]. EPO mRNA se također može pronaći u mozgu, jetri, slezeni, plućima i testisima, ali ovi organi ne mogu nadomjestiti stvaranje EPO u bubrezima kod bolesnika s kroničnim zatajivanjem bubrega (KZB). Sistemski EPO djeluje kao antiapoptotični čimbenik na eritroidne progenitore, posebno na eritroidnu jedinicu stvaranja kolonija (CFU-E, *eng. colony forming unit-erythroid*). One se kao odgovor na EPO umnažaju i diferenciraju u kolonije proeritroblasta i normoblasta (Slika 1).



Slika 1. Dijagram povratne sprege regulacije eritrocitopoeze. Prilagođeno prema [14]

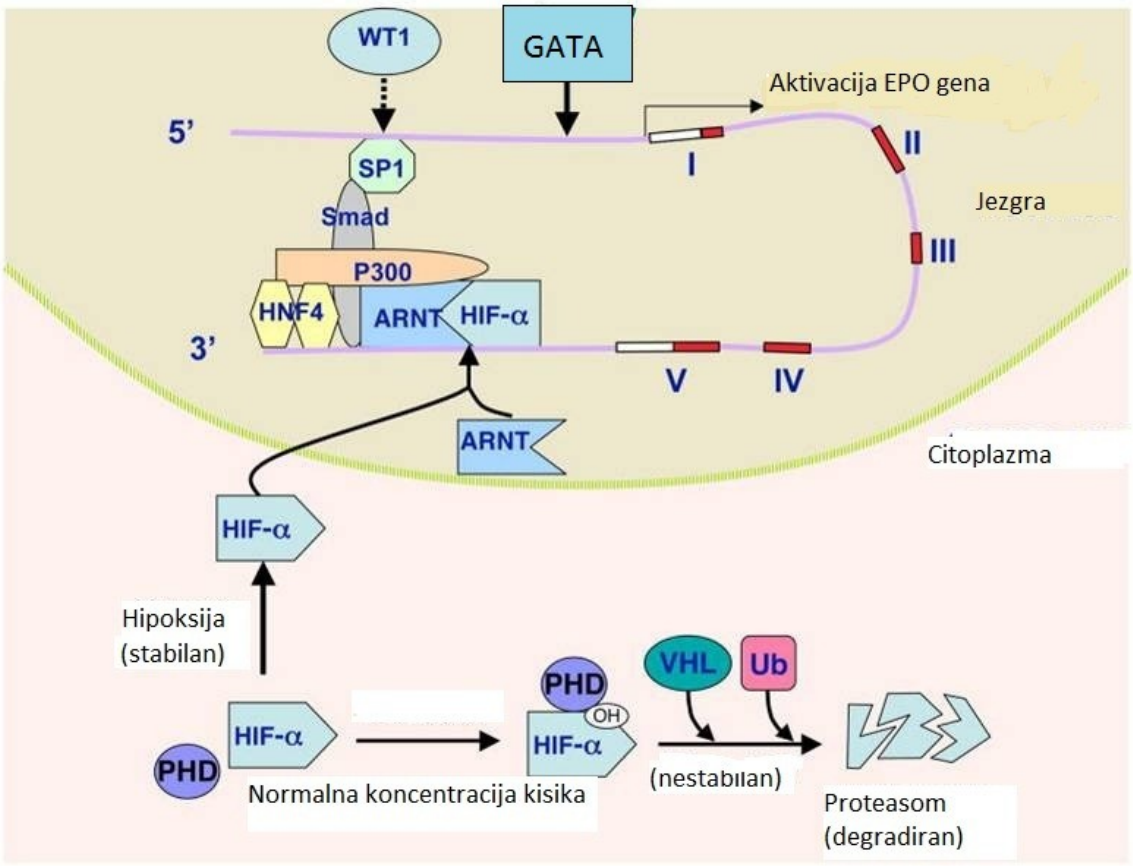
Eritropoeza je sporo djelujući proces. Potrebna su 3-4 dana nakon porasta koncentracije EPO u plazmi kako bi došlo do vidljivog porasta broja retikulocita.

EPO je esencijalan za eritrocitopoezu, no njegovo je djelovanje potaknuto od strane nekoliko različitih hormona, testosterona, somatotropina i *IGF-1 (engl. insulin like growth factor-1)*. Viša koncentracija hemoglobina i broja eritrocita u muškaraca nego u žena objašnjava se stimulacijom eritropoeze adrogenima, dok ju estrogeni inhibiraju [14]. Smatra se da EPO ima citoprotektivan učinak na više nehematopoetskih tkiva, uključujući mozak, srce, bubrege i krvne žile [18,19]. Neki autori smatraju da je učinak EPO na neeritroidne stanice posredovan heterotrimeričnim receptorom koji se sastoji od dijela EPOR *(engl. erythropoietin receptor)* u kompleksu s dimerom zajedničkog citokinskog receptora, njegove beta podjedinice (βc-R). Ideja o EPOR/βc-R je temeljena na opažanjima da derivati i analozi EPO koji nisu aktivni u eritropoezi omogućuju zaštitu tkiva u životinjskim modelima [20].
Obzirom da je EPO neophodan za konačno diferenciranje eritroidnih prastanica, miševi kojima nedostaje EPO ili EPOR, normalno stvaraju krvotvornu prastanicu koja stvara eritroidnu koloniju (BFU-E *eng. burst forming units erythroid*) i CFU-E, no ne uspijevaju ih diferencirati u zrele eritrocite [21]. I *EPO -/- i EPOR -/-* mutacije su letalne u fazi embrija zbog nemogućnosti konačne eritropeze (fetalna jetra). Ipak, eritropoeza u žumanjčanoj vreći je tek djelomično oštećena, što upućuje na prisutnost populacije eritroidnih prastanica stanica kojima nije potreban EPO za konačnu diferencijaciju [11, 12].

1.2.1.3 Molekularni mehanizmi ekspresije EPO potaknuti hipoksijom

Većina dosadašnjih spoznaja o stvaranju EPO potaknutim receptorima osjetljivim na kisik temeljeni su na *in vitro* istraživanjima koristeći linije ljudskih hepatocita (Hep3B i HepG2). No mehanizam ekspresije EPO u bubrezima i jetri se razlikuje. Stanice bubrega reagiraju na hipoksiju po principu "sve ili ništa" [22] dok hepatociti reagiraju stupnjevito. Čini se da regulacija ekspresije EPO u jetri i bubregu zahtijeva različite, susjedne dijelove gena koji su smješteni neposredno uz 3' kraj za jetru i 6-14kb 5' za bubreg [23]. Promotor gena za EPO suprimiran je od strane već spomenutog *GATA-2* transkripcijskog čimbenika u uvjetima normooksije, no u uvjetima hipoksije dolazi do smanjenja koncentracije *GATA-2* [24]. Najvažnija je aktivacija EPO promotora hipoksijom induciranim čimbenicima rasta *(HIF, engl.*

hypoxia inducible transcription factor). Sastoje se od nestabilne alfa- podjedinice *(HIF- α)* ovisne o koncentraciji kisika i beta- podjedinice *(HIF- β)*. Iako je prototip *HIF-1* otkriven 1992. [25], kasnija su istraživanja otkrila i *HIF-2*, poznat i kao *EPAS1 (engl. endothelial PAS domain-containing protein 1)*, kao primarni transkripcijski čimbenik koji potiče ekspresija EPO [26]. Zanimljiv je nalaz kako *HIF-2* podrijetlom iz hepatocita sudjeluje u regulaciji gena uključenih u metabolizam željeza, potvrđujući time ulogu *HIF-2* u koordinaciji sinteze EPO s homeostazom željeza [27]. C kraj *HIF-α* sadrži o kisiku ovisnu nestabilnu domenu koja u prisutnosti kisika hidrolizira. Reakcija je katalizirana sa specifičnom prolil-4-hidroksilazom kojoj je kofaktor Fe^{2++} *(PHD, engl. prolil hydroxylases)* koja prenosi jedan atom kisika na prolil. Hidroksilirana *HIF-α* se veže s von Hipel Lindau *(VHL, engl. von Hipel Lindau)* proteinom i dolazi do razgradnje u proteasomima (Slika 2) [17].



Slika 2. Hipoksijom inducirana ekspresija EPO. Prilagođeno prema [22]

Kako su *PHD-2* i *PHD-3* pod povratnom spregom *HIF* proteina, porast njihove ekspresije dovodi do sniženja nivoa *HIF-α* za vrijeme dugotrajnije hipoksije [28]. Ova povratna sprega može objasniti smanjeno stvaranja EPO u stanju kronične anemije ili dugotrajnog boravka na visokim nadmorskim visinama. Nadalje, transkripcijska aktivnost *HIFa* potisnuta je hidroksilacijom *HIF-α* podjedinice i njezinom degradacijom nakon vezanja s *VHL* proteinom. Ova je reakcija posredovana čimbenicima koji inhibiraju *HIF-1 (FIH-1, engl. factor inhibiting HIF)*, još jednom dioksigenazom koja zahtijeva Fe^{++} [29]. Prema istraživanjima *in vitro*, srednje vrijednosti koncentracije kisika za *PHD-3* su kod pO_2 arterijske krvi oko 170 mmHg, pri čemu *FIH-1* djeluje pri nižim koncentracijama od oko 60 mmHg. Stoga se čini kako su *HIF-α PHD* primarne kontrolne točke za stvaranje EPO ovisno o kisiku [30]. Otkriće da je Fe^{++} potreban za degradaciju *HIF-α*, može objasniti povišenu koncentraciju EPO u bolesnika liječenim deferoksaminom.

1.2.1.4 Sistemski učinci

Primarne funkcije EPO su održavati koncentraciju eritrocita i hemoglobina stabilnom iz dana u dan, te ubrzati oporavak broja eritrocita nakon krvarenja. Za primjerenu funkciju EPOa dovoljne su njegove niske koncentracije u organizmu. Bazalne koncentracije EPO u plazmi zdravih pojedinaca nalaze se u rasponu od 4-36 IU/L. Razine mogu značajno varirati, ali značajna razlika između spolova ili dobi ispitanika nije nađena. EPO ima diurnalni ritam izlučivanja s maksimumom u jutarnjim satima [14].

Akutni gubitak oko 500 mL krvi ne dovodi do značajnog povećanja koncentracije EPO u muškaraca, već pad koncentracije hemoglobina ispod 125 g/L dovodi do eksponencijalnog porasta u osoba koje ne boluju od KZB ili nekog drugog upalnog procesa [31]. Porast je u početku izrazito brz s naglim padom neposredno prije normalizacije koncentracije hemoglobina (Hb) u krvi. Mehanizam naglog pada nije u potpunosti jasan, ali se može djelomično objasniti sniženim koncentracijama *HIF-α* u uvjetima dugotrajne hipoksije [32]. Treba imati na umu da koncentracija EPO u plazmi ne ovisi samo o njegovoj proizvodnji nego i o uklanjanju iz organizma. Istraživanja provedena *in vitro* pokazala su da se EPO uklanja iz tijela putem svojih ciljnih stanica [33]. Prema tome, anemični bolesnici s hipoplazijom koštane srži imaju iznimno visoke koncentracije EPO u plazmi (>10000 IU/L) u odnosu na oboljele od hemolitičke anemije.

Kako je stvaranje EPO ovisno o oksigenaciji tkiva, ekspresija EPO se aktivira i kada dolazi do pada arterijskog tlaka kisika ili kada afinitet krvi za kisik poraste. Na povišenim nadmorskim visinama vrhunac stvaranja EPO postiže se za 1-2 dana, nakon čega pada na novu razinu koja je oko dva puta viša od bazalne [34]. Kako je već navedeno, razina *HIF-α* se smanjuje u uvjetima dugotrajne hipoksije, no pad u produkciji EPO u tom slučaju može biti povezan i sa smanjenjem afiniteta krvi za kisik nastalog zbog povećane koncentracije 2,3-difosfoglicerata u eritrocitima. Prehrambeni čimbenici kao što su nizak unos bjelančevina, isključeni su kao mogući uzrok padu sinteze EPO na visokim nadmorskim visinama u istraživanju provedenom na sezonskim radnicima u Čileanskim Andama [34]. Kako se istraživanja o ekspresiji EPO ne mogu raditi na ljudima, ostaje pitanje o smanjenju koncentracije EPO od strane povećanog broja eritroidnih preteča ovisnih o EPO.

Smještaj stanica koje eksprimiraju EPO u kori bubrega vrlo je povoljna za dobru regulaciju njegovog stvaranja: konstantan je omjer protoka krvi i potrošnje kisika. Tlak kisika u korteksu bubrega se vrlo malo mijenja u ovisnosti o srčanom izbačaju i protoku krvi, jer pad potrošnje kisika u bubregu ovisi o padu glomerularne filtracije (GF). U modelu na štakorima bilo je potrebno smanjenje protoka kroz bubreg za barem 50% da bi došlo do porasta stvaranja EPO [35].

Uloga angiotenzina II

Signal koji dovodi do povećanog stvaranja eritrocita nakon krvarenja povezan je sa signalima kojim se zadržava sol i voda od strane renin–angiotenzin sustava *(RAS, eng. renin angiotensin system)* [36]. Angiotenzin II čini se stimulira eritropoezu na 2 načina: 1. stimulira proizvodnju EPO uglavnom preko angiotenzin II-1 receptora *(AT_1R, eng. angiotensin 1 receptor)* na bubrežnim stanicama koje svaraju EPO [53], 2. čimbenik je rasta za mijeloidne eritrocitne preteče [17]. Ostaje pitanje da li angiotenzin II stimulira proizvodnju EPO direktno ili indirektno smanjujući bubrežnu opskrbu kisikom, odnosno nezadavoljavajući potrebe za potrošnjom kisika.

1.2.1.5 Učinci na nehematopoetska tkiva

Eritropoetin i endotel krvnih žila

Dostupnost rekombinantnog EPO kao laboratorijskog pripravka omogućilo je istraživanje njegovog učinka u nehematopoetskim tkivima. Tretiranjem kultura endotelnih stanica EPO-om potiče se ekspresija *JAK2 (engl. Janus kinases 2)*, stvaranje metaloproteinaze matriksa 2 i zamjećuje stvaranje žilnih struktura. EPO također štiti kulture endotelnih stanica od ozljede uzrokovane anoksijom [37,38]. Endotelne stanice eksprimiraju endotelnu dušik oksid sintazu *(eNOS/NOS3, engl. endothelial nitric oxide sintase)* koja stvara dušikov oksid *(NO)* kojim se regulira tonus krvnih žila, krvni tlak i homeostaza protoka krvi. Istraživanje utjecaja EPO i hipoksije u kulturama endotelnih stanica pokazalo je da EPO povećava broj EPOR, što je značajno izraženije u uvjetima hipoksije. Također, kombinacija EPO i hipoksije povećava sposobnost endotelnih stanica da stvaraju NO stimulacijom *eNOS/NOS3* što može objasniti nešto više koncentracije hemoglobina kod hipertenzivnih bolesnika [38]. Istraživanja na životinjama daju dokaze da EPO potiče stvaranje NO *in vivo*. Liječenje inhibitorima NO sintaze, L-NAME *(eng. N-nitro-L-arginin metil ester)*, dovelo je do vazokonstrikcije, hipertenzije i smrti. No sama eritrocitoza bez povišenog EPO nije povezana s povećanim stvaranjem NO. Bolesnici s policitemijom i niskom razinom EPO nisu imali vazodilataciju ovisnu o endotelu u odgovoru na acetilkolin, no odgovorili su na hemodiluciju [39]. Ovi bolesnici ostaju osjetljivi na NO i pokazuju dilataciju plućnih krvnih žila nakon udisanja NO.

Eritropetin i srčanožilni sustav

U srcu se EPOR otkriva u sredini gestacije i opstaje sve do odrasle dobi. Miševi s ciljanom delecijom EPO ili EPOR pokazuju apoptozu endokarda i miokarda, hipoplaziju klijetki i smanjenje proliferacije srčanih mišićnih stanica u embrionalnom razvoju [40]. Stoga endogeni EPO može pridonijeti održavanju miokarda ili obnovi u glodavaca, što ukazuje na mogući kardioprotektivni učinak egzogeno primjenjenim EPO [17]. Životinjski modeli ishemije srca ili ishemijske reperfuzijske ozljede dokazuju kardioprotektivni učinak EPO. U zečeva, injekcija EPO na početku trajne okluzije koronarne arterije smanjila je veličinu infarkta i veličinu lijeve klijetke (LV), te poboljšala volumen izbačaja LV [41]. Nakon ishemijske reperfuzijske ozljede

miokarda u štakora, EPO ubrizgavan intraperitonejski kroz 7 dana smanjio je gubitak srčanih mišićnih stanica za 50% [42]. Miokardioprotektivni učinak EPO može biti posljedica direktnog antiapoptotskog učinka na srčane mišićne stanice i/ili indirektnog EPO odgovora endotelnih stanica u srcu. U miševa je liječenje EPO-om započeto 3 tjedna nakon podvezivanja koronarne arterije, kao modela kroničnog srčanog zatajivanja, potaknulo mobilizaciju endotelnih progenitornih stanica iz koštane srži, povećalo njihovo nakupljanje u srčanoj mikrovaskulaturi i povećalo ekspresiju vaskularnog-endotelnog čimbenika rasta *(VEGF, engl. vascular endothelial growth factor)* u miokardu te neovaskularizaciju [43]. Stoga kardioprotektivni učinak EPO u glodavaca može biti učinkovit i nakon 24 sata od inzulta i može poboljšati srčanu funkciju u smislu smanjenja veličine infarkta.

Van der Meer i sur. [44] ispitivali su značenje razine EPO i hemoglobina u 74 bolesnika sa stabilnim, blagim do uznapredovalim kroničnim zatajivanjem srca (KZS). Multivarijantne analize pokazale su da su plazmatske razine EPO i Hb neovisni pokazatelji preživljenja bolesnika za KZS. Silvenberg i sur. [45] ispitali su učinak EPO u 32 bolesnika sa srednje do teškim KZS koji su imali ejekcijsku frakciju LV<40%, usprkos maksimalnoj dozi lijekova. Koncentracija Hb bila je između 100 i 115 g/L. Ispitanike su podijelili u dvije grupe po 16 bolesnika, od kojih su jedne liječili s EPO i intravenskim preparatom željeza, kako bi povisili Hb do 125 g/L, dok bolesnici iz druge gruoe nisu liječeni zbog anemije. Tijekom 8.2 ± 2.6 mjeseci, umrla su 4 bolesnika kod kojih nije liječena anemija, a niti jedan iz prve grupe liječenih. Do poboljšanja KZS došlo je u 42.1% ispitanika liječenih s EPO i željezom, a u 5.5% ih se povećala ejekcijska frakcija LV. U 51.3% bilo je moguće smanjiti dozu diuretika bez promjene serumskog kreatinina. U anemičnih ispitanika koji nisu liječeni s EPO i željezom došlo je do daljnjeg pogoršanja srčane i bubrežne funkcije, povećala se potreba za diureticima i broj dana bolničkog liječenja. Namiuchi i sur. [46] u prospektivnom su istraživanju ispitali učinak koncentracije endogenog EPO na ishod uspješne primarne perkutane koronarne intervencije (PKI) nakona akutnog infarkta miokarda (AIM). Istraživanjem su obuhvatili 101 bolesnika a koncentracija endogenog EPO određena je unutar 24 sata od AIM i prije primarne PKI. Vršne i kumulativne vrijednosti kreatin kinaze bile su bitno niže u grupi ispitanika s višom koncentracijom EPO u plazmi. Autori su utvrdili da je apsolutna koncentraija EPO u plazmi jedan od nezavisnih čimbenika koji upućuju na veličinu infarkta i kumulativne koncentracije kreatin kinaze, što se može objasniti zaštitnim učincima EPO na ishemijsko-reperfuzijsku ozljedu.

Eritropoetin i živčani sustav

U uvjetima hipoksije povećava se ekspresija EPO u mozgu i leđnoj moždini. Lokalno proizveden EPO može imati dvije funkcije: 1. direktni zaštitni učinak na živčane stanice tijekom ishemije mozga i 2. indirektnu zaštitu putem povećane angiogeneze uzrokovane VEGF-om i drugim čimbenicima rasta čije stvaranje potiče hipoksija, te posljedičnim povećanjem dotoka krvi [47]. Neuroprotektivni učinak EPO ovisi o aktivaciji JAK2 koji aktivira EPOR te izraženosti anti-apoptotičkih gena koja je posredovana NFkβ *(engl. nuclear factor kappa β)*. U jednom istraživanju liječenje s EPO poboljšalo je kliničko stanje bolesnika s multiplom sklerozom [48]. U drugom je kod 39 bolesnika sa shizofrenijom liječenje s EPO dovelo do poboljšanja kognitivnih funkcija [49]. Postignuti su i ohrabrujući rezultati u bolesnika s moždanim udarom koji su intravenski dobili visoku dozu EPO (33000 IJ) jednom dnevno tijekom 3 dana unutar 8 sati od početka događaja. Bolesnici koji su liječeni s EPO imali su manje moždano oštećenje i bolje kratkoročno preživljenje u odnosu na one koji nisu dobili lijek [50].

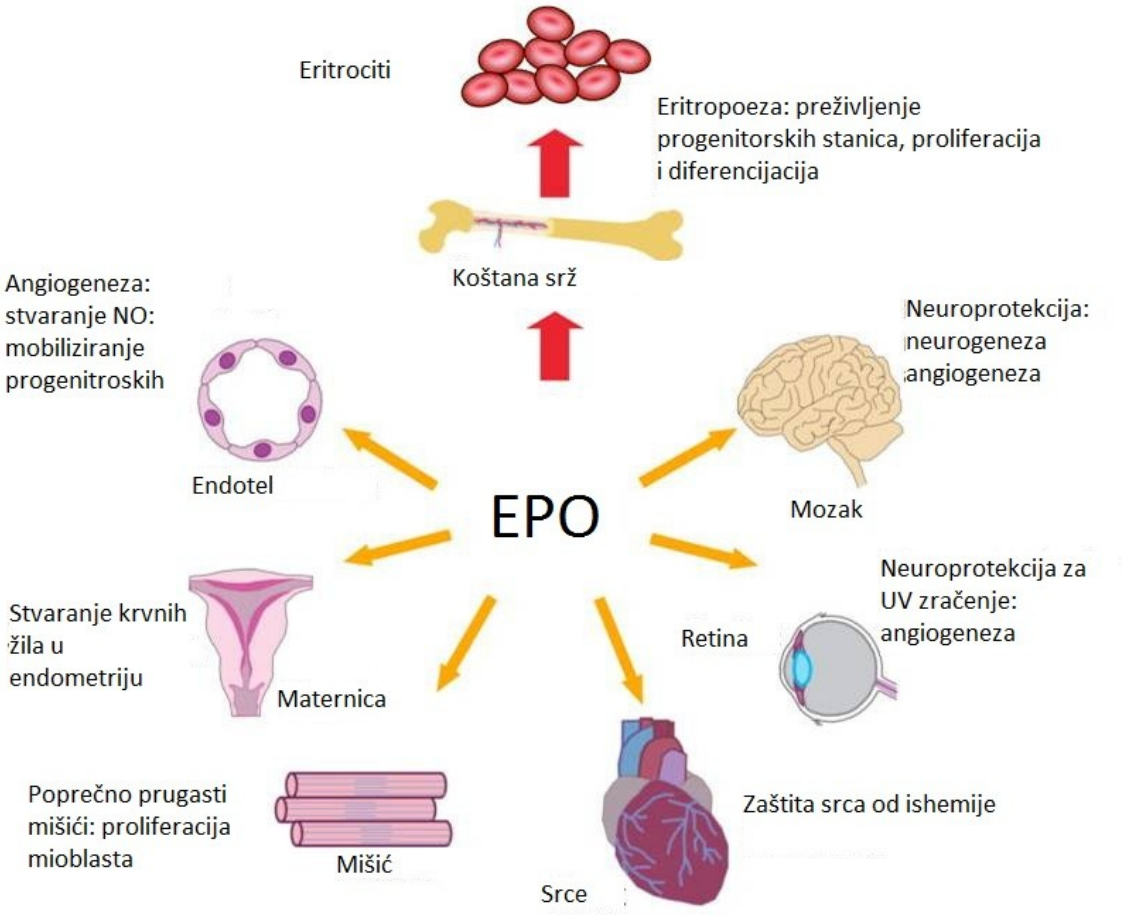
Eritropoetin i krvne žile

Mnoge studije su pokazale da EPO može djelovati na stijenku krvnih žila vežući se za lokalne receptore. EPO potiče procese obnavljanja u krvnim žilama. De Groot i sur. [51] su ispitivali da li uremija utječe na broj endotelnih progenitornih stanica iz (*EPC, engl. endothelial progenitor cell)* koštane srži. Određivali su broj cirkulirajućih CD34+ hematopoetskih prastanica u punoj krvi primjenom protočne citometrije i EPC (*in vitro* esej) u 46 bolesnika s uremijom i uspoređivali sa zdravim osobama odgovarajućeg spola. Učinke uremije na diferencijaciju EPC ispitivali su *in vitro* i *in vivo*. U bubrežnih bolesnika i u zdravih osoba broj EPCs bio je u značajnoj vezi s apsolutnim brojem CD34+ hematopoetskih prastanica. Međutim, u bolesnika s uremijom zabilježen je značajno manji broj EPCs nego u zdravih osoba. Pokazalo se da uremični serum značajno inhibira diferencijaciju i funkcijsku aktivnost EPCs *in vitro*. Zabilježeno je i značajno povećanje broja EPCs nakon smanjenja uremije, a zbog početka liječenja dijalizom. Autori su zaključili da uremija inhibira diferencijaciju EPCs i da na taj način oštećuje mehanizme srčanožilnog oporavka u bolesnika s uremijom. U bolesnika s KZB prisutna je i disfunkcija endotela i pojačani oksidativni stres, a čini se da EPO ima antioksidativno svojstvo i

proangiogeno djelovanje na endotelne stanice, potiče njihovu proliferaciju, migraciju i stvaranje kapilara u angiogenetskom mediju na ljudskom tkivu srčanog mišića *in vitro* [17, 51].

Eritropetin i bubreg

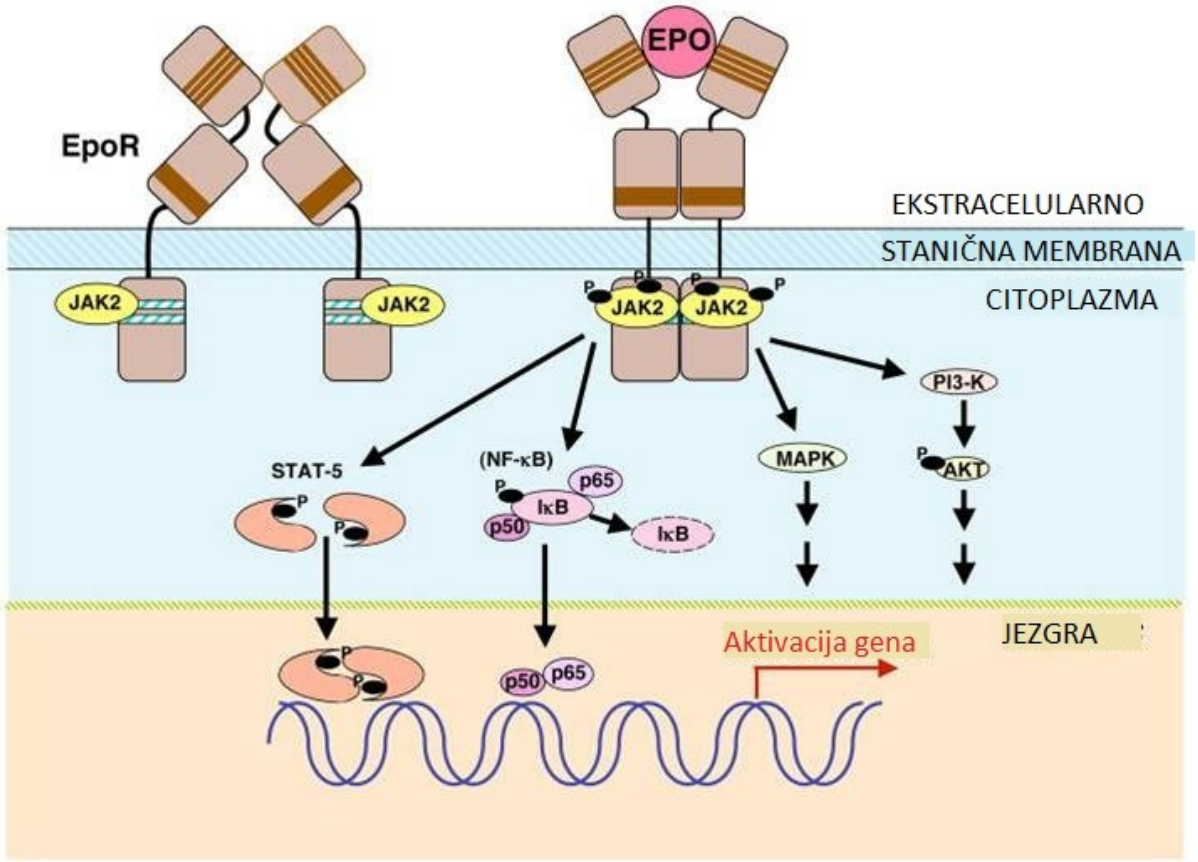
Najnovija epidemiološka i klinička istraživanja pokazala su da se liječenjem bubrežne anemije EPO-om u bolesnika koji su u ranom stadiju KZB može usporiti napredovanje bubrežnog oštećenja i odložiti početak dijalize [52], a od ranije je poznato da rani ispravak anemije u bubrežnih bolesnika može spriječiti ili usporiti nastanak hipertrofije lijeve klijetke, odnosno usporiti aterosklerozu [53].



Slika 3. Učinci EPO na nehematopoetska tkiva. Prilagođeno prema [17]

1.2.2 Građa i aktivacija receptora za eritropoetin

Ljudski receptor za eritropetin je glikoprotein od 484 aminokiseline od 60 kDa, koji pripada članovima receptorske klase I citokinske obitelji i stvara homodimere. Izvanstanični dio sastoji se od kratke α uzvojnice koju slijede dvije β nabrane ploče koje se sastoje od 7 lanaca. EPOR nema intrinzičnu tirozinsku domenu, te je aktivacija nereceptorske *JAK2* tirozin kinaze od esencijalne važnosti za aktivaciju receptora [17]. Pri vezanju EPO za EPOR dolazi do promjene konformacije receptora koja približava citoplazmatske jedinice, a time i *JAK2* bjelančevine te dolazi do aktivacije citoplazmatske *JAK2* koja katalizira fosforilaciju tirozinaza raznih enzima i transkripcijskih čimbenika (Slika 4.).



Slika 4. Signalni put aktivacije EPOR. Prilagođeno prema [17]

Vezanje EPO na svoj homodimerni receptor dovodi do promjene njegove konformacije i transfosforilacije vezane tirozin kinaze *JAK2*. Njihova aktivacija dovodi do fosforilacije EPOR i prijenosnika signala i aktivatora transkripcije *(STAT, engl. signal transducer and activator of transcription).* Aktivirani STAT se dimerizira i prebacuje u jezgru kako bi potaknuo specifičnu transkripciju gena. *JAK2* također aktivira i druge signalne puteve uključujući fosfonozitid 3-kinaze (*PI3K/AKT, engl. phosphatidylinositide 3-kinases)*, mitogen-aktiviranu protein kinazu *(MAPK)*, i *NFκB* (p50 i p65) u nehematopoetskim stanicama.
Četiri od 5 cisteinskih jedinica receptora u izvanstaničnom dijelu isti su i nalaze se i u receptorima velike citokinske obitelji koji uključuju receptore za interleukine 2, 3 i 4 *(engl. IL-2, IL-3, IL-4)*, prolaktin i trombopoetin [54].

EPO djeluje vezanjem za svoj receptor smješten na površini eritroidnih prastanica kako bi potaknuo preživljenje stanica te proliferaciju i diferencijaciju do eritroidne loze. EPOR je slabo izražen na ranim eritroidnim progenitorskim stanicama *BFU-E*. Potom se za vrijeme eritroidne diferencijacije izražaj na eritroidnim progenitornim stanicama do stadija *CFU-E* povećava deseterostruko i više. Vezanjem EPO za eritroidne prastanice povećava se ekspresija EPOR koji povratnom spregom povećava odgovor na EPO kao i ekspresiju specifičnih čimbenika transkripcije kao što su *GATA-1, SCL/TAL1 i EKLF, (engl. erythroid kruppel-like factor)*. Za vrijeme kasne eritropoeze ekspresija EPOR se smanjuje, a EPO više nije potreban za preživljavanje stanica [17]. Aktivnost EPO u hematopoetskim tkivima ukazuje da njegovo učinkovito signaliziranje ovisi o razini ekspresije EPOR na površini stanice kao i o koncentraciji EPO. Ekspresija EPOR nalazi se i u endotelnim, živčanim, mišićnim, srčanožilnim tkivima [18].Točan mehanizam regulacije ekspresije EPOR u različitim vrstama tkiva nije do kraja razjašnjen.

1.2.3 Interleukin 3

Interleukin 3 *(IL-3)* je pleiotropni čimbenik koji može stimulirati proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica kao i velik broj drugih progenitora specifičnih za pojedinu lozu [55,56].

Prvi je puta izoliran i opisan na osnovi svoje mogućnosti da inducira stvaranje enzima 20-steroid dehidrogenaze u mišjim stanicama slezene [57]. Kako se nastavilo kloniranje i daljnje proučavanje, postalo je jasno da je *IL-3* bio i ranije poznat, ali kao čimbenik rasta mastocita (*MCGF, engl. mast cell growth factor*), P stanični stimulirajući čimbenik *(engl. P-cell stimulating factor)*, čimbenik rasta hematopoetskih stanica (*HCGF, engl. hematopoietic growth factor),* čimbenik koji stimulira više kolonija *(multi-CSF)*, thy-1 inducirajući čimbenik i čimbenik rasta WEHI-3 stanica. *IL-3* se povezuje s više hematopoetskih i nehematopoetskih tipova stanica kao što su aktivirani ljudski T limfociti, NK stanice, mastociti, neuroni i astrociti [58].

Slijed nukleotida za ljudski *IL-3* dovodi do stvaranja polipeptida koji se sastoji od 133 aminokiseline i 19 signalnih sekvenci. Prirodni ljudski *IL-3* pročišćen iz Jurkat stanica je glikozilirani protein s molekularnom masom 14.6 do 30 kDa ovisno o količini glikozilacije [59]. Gen za *IL-3* nalazi se na petom kromosomu i usko je povezan s genima za *IL-4, IL-5 i GM-CSF*. Na nivou aminokiselina samo je 29% homolognosti između mišjeg i ljudskog *IL-3* [60]. Obzirom na ovakav manjak sličnosti, proteini su specifični za vrstu u svom djelovanju [54]. *IL-3* ima dokazanu aktivnost *in vitro* kako u hematopoetskim tako i u ne hematopoetskom sustavu.

Dokazano je kako *IL-3* samostalno, ili djelujući sinergistično s drugim rano djelujućim hematopoetskim čimbenicima rasta, uključujući IL-*1, IL-6, SCF, G-CSF, MGDF i Flt-3 ligand*, može podržavati ploriferaciju pluripotentne hematopoetske matične stanice i progenitorskih stanica različitih linija [61, 62]. *IL-3* se često nalazi kao dio citokinskih mješavina koje se koriste za poticanje *ex vivo* ekspanzije ljudskih CD34+ hematopoetskih matičnih stanica, iako neke studije upućuju kako *IL-3* može inhibirati repopulacijski potencijal ovih stanica [63]. Uz njegov utjecaj na hematopoetske stanice, *IL-3* može stimulirati proliferaciju i motilitet ljudskih endotelnih stanica [64]. Također se pokazao kao neurotropni čimbenik koji ima sposobnost potaknuti preživljenje neurona te pojačati rast neurita [65].

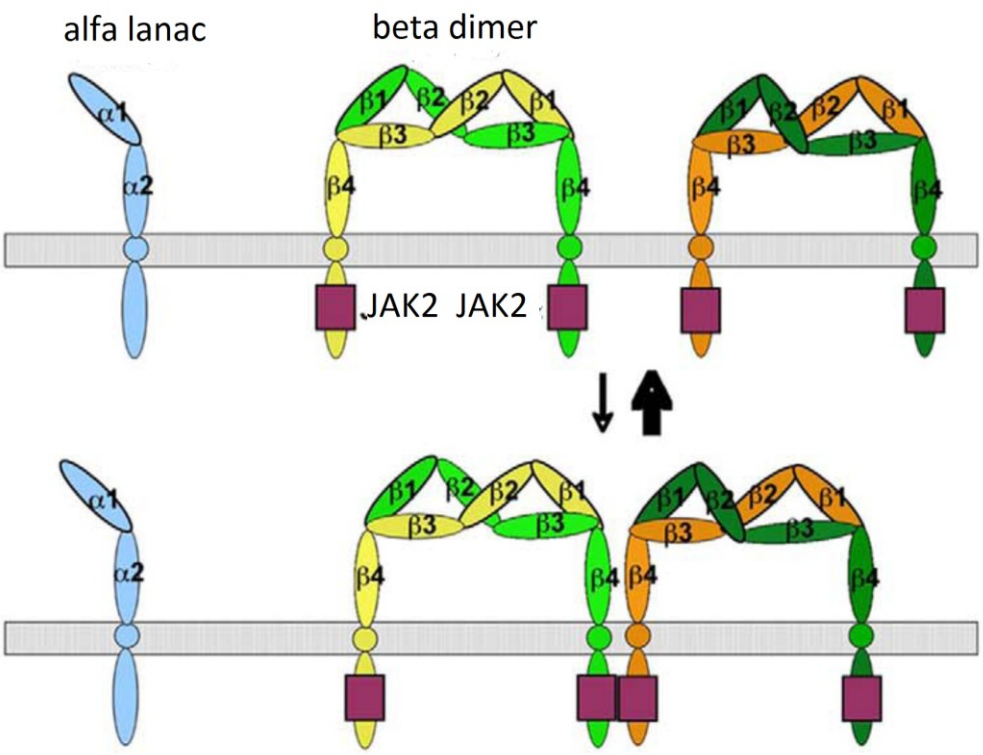
Uloga *IL-3* je proučavana u uvjetima *in vivo* koristeći se knock out miševima, no ipak nije u potpunosti razjašnjena obzirom da su miševi s manjkom *IL-3* vitalni uz iznenađujuće normalnu hematopoezu. Čini se kako *IL-3-/-* miševi imaju oštećen razvoj mastocita i bazofila uz smanjenu otpornost prema parazitima kao i oslabljene kasne reakcije hipersenzitivnosti [66].

Sve češće ga se spominje kao kofaktor u patogenezi nekoliko kroničnih upalnih bolesti, prvenstveno astme [67]. Javljaju se i prva istraživanja u smjeru ciljane blokade dijelova zajedničke beta podjedinice *IL-3, IL-5 i GM-CSF* kako bi se smanjila funkcija pojedinog citokina ovisno o njegovoj ulozi u patogenezi bolesti, posebno astme [68 69].

1.2.4 Građa i aktivacija receptora za interleukin 3

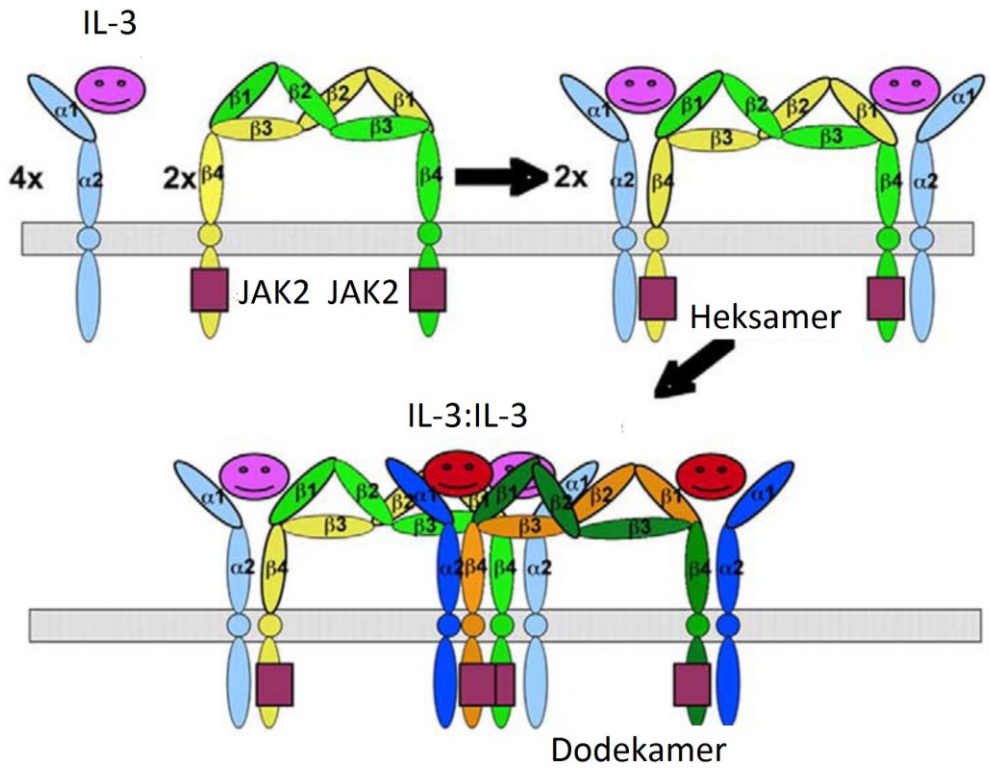
IL-3 postaje biološki aktivan vezanjem za svoj heterodimerni transmembranski receptor koji se sastoji od alfa podjedinice koja je ligand specifična *(IL-3Rα)* i zajedničke beta podjedinice (βc) [54]. βc podjednica zajednička je receptoru za *IL-5 i GM-CSF*. *IL-3 Rα* podjedinica ima slab afinitet za *IL-3* no u kombinaciji s βc podjednicom stvara funkcionalan, visoko afinitetni receptorski kompleks. Primarni čimbenik u prijenosu signala je upravo βc podjednica [54,70]. No razlike u prijenosu signala u istom staničnom sistemu ovisno da li na njega djeluje *IL-3, GM-CSF,* i *IL-5*, kao i promijenjeni odgovori stanice ovisno o mutaciji alfa podjedinice govore u prilog njenoj važnoj ulozi u provođenju signala [71].

Niti jedna podjedinica *IL-3*R nema intrinzičnu aktivnost kinaze (kao i EPOR), već tek nakon vezanja liganda i heterodimerizacije dolazi do višestruke fosforilacije receptora te kaskadne aktivacije velikog broja efektorskih molekula kao što su *JAKs, STATs, PI-3 kinaze, NF-kB, Src, Rac, Ras i MAP* kinaze (Slika 5a i b) [72].



Slika5a. Aktivacija receptora za *IL-3*. Prilagođeno prema [73]

U odsutnosti citokina, podjedinice receptora su odvojene na staničnoj površini, dok beta dimer, koji veže JAK2 kinazu kroz citoplazmatsku regiju, stvara prolazni tetramer koji svojim približavanjem povezuje JAK2;



Slika 5b. Aktivacija receptora za *IL-3*. Prilagođeno prema [73]

U prisutnosti *IL-3*, citokin i receptor formiraju dodekamer koji je stabiliziran u interakciji *IL-3:IL-3* te dovodi do prijenosa signala aktiviranjem *JAK2* kinaze i transfosforilacije

1.3 FIZIOLOGIJA I PATOFOZIOLOGIJA HEMATOPOETSKOG SUSTAVA

Kvantitativna i kvalitativna analiza krvnih stanica vrlo je važna jer je jednostavno dostupan indikator poremećaja organa iz kojeg su nastale ili u kojem se uništavaju. Tako nam poremećaji eritrocitne, granulocitne ili trombocitne loze daju uvid u funkciju koštane srži, kao što nam poremećaji limfatičnih stanica pomažu u donošenju zaključaka o limfnim čvorovima, slezeni i drugim limfatičnim organima. Sve krvne stanice nastaju iz zajedničke pluripotentne matične stanice. Pod utjecajem lokalnih i humoralnih čimbenika, matične se stanice diferenciraju u različite stanične linije [74].

Glavna obilježja matičnih stanica *(SC, engl. stem cells*) jest sposobnost održavanja ravnoteže između samoobnavljanja i diferencijacije, te sposobnost stvaranja velikog broja stanica specijaliziranih za određenu funkciju [75, 76]. Općenito, matične se stanice dijele u tri glavne skupine: totipotentne, pluripotentne i multipotentne matične stanice [75].

Iz totipotentne matične stanice nastaju sve stanice u tijelu, a primjer za to jest oplođeno jajašce. Pluripotentne matične stanice mogu stvoriti stanice svih triju zametnih listića (mezoderm, endoderm i ektoderm), a primjer za to su stanice izdvojene iz embrija i fetalnih tkiva. Multipotentne matične stanice, kao što su npr. krvotvorne matične stanice koštane srži, imaju uži razvojni potencijal, i daju specijalizirane stanice (npr. stanice svih krvotvornih loza). O vrsti specifičnog čimbenika rasta kolonija ovisi koje će se prastanice umnažati i kakve će kolonije nastati (74).

Nakon faze multipotentne matične stanice eritrocitopoeza i trombocitopoeza nastavljaju sazrijevanje neovisnim smjerom, dok su monocitopoeza i granulocitopoeza usko vezane u daljnjoj diferencijaciji.

Funkcija krvnih stanica

Neutrofili (sa segmentiranom jezgrom) služe uglavnom za obranu od bakterija. Najčešće izvan krvožilnog sustava, u tkivima u kojima postoji upalni proces, oni fagocitiraju i liziraju bakterije. Eozinofilni granulociti su obrana protiv parazita. Imaju direktno citotoksično djelovanje.

Također imaju ulogu u regulaciji reakcija u anafilaktičkom šoku i autoimunom odgovoru jer kontroliraju utjecaj bazofila. Bazofilni granulociti i njihovi tkivni ekvivalenti (tkivni mastociti) sudjeluju u otpuštanju tvari kao što su histamin, serotonin i heparin. Ovi tkivni hormoni povećavaju vaskularnu propusnost i time omogućuju ulazak ili izlazak upalnih stanica iz ili u tkiva. Tromobociti stvaraju ugruške koji zajedno s humoralnim koagulacijskim faktorima zatvaraju oštećenja na krvnim žilama. Također otpuštaju čimbenike koji dalje sudjeluju u procesu zgrušavanja [77].

Eritrociti su nosači kisika za sve metaboličke reakcije ovisne o kisiku. Oni su jedine krvne stanice bez jezgre. Njihov bikonkavni izgled omogućuje im optimalnu plastičnost prilikom prolaska kroz krvne žile.

U normalnim uvjetima postoji kvantitativna i kvalitativna ravnoteža između svih krvnih stanica što je regulirano izlučivanjem humoralnih čimbenika. Također se javlja i kompenzatorno povećanje u sintezi stanica koje je potaknuto njihovim gubitkom ili povećanom potrebom za njima. Tako se npr. javljaju preteče eritrocita s jezgrom kod gubitka krvi [78] ili kod povećanih potreba za kisikom, ili pak zbog manjka pojedinih metabolita (u fazi oporavka, npr. za vrijeme nadoknade preparata željeza ili vitamina). Nedostatak metabolita kao patogeni poticaj najprije i najčešće zahvaća eritrocitnu lozu. Iako mogu biti zahvaćene i ostale stanice, eritrociti su zbog svoje najbrže produkcije najranjivije stanice na manjak metabolita. Nedostatak željeza brzo dovodi do sniženja hemoglobina u eritrocitima dok će manjak vitamina B12 i/ili folne kiseline rezultirati u složenim poremećajima u sintezi stanica. Konačno će ove promjene utjecati i na ostale stanične loze [79].

U koštanoj srži se svakodnevno stvara $1.75x10^{11}$ eritrocita i $7x10^{10}$ leukocita, uz mogućnost višestrukog povećanja produkcije u slučaju potrebe.

In vitro se iz prastanica mogu stvarati kolonije diferenciranih stanica. Mijeloidna progenitorna stanica se može diferencirati u megakariocite, vrlo velike, multinuklearne stanice koje se dijele u manje dijelove stvarajući trombocite, u eritroblaste, koji se kasnije umnažaju i diferenciraju u eritrocite, zatim u mijeloblaste koji se diferenciraju u neutrofile, eozinofile i bazofile (imaju segmentiranu jezgru pa se nazivaju polimorfonuklearnim leukocitima), monoblaste (preteče monocita) i dendritičke stanice [80] Granulociti, monociti i dendritičke stanice imaju mogućnost ingestije čestica, mikroorganizama i tekućine u svrhu obrane organizma te se nazivaju fagocitima

(*od grčke riječi ''phago'' = jesti*). Kao odgovor na topive medijatore nazvane citokini, leukociti migriraju iz krvi u tkiva, gdje popravljaju oštećeno tkivo i uklanjaju bakterije, parazite i mrtve stanice koje potiču upalu. Nakon migracije u tkiva, krvni monociti se diferenciraju u makrofage.

Najvažnije stanice imunološkog sustava su limfociti, koji nastaju iz zajedničke prastanice u koštanoj srži. Razlikuju se dvije vrste limfocita: T limfociti, koji su odgovorni za stanični imunološki odgovor i B limfociti, koji stvaraju protutijela (humoralni imunološki odgovor). Treći tip stanica su NK *(engl. natural killer)* stanice, također dio limfatičnog sistema. One su povezane s T limfocitima, ali je njihovo podrijetlo i dalje nepotpuno razjašnjeno obzirom da pokazuju i neke karakteristike mijeloidnih stanica. Najčešći mehanizam uništenja od strane NK stanica jest oslobađanje litičkih granula koje sadrže protein perforin i različite proteaze inducirajući smrt stanice. Osim toga, mogu uništiti i stanice obložene protutijelima [79].

Sve krvne stanice nastaju iz zajedničke, pluripotentne matične stanice koštane srži. Mogu se otkriti u fetalnoj jetri već od 8. tjedna gestacije. Matična stanica daje preteče stanica mijelopoetskog i limfatičnog sustava. Eritrociti, granulociti i trombociti imaju zajedničke prastanice, dok se limfatični sustav rano razvija u specifične stanične linije. Od 13. tjedna gestacije neke matične stanice migriraju u timus i koštanu srž (primarni limfni organi) gdje se nastavljaju umnažati i diferencirati. T limfocitima je potreban prolaz kroz timus za konačno sazrijevanje, dok B limfociti dovršavaju svoj razvoj u koštanoj srži. T limfociti (označeni antigenom CD3) diferenciraju se u dvije subpopulacije ovisno da li na površini nose CD4 ili CD8 antigen. Antigen CD4 obilježava populaciju pomoćničkih T limfocita (Th), a antigen CD8 je karakterističan za populaciju citotoksičnih T stanica (Tc). U timusu se strogo kontroliranim mehanizmima omogućuje preživljenje samo T limfocitima koji preko svojih receptora (*TCR, engl. T cell receptor)* prepoznaju odgovarajuću MHC molekulu (od *eng. major histocompatibility complex*) s kojom stvaraju adekvatnu vezu (čime je omogućeno prepoznavanje stranih antigena) a nisu usmjereni na vlastite antigene. Sve ostale T stanice koje ili ne mogu pomoću svog receptora prepoznati MHC molekulu, a time i npr antigen virusa na površini zaražene stanice koji se prezentira upravo u vezi s MHC molekulom, ili pak stanice koje se prejako vežu te prepoznaju autoantigene kao strane, budu uništene signalom za apoptozu. Za razliku od T limfocita, B limfociti mogu sazrijevati u plazma stanice koje stvaraju veliki broj protutijela [77].

1.3.1 Eritrocitopoeza

Prastanica eritrocita

Prva kolonija u ljudi iz koje će daljnjom diferencijacijom nastati eritrociti je BFU-E koja ima karakterističnu morfologiju ploda duda. U slučaju prisutnosti EPO, u kombinaciji s još jednim čimbenikom stimuliranja kolonija, *SCF, IL-3* ili *GM-CSF*, tada će iz njih nastati subpopulacija stanica nazvana CFU-E iz kojih dalje nastaju proeritroblasti, zatim zreliji eritroblasti i nekoliko enukleiranih retikulocita [81].

U uvjetima *in vitro*, za ovaj je proces potrebno oko 14 dana. Međutim, treba napomenuti da još uvijek nije moguć uzgoj krvotvornih matičnih stanica *in vitro*, te o njihovoj funkcijskoj sposobnosti možemo samo indirektno zaključivati iz nekoliko *in vitro* testova od kojih su najvažnija dva: kratkotrajni uzgoj stanica koštane srži koji služi za procjenu funkcijske sposobnosti krvotvornih prastanica i dugotrajna kultura stanica koštane srži, kao najbolja aproksimacija funkcije krvotvornih matičnih stanica [74, 82].

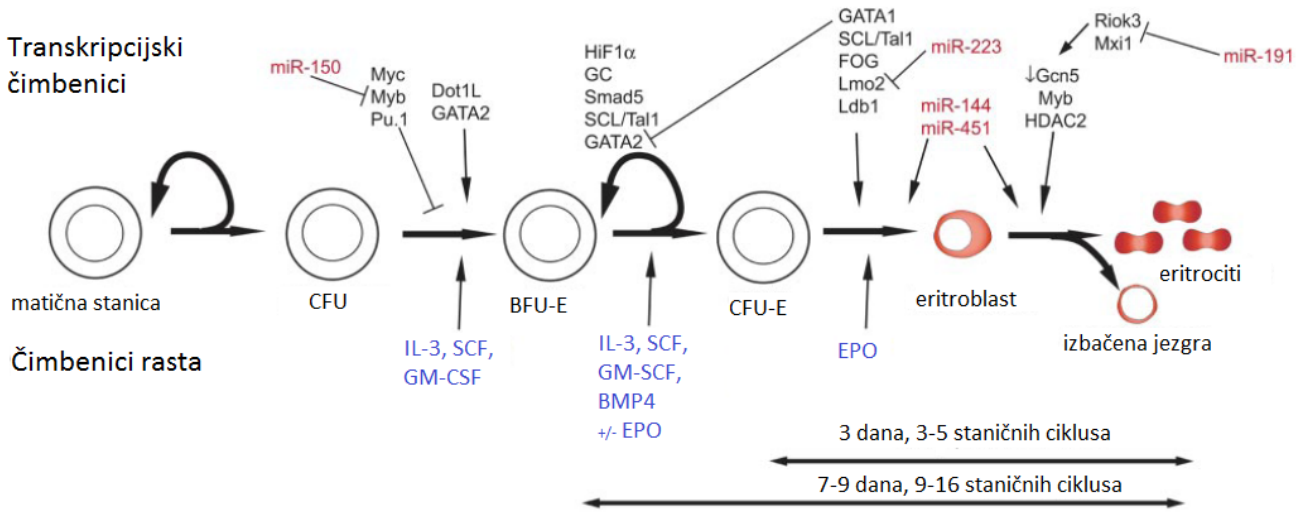
U koštanoj se srži također nalaze zrelije CFU-E stanice koje pod utjecajem EPO stvaraju male kolonije eritroblasta već za sedam dana [82].

Preteče i zrele stanice

Oko jedne trećine populacije stanica koštane srži zdravog djeteta starijeg od 3 godine i odrasle osobe čine eritroidne preteče, odnosno eritroblasti. Najranije prepoznatljivi oblici su proeritroblasti. Ove se stanice dijele i sazrijevaju preko bazofilnih, polikromatskih i ortokromatskih stanica do retikulocita. Kako bi se to dogodilo, dolazi do smanjenja veličine stanice, kondenzacije i izbacivanja jezgre te nakupljanja hemoglobina. Svaki proeritroblast u prosjeku formira osam retikulocita, a srednje vrijeme potrebno da se od faze proeritroblasta pojave retikulociti u cirkulaciji je oko pet dana [82].

U koštanoj srži nalaze se dvije vrste postnatalnih matičnih stanica: krvotvorne i mezenhimne. Krvotvorne matične stanice odgovorne su za za proizvodnju i održavanje svih zrelih krvnih staničnih loza, dok mezenhimne matične stanice i njihovi derivati (fibroblastne, osteoblastne, adipocitne i hondrocitne prastanice) čine stromu koštane srži [83]. Stroma koštane srži čini

mikrookolinu za krvotvorne matične stanice stvarajući fizičku potporu ali i brojne citokine koji su nužni za preživljenje, rast i diferencijaciju krvotvornih matičnih stanica u usmjerene prastanice te potom u diferencirane krvotvorne stanice [76, 84, 85]. (Slika 6).



Slika 6. Prikaz transkripcijskih čimbenika i čimbenika rasta koji sudjeluju u eritropoezi. Prilagođeno prema [82].

1.4 KRONIČNO ZATAJIVANJE FUNKCIJE BUBREGA

1.4.1 Definicija

Kronično zatajivanje bubrežne funkcije (KZB) definira se oštećenjem bubrega ili glomerularnom filtracijom (GF) manjom od 60 mL/min/1.73 m^2, bez obzira na uzrok tijekom najmanje 3 mjeseca (tablica 1).

Tablica 1. Kriteriji kroničnog zatajenja bubrega

Oštećenje bubrega trajanja $\geq$ 3 mjeseca, definirano poremećajem strukture ili funkcije bubrega, s ili bez smanjenja GF, a koje može uzrokovati smanjenje GF, dokazano: • patohistološkim pregledom ili • biljezima bubrežnog oštećenja, uključivo poremećaje sastava urina ili krvi ili • slikovnom pretragom
GF < 60 mL/min1.73 m^2 trajanja $\geq$ 3 mjeseca, s ili bez oštećenja bubrega

Prilagođeno prema [86].

Sve bolesnike s transplantiranim bubregom treba smatrati bolesnicima s KZB, neovisno o vrijednosti GF, te prisutnosti ili odsutnosti pokazatelja oštećenja bubrega (albuminurija, poremećaj sedimenta urina, laboratorijskih nalaza krvnih parametara ili patološki nalaz slikovnih pretraga). Osnova za ovakvo razmišljanje temelji se na oštećenju nativnih bubrega primatelja, pretpostavljenom oštećenju transplantata na osnovi istraživanja protokolarnih biopsija, te potrebom za doživotnom zdravstvenom skrbi uzrokovanom komplikacijama bolesti koja je dovela do terminalnog zatajenja bubrega i kroničnom nefropatijom alografta [86].

1.4.2 Klasifikacija

Težina oštećenja bubrežne funkcije klasificira se u pet stadija ovisno o veličini GF (tablica 2). Za svaku godinu nakon 30. godine života GF sa smanjuje u prosjeku za 1 mL/min na 1.73 m^2.

Tablica 2. Klasifikacija kroničnog zatajenja bubrega

Stadij	GF mL/min na 1.73 m2
0	>90 uz čimbenike rizika za KZB
1	≤ 90 uz dokazano oštećenje bubrežne funkcije (proteinurija, poremećaj sedimenta urina, biokemijskih pretraga krvi ili urina)
2	60-89
3	30-59
4	15-29
5	<15

Prilagođeno prema [86].

Najpouzdanije metode za mjerenje GF uključuju primjenu radiokativno obilježenih supstanci (*125I, 51Cr-EDTA, 99Tc-DTPA*). Klirens kreatinina je korisna alternativa u nedostatku gore navedenih markera. Glomerularna filtracija se također može procjenjivati na osnovi Cockcroft-Gault jednadžbe za nekorigirani klirens kreatinina ili MDRD (od *eng. Modification of Diet in Renal Disease)* Study koja omogućuje procjenu korigirane GF. No točnijom se pokazala *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) jednadžba posebno ukoliko je GF >60 mL/min/1.73 m^2 [87]. Ove se dvije metode mogu koristiti kao adekvatna zamjena ukoliko se primjenjuju lijekovi sa širokim terapijskim rasponom, u suprotnom su potrebna mjerenja GF koja su korištena u istraživanju farmakodinamike lijekova [86]. No treba imati na umu ograničenja u tjelesnim karakteristikama bolesnika koja su navedena u Tablici 3.

Tablica 3. Kliničke osobitosti kod kojih je potrebno mjerenje klirensa radi procjene GF

- Krajnosti koje uključuju dob i indeks tjelesne mase
- Trudnoća
- Bolesti mišića
- Paraplegija ili tetraplegija
- Vegetarijanska prehrana
- Brzo pogoršanje bubrežne funkcije
- Prije doziranja značajno toksičnih lijekova koji se izlučuju bubrezima
- Prije darivanja bubrega
- Klinička istraživanja koja uključuju procjenu GF

Prilagođeno prema [86].

1.4.3 Čimbenici rizika

U svrhu smanjenja pojavnosti i učestalosti KZB u prvom je redu potrebno prepoznati čimbenike rizika koji povećavaju podložnost oštećenju bubrežne funkcije (starija dob, kronična bolest bubrega u obiteljskoj anamnezi, prirođena ili stečena manja bubrežna masa, stanja primarne hiperfiltracije, srčanožilne bolesti, slabiji socio-ekonomski status), dakle prije pojave same bolesti, a zatim prepoznavanju i dobroj kontroli čimbenika koji dovode do direktnog oštećenja bubrežne funkcije kao što su u prvom redu šećerna bolest, arterijska hipertenzija i metabolički sindrom [86]. U tablici 4 navedeni su čimbenici rizika koji pogoduju ili direktno uzrokuju oštećenje bubrežne funkcije.

Tablica 4. Klasifikacija čimbenika rizika kroničnog zatajenja bubrežne funkcije i njenog ishoda

Čimbenici rizika	Definicija	Primjeri
Za podložnost KZB	Povećavaju podložnost za razvoj KZB	Starija dob, kronična bolest bubrega u obiteljskoj anamnezi, prirođeno ili stečeno smanjenje bubrežne mase, slabiji socio-ekonomski status
Za razvoj KZB	Direktno dovode do oštećenja bubrežnog parenhima	Šećerna bolest (DM), arterijska hipertenzija, autoimune bolesti, sistemske infekcije, infekcije ili kamenci mokraćnog sustava, toksičnost lijekova, nasljedne bolesti
Za pogoršanje KZB	Dovode do pogoršanja već postojećeg KZB	Visoka proteinurija, slabo kontrolirana arterijska hipertenzija, slaba kontrola glikemije (DM), moguće dislipidemija i pušenje
Kod terminalnog KZB	Dovode do povećanja pobola i smrtnosti bolesnika s KZB	Slaba doza isporučene dijalize (Kt/V), anemija, hiperfosfatemija, hipoalbuminemija, privremeni krvožilni pristup, opterećenje tekućinom

Prilagođeno prema [86].

Posebnu pažnju zaslužuju srčanožilne bolesti (SŽB) kao komplikacija KZB, posebno stoga jer su srčanožilni incidenti značajno češći nego terminalno zatajivanje bubrega ovih bolesnika, jer je KZB neovisan čimbenik rizika za razvoj SŽB, i u konačnici, jer se dobrom kontrolom KZB mogu spriječiti ili pravodobno liječiti SŽB kao najvažniji uzrok smrtnosti ovih bolesnika.

Izvješće radne grupe za *Cardiovascular Disease in Chronic Renal Disease* iz 1998.godine preporučuje da se bolesnici s KZB smatraju visoko rizičnim za razvoj SŽB te da se većina zahvata koji su učinkoviti u općoj populaciji trebaju primjeniti na ove bolesnike [88]. što je potvrđeno 2003. izvješćem *American Heart Association Councils* [89]. te smjernicama *Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure* [90]. i konačno smjernicama od strane *National Kidney Foundation* [91].

Osim takozvanih tradicionalnih čimbenika rizika za razvoj srčanožilnih bolesti ovih bolesnika koji se javljaju u općoj populaciji (starija dob, muški spol, arterijska hipertenzija, povišen HDL kolesterol, snižen LDL-kolesterol, šećerna bolest, pušenje, smanjena tjelesna aktivnost, menopauza, KZB u obitelji, hipertrofija lijeve klijetke), značajni su i čimbenici rizika specifični za KZB kao što su pothranjenost, disfunkcija endotela, oksidativni stress, hiperhomocisteinemija [92, 93].

1.4.4 Učestalost i pojavnost

KZB je svjetski javnozdravstveni problem sa sve većom učestalosti i pojavnosti, visokim troškovima liječenja i lošim ishodom što uključuje terminalno bubrežno zatajenje, kardiovaskularne bolesti i prijevremenu smrt [94].

Pojavnost različitih stadija KZB je usporediva u različitim dijelovima Europe što je pokazao De Jong i sur. analizom studija *North Trondelag Health Study* (HUNT), „*Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease*“ (PREVEND) i „*Estudio Epidemiologico de la Insuficiencia Renal en Espana*“ (EPRICE). Pojavnost stadija 1 i 2 KZB nalazi se u rasponu od 5.3% do 7%. Stadij 3 ima sličnu pojavnost u rasponu od 4.5 do 5.3%, dok je za stadij 4 pojavnost vrlo niska i kreće se od 0.1 do 0.4% [86]. Do 2006 godine objavljena je studija Hallan i suradnika o pojavnosti KZB u Norveškoj iz HUNT II studije koja je uključivala 65 181 odraslog bolesnika [96].

Rezultati o pojavnosti i učestalosti pojedinih stadija KZB u Sjedinjenim Državama dobiveni su iz *Third National Health and Nutrition Examination survy* (NHANES III) koje je pokazalo da 6.3 % opće populacije ima stadij 1 i 2 KZB, 4.3% ima stadij 3, dok 0.2% opće populacije ima stadij 4 i 0.2% ima stadij 5 [97].

Bolesnici koji imaju stadij 1 i 2 dosegnu završni stadij bubrežnog zatajenja otprilike jednako često kao i bolesnici sa stadijem 3,gdje je rizik terminalnog zatajenja bubrega u ranijim stadijima bubrežnog zatajenja otprilike 25 do 45 puta veći u odnosu na bolesnike koji nemaju KZB. Rizik razvoja terminalnog bubrežnog zatajenja je zapanjujuć za stadije 4 i 5, gdje bolesnici imaju 100 do 1000 puta veći rizik nastanka terminalnog zatajenja bubrega u usporedbi s bolesnicima u stadijima 1 do 3 [95]. U skladu s podacima iz svjetske literature u R. Hrvatskoj od kronične bolesti bubrega boluje ili ima povećani rizik oko 450 000 osoba. Prema podacima Hrvatskog

registra nadomještanja bubrežne funkcije 2011. incidencija KZB je 113.3 bolesnika/milijun stanovnika, a nadomještanje bubrežne funkcije bilo je potrebno u 4 348 bolesnika što odgovara pojavnosti od 980 bolesnika/milijun stanovnika [98].

1.4.5 Patogeneza

Smanjenje GF dovodi do velikog broja komplikacija kao što su hipertenzija, anemija, pothranjenost, bolest kostiju, neuropatija i u konačnici smanjenja kvalitete života.

Kronično zatajivanje funkcije bubrega može biti posljedica djelovanja zaštitnih mehanizama organizma specifičnih za osnovu bolest, npr. djelovanja imunih kompleksa i posrednika upale u određenim tipovima glomerulonefritisa ili izloženosti toksinima u intersticijskim bubrežnim bolestima. Drugi mogući mehanizam oštećenja bubrežne funkcije nastaje u bubrezima s dugotrajno smanjenom bubrežnom masom gdje zbog hiperfiltracije i kompenzatorne hipertrofije preostalih nefrona dolazi do oštećenja bubrežne funkcije. U konačnici ova kratkotrajna prilagodba hipertrofijom i hiperfiltracijom postane nedostatna jer povećani tlak i protok dovode do sekundarne skleroze i razaranja preostalih nefrona. Povećana aktivnost RAS pridonosi i početnoj prilagodnoj hiperfiltraciji i posljedičnoj neprilagođenoj hipertrofiji i sklerozi, prvenstveno putem TGF- β1 *(eng. transforming growth factor β1)* ali i čimbenika rasta trombocita [99, 100].

Kronično zatajenje bubrega u 1. i 2. stadiju (GF > 60 mL/1.73 m^2) je uglavnom bez simptoma, no čimbenici koji su doveli do zatajenja bubrega djeluju i dalje istim intenzitetom ukoliko ostanu neprepoznati. Bolest koja je dovela do zatajenja može biti simptomatska, npr. edemi u nefrotskom sindromu ili hipertenzija kao posljedica bolesti bubrežnog parenhima. U ovim se stadijima bubrežno oštećenje može otkriti albuminurijom u 2 od 3 uzorka urina što se definira kao albumin > 30 mg/dU ili omjer albumin/kreatinin > 300 mg/g [86].

Daljnjim smanjenjem GF prema stadiju 3 ili 4 (GF 15-59 mL/1.73 m^2) dolazi do poremećaja homeostaze elektrolita, u prvom redu hiperfosfatemije, posljedične hipokalcemije, smanjuje se koncentracija vitamina D3 (zbog smanjene aktivnosti 1-alfa-hidroksilaze u bubrezima, malih rezervi vitamina D i pojačane razgradnje aktivnog hormona, te smanjene ekspresije receptora za

vitamin D) [101], te dolazi do kompenzatornog, sekundarnog hiperparatireoidizma (SHPT) [102]. Također zbog oštećenja bubrežne funkcije dolazi i do poremećaja acido-bazne ravnoteže u prvom redu smanjenim izlučivanjem amonijaka. Acidoza nastaje pri smanjenju GF < 20 mL/min kada zbog gubitka nefrona dolazi do nedovoljne sinteze amonijaka, smanjene regeneracije bikarbonata u tubulima i smanjene sposobnosti izlučivanja vodika. Težina acidoze može biti pojačana i katabolizmom te povećanim unosom bjelančevina, a time i opterećenjem organizma kiselinama. Ovakav poremećaj ravnoteže dalje pogoduje poremećaju koštanog metabolizma koji se ne smije promatrati samo u odnosu na kost već u odnosu na poremećaj metabolizma minerala i izvan koštanog sustava, uključujući krvne žile. U posljednje se vrijeme termini "bubrežna osteodistrofija" i "bubrežna bolest kosti" zamjenjuju terminom "KZB - poremećaj minerala i kosti". Time se opisuje širok spektar kliničkih sindroma koji se javljaju zbog sistemskog poremećaja minerala i kosti, a rezultat je oštećenja bubrežne funkcije koji se može manifestirati kao jedan ili kombinacija slijedećih poremećaja: 1. poremećaj kalcija, fosfora, PTH i metabolizma vitamina D, 2. poremećajima pregradnje kosti, mineralizacije, volumena, linearnog rasta ili snage te 3. kalcifikatima krvnih žila ili mekog tkiva [103]. Poremećaji s niskom koštanom pregradnjom uključuju adinamičnu bolest kosti i osteomalaciju, nekada su bili vrlo rijetki poremećaji no sada se sve češće susreću i povezuju s pretjeranom upotrebom vitamina D, upotrebom kalcija za regulaciju hiperfosfatemije i pretjeranom supresijom PTH [103].

Metabolička neravnoteža koja se javlja u stadijima 3 i 4 KZB praćena je i kliničkim znakovima te se u ovim stadijima bolesti javljaju simptomi od strane gotovo svih organskih sustava. Najizraženiji su smanjen apetit, slabost, umor, nemogućnost obavljanja svakodnevnih aktivnosti i nalaz normocitne anemije.

Normocitna, normokromna, neregenerativna anemija posljedica je u prvom redu smanjenog stvaranja eritropoetina zbog gubitka bubrežnog parenhima ali se javlja i zbog usporenja eritropoeze zbog relativne neosjetljivosti eritroidne loze na eritropoetin u uremičnoj sredini i hemolize uvjetovane uremijskim toksinima. Pogoršanju anemije pridonose manjak folata i željeza, malnutricija, sekundarni hiperparatireoidizam, krvarenje i infekcije [104-106].
Bolesnici u završnom stadiju KZB razvijaju uremijski sindrom koji je posljedica gubitka bubrežne funkcije: ekskretorne, metaboličke i endokrine. Gubitak ekskretorne funkcije rezultira nakupljanjem organskih spojeva, kao što su karbamid, cAMP, poliamini, kratinin, gvanidin, mokraćna kiselina. Toksično djelovanje imaju spojevi koji su topivi u vodi, vezani za proteine,

električno nabijeni, spojevi gvanidina, poliamini, mioinozitol, indoli i molekule srednje veličine i oni dovode do simptoma uremije. Ovi spojevi utječu na agregaciju trombocita, povećavaju koncentracije lijekova u krvi i pridonose anemiji [107, 108].

Hiperkalijemija se pojavljuje kasno jer se pri GF > 5 mL/min kalij uglavnom uspijeva odstraniti ekskrecijom u distalnom tubulu posredstvom aldosterona. Hiperkalemiju uzrokuju povećan unos kalija hranom, katabolizam proteina, hemoliza, krvarenje, transfuzija krvi, metabolička acidoza, lijekovi koji inhibiraju ulaz u stanice i njegovu ekskreciju (ACE inhibitori, blokatori angitenzinskih receptora (ATR) i diuretici koji štede kalij) [109].

Ako bolest uznapreduje do stadija 5, bolesnici imaju izrazite simptome, koji su obuhvaćeni uremijskim sindromom, a ovakvo stanje završava smrću osim ako se ne nadomjesti funkcija bubrega bilo dijalizom bilo transplantacijom.

1.5 TRANSPLANTACIJA BUBREGA

Od 1954. kada je učinjena prva transplantacija bubrega živog donora u Bostonu, došlo je do dramatičnog napretka transplantacije, od još nedokazane metode kojom se spašava život, do prve linije liječenja bolesnika s terminalnim zatajenjem bubrega. Bolesnici koji su liječeni transplantacijom imaju 68% manji rizik od smrti nego bolesnici koji se liječe dijalizom [110].

Uspjeh transplantacije ovisi o imunosupresiji obzirom da tijelo primatelja prepoznaje transplantat kao strano tijelo koje u konačnici bude i odbačeno od imunološkog sustava primatelja.

Imunosupresivni lijekovi imaju usku terapijsku širinu i brojne nuspojave. Uz to su snažni inhibitori T i B stanične funkcije zbog čega je njihova upotreba povezana s potencijalno životno ugrožavajućim infekcijama.

Dvije su grupe površinskih antigena odgovorne za preživljenje alografta. To je glavna grupa krvnih AB0 glikolipida koji su meta prirodno postojećim hemaglutininskim protutijelima. U posljednje je vrijeme sve više izvješća o uspješnoj transplantaciji organa inkompatibilnih krvnih grupa, a sve zahvaljujući napretku imunosupresivne terapije [111].

Druga grupa antigena važnih u transplantaciji organa su glavni antigeni tkivne podudarnosti, *MHC*, koji se nalaze na svim stanicama sisavaca. Stupanj uspješnosti transplantacije s nesrodnog, kadaveričnog davatelja u direktnoj je vezi s brojem *MHC* nepodudarnih antigena između davatelja i primatelja. Geni unutar *MHC* grupe fizički su grupirani u tri regije, a kodiraju bjelančevine na površini stanice kao i antigene na ljudskim leukocitima, *HLA (eng. human leukocyte antigens)* koji imaju ključnu ulogu u razlikovanju "svog" od "tuđeg".U prvoj grupi nalaze se geni koji kodiraju teške polipeptidne lance za *HLA-A, HLA-B i HLA-C* antigene koji su identificirani kao ciljevi aloprotutijela, a u konačnici i stanično posredovanog imunog odgovora. Ovi se antigeni nalaze na površini svih stanica s jezgrom. U drugoj grupi nalaze se geni koji kodiraju i alfa i beta lanac *HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ* molekula. Za razliku od antigena prve grupe koji se nalaze na površini svih stanica s jezgrom, pa tako i T i B limfocita, antigeni grupe II imaju značajno ograničenu proširenost na monocite, makrofage, endotelne stanice, Langerhansove stanice kože i aktivirane (ali ne i mirujuće) T limfocite [112].

Komplikacije nakon uspješne transplantacije bubrega također su brojne zbog dugotrajne izloženosti bolesnika imunosupresiji, problema ne samo akutnog odbacivanja, koje je sada razlog vrlo malom broju gubitka presađenog bubrega [113], već i kroničnog odbacivanja alografta te infekcija, kardiovaskularnih bolesti, malignoma.

Sam operacijski zahvat ima svoje kirurške komplikacije od kojih je najčešća krvarenje, a javlja se u 1-5% ovisno o rizičnim čimbenicima prije zahvata (upotreba inhibitora zgrušavanja, plazmafereza, ranije transplantacije te odgođena funkcija grafta i potreba za hemodijalizom). Također u ranom postoperacijskom razdoblju treba misliti i na trombozu ili stenozu arterije grafta koje se napretkom kirurške tehnike javljaju u manje od 3% zahvata, ali mogu biti fatalne za preživljenje grafta [114].

1.5.1 Imunosupresivni lijekovi

Napredak u našem razumijevanju staničnih i molekularnih mehanizama koji sudjeluju u odbacivanju alografta prati i razvoj imunosupresivnih lijekova. Sve je veći broj dostupnih imunosupresivnih lijekova koji djeluju na različite faze imunološkog odgovora na graft. Svi oni dovode do nespecifične imunosupresije (osim betalacepta, specifičnog T staničnog inhibitora. odobrenog za imunosupresiju bolesnika s transplantiranim bubregom 2011.) i svaki od njih ima svoje specifične nuspojave, a koriste se za intenzivnu imunosupresiju u prvim danima nakon transplantacije (indukcija), održavanje i zaokret već postojećeg odbacivanja alografta. [116].

Još 1954 godine Murray i sur. izveli su prvu transplantacija bubrega. No ona je u to vrijeme bila moguća jedino zbog toga što su davatelj i primatelj bili jednojajčani blizanci. Moderna era imunosupresije započela je otkrićem da 6-merkaptopurin (6-MP) može inducirati imunološku nereaktivnost na strani protein u zečeva, što se nastavilo istraživanjem koje je pokazalo produženo preživljenje pasa s transplantiranim bubregom [116].

Nešto kasnije Elion i Hitchings koji su radili u Burroughs Wellcome laboratoriju u New Yorku uspjeli su sintetizirati više nukleotidnih analoga, od kojih se svojom učinkovitošću i podnošljivosti posebno isticao azatioprin (AZA). Ubrzo je započela i njegova upotreba u kliničkoj praksi. No nije bio dovoljno učinkovit da spriječi veliki broj gubitaka grafta zbog odbacivanja. Tek je kombinirana upotreba AZA i kortikosteroida u ranim 1960. pokazala kako je učinkovita imunosupresija postala realnost [117]. Iako se preživljenje grafta poboljšalo, kasnih 1970ih jedva je prelazilo 50% nakon godinu dana. Sljedećih 25 godina ova su dva lijeka bila okosnica imunosupresije. Otkriće ciklosporina (CyA) 1976. godine, te njegova klinička upotreba, posebno u kombinaciji s AZA i kortikosteroidima omogućila je daljnji napredak transplantacije solidnih organa i preživljenje presatka od 8 do 95% nakon prve godine [117, 118].

Sljedeća dva lijeka identificirana su kasnih 1980ih, poznati kao takrolimus (FK506) i sirolimus (rapamicin). Njihovo je daljnje istraživanje jedno vrijeme prekinuto zbog letalnog vaskulitisa koji su uzrokovali na psećem modelu, no ubrzo se uvidjelo da se vaskulitis javlja samo u pasa te se takrolimus uveo u kliničku upotrebu kao iznimno potentan imunosupresiv koji se u početku koristio kod teških oblika odbacivanja transplantirane jetre [116].

Daljnja su istraživanja potvrdila kako je takrolimus u svom djelovanju i nuspojavama vrlo sličan ciklosporinu, no s ipak nešto izraženijim neurološkim i dijabetogenim učinkom [119, 120]. Konačno su 1990ih u kliničku praksu uvedeni mikofenolat mofetil (MMF) koji je sintetski derivat mikofenolne kiseline *(MPA, eng. mycophenolic acid)* proizvedene iz plijesni Penicillium glaucum, te sirolimus i everolimus, zajedno s dva anti-CD25 monoklonalna protutijela, daclizumabom i basiliximabom. Iako je MMF inicijalno istraživan zbog svojih antivirusnih i antibiotskih svojstava, kasnije je pokazano njegovo imunosupresivno djelovanje kako na eksperimentalnim modelima, tako i od 1995.godine u kliničkoj upotrebi [121]. Lijekovi koji se koriste u imunosupresiji nakon transplantacije solidnih organa mogu se podijeliti u nekoliko grupa o kojima će biti riječi dalje u tekstu. To su kortikosteroidi, antiproliferativni lijekovi, kalcijneurinski inhibitori, *mTOR* inhibitori, te poliklonalna i monoklonalna antilimfocitna protutijela i posljednji kod kojeg je 2011. završila i III faza kliničkog ispitivanja, specifični blokator T limfocita [121].

1.5.1.1 Kortikosteroidi (prednizolon, prednizon, metil prednizolon)

Kortikosteroidi se još uvijek naširoko smatraju važnim sastavnim dijelom većine imunosupresivnih protokola i gotovo se univerzalno koristi kao prva linija liječenja akutnog odbacivanja alografta. Dva glavna kortikosteroida koja se koriste za prevenciju akutnog odbacivanja su prednizolon i prednizon. Prednizon se u jetri metabolizira u aktivni sastojak, prednizolon. Oba lijeka imaju uglavnom glukokortikoidno djelovanje i minimalno mineralokortikoidno djelovanje. Kao prva linija u liječenju već nastalog akutnog odbacivanja grafta koristi se u najvećem broju centara visoka doza metil prednizolona primjenjenog intravenski. Kortikosteroidi imaju brojne protuupalne i imunomodulatorne učinke [122]. kao što su supresija proizvodnje prostaglandina, smanjenje otpuštanja histamina i bradikinina kao i smanjenje kapilarne propusnosti. Njihovo vezanje za receptor u konačnici dovodi do smanjene proizvodnje citokina, uključujući *IL-1, IL-2, IL-6, IFN-γ, TNF-α.* Također remete funkciju monocita/makrofaga te smanjuju broj cirkulirajućih CD4 + T stanica. Nuspojave steroida vrlo su dobro poznate. Dijabetogeni učinak zbog poremećenog metabolizma ugljikohidrata dovodi do redistribucije masti s ekstremiteta na trup i do centralne pretilosti. Gubitak proteina iz mišića

ekstremiteta uzrokuje proksimalnu slabost, javlja se krhkost kapilara. Zbog mineralokortikoidnog djelovanja dolazi do zadržavanja tekućine, hipokalijemije i hipertenzije. Dugotrajna terapija kortikosteroidima dovodi do supresije funkcije nadbubrežne žlijezde, a druge dobro poznate komplikacije ove terapije su i psihoza, katarakta, glaukom, želučani ulkus, osteoporoza, oslabljeno zacjeljivanje rana i druge [122,123].

1.5.1.2 Antiproliferativni lijekovi

1.5.1.2.1 Inhibitori sinteze purina – azatioprin i mikofenolna kiselina

Azatioprin (AZA) se u tijelu metabolizira u 6-merkaptopurin (6MP), nakon čega se konvertira u 6-tiouričnu kiselinu, 6-metil-MP i 6-tiogvanin (6TG). Ovi spojevi su kompetitivni inhibitori kako *de novo*, tako i pomoćnog puta za sintezu nukleozida čime zaustavljaju replikaciju DNA. Poluvrijeme života AZA i 6MP je oko 2 sata ali uz značajne razlike između bolesnika, ali i kod pojedinog bolesnika. Usprkos tome lijek se dozira prema tjelesnoj masi. Postoji polimorfizam gena koji sintetizira enzim tiopurin S-metil transferazu (*TPMT, eng. tiopurin S-metil transferase)*, a koji omogućuje pretvaranje 6MP u 6-metil-MP. Ovo je važno jer u slučaju polimorfizma koji dovodi do smanjene funkcije enzima dolazi do akutne mijelosupresije [124]. Ovaj se polimorfizam nalazi u 10% populacije, od kojih su 0.5% homozigoti i kod njih nastaje težak oblik mijelosupresije inducirane azatioprinom. Upravo je mijelosupresija glavna nuspojava terapije AZA koja je ovisna o dozi. Od nuspojava se još navode oštećenje jetre, kolestatska žutica, venookluzivna bolest. Također se nešto češće javljaju kožne reakcije koje se obično manifestiraju kao nespecifičan osip [117].

Mikofenolat mofetil (MMF) i natrij-MMF (*MPS, eng mycophenolate sodium)* se vrlo brzo u jetri pretvaraju u aktivni sastojak, mikofenolnu kiselinu (MPA). Ciljno mjesto MPA je inozin monofosfat dehidrogenaza (IMPDH), koja sudjeluje u *de novo* sintezi gvanozin nukleotida. Većina stanica ima i pomoćni put sinteze gvanina, no limfociti imaju mogućnost samo de novo sinteze. Na taj način je gotovo selektivno blokirana proliferacija limfocita. Postoje dvije izoforme enzima IMPDH. To je tip I koji se uglavnom nalazi u stanicama u mirovanju, i tip II koji je izražen u populaciji aktiviranih limfocita, a kojeg inhibira MPA [117, 125]. Nuspojave su slične i za MMF i za MPS. Najčešće su gastrointestinalne nuspojave, mučnina, povraćanje,

bolovi u trbuhu, a najčešća je proljev koji je glavni uzrok smanjenja doze lijeka u bolesnika. Za vrijeme terapije može se javiti i supresija koštane srži. Također je sve više izvješća o povećanoj incidenciji virusnih infekcija, kao što su citomegalo (CMV) ili herpes zoster (VZV) virusne infekcije u odnosu na placebo ili bolesnike liječene AZA. [125, 126].

Nekoliko je istraživanja dovelo do sličnih rezultata uspoređujući učinkovitost MMF u odnosu na AZA (177, 183). Veliko randomizirano istraživanje od strane TMMRTSG grupe (*Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group*) pokazalo je da su bolesnici koji su u terapiji imali MMF imali i manju incidenciju odbacivanja (16 i 20% u odnosu na 36%), rjeđe su liječeni zbog zatajenja grafta unutar 6 mjeseci od transplantacije (35 i 38% u odnosu na 50%), te se javila manja potreba za korištenjem antilimfocitnih protutijela zbog teških ili steroid rezistentnih epizoda odbacivanja (5 i 9% u odnosu na 15.4%). Danas je u protokolima za imunosupresiju nakon transplantacije bubrega MMF većinom zamijenio AZA kao antiproliferativni lijek [117].

1.5.1.2.2 mTOR inhibitori (sirolimus, everolimus)

Sirolimus (SRL) i everolimus (EVL) pripadaju grupi lijekova koji se nazivaju mTOR inhibitori (*mTOR, engl. mammalian target of rapamycin*). Riječ je o serin-treonin kinazi uključenoj u singnalni put fosfatidilinozitol 3-kinaza /protein kinaza B. Sirolimus nastaje kao produkt fermentacije aktinomicete *Streptomyces hygroscopicus*, dok je everolimus njegova kemijska modifikacija sintetizirana radi potrebe bolje apsorpcije lijeka. SRL i EVL se vežu na imunofilin *FKBP12 (eng FK binding protein 12)*, no za razliku od takrolimusa, ne dovode do inhibicije kalcijneurina već visoko specifično inhibiraju *mTOR* čime djeluje na unutarstaničnu signalizaciju potrebnu za nastavak staničnog ciklusa i staničnu proliferaciju [128]. Konačni učinak je blokada aktivacije T stanica onemugućujući da stanični ciklus iz G1 prijeđe u S fazu. Osim svog imunosupresivnog učinka, *mTOR* inhibitori inhibiraju fibroblastne faktore rasta što može rezultirati u otežanom zacjeljivanju rana. Vjerojatno je sličan učinak na proliferaciju glatkih mišićnih stanica odgovoran za uočenu proliferaciju intime nakon angioplastike. SRL i EVL imaju slične nuspojave, što je i za očekivati obzirom na sličnu kemijsku strukturu. Nuspojave se mogu podijeliti na metaboličke, hematološke, kožne, te na nuspojave zbog inhibicije čimbenika rasta [117, 129]. Glavna metabolička nuspojava je povišenje serumske koncentracije kolesterola

i triglicerida, zatim porast mokraćne kiseline i 'jetrenih' enzima. Supresija sve tri krvne loze je česta, s anemijom koja je pogoršana prisustvom kroničnog bubrežnog zatajenja i prekidom terapije eritropoetinom. Od kožnih promjena, u prvom redu je riječ o aknama i ulceracijama usne šupljine. Proljev, periferni edemi i stvaranje limfocela također su dobro poznate nuspojave ovih lijekova uz sve češća izvješća o pneumonitisu [130] povezanom uz terapiju sirolimusom ili everolimusom.

Tablica 5. Nuspojave antiproliferativnih lijekova

	Mikofenolna kiselina	mTOR inhibitori
Anemija	++	+++
Mikrocitoza	-	++
Neutropenija	+++	++
Trombocitopenija	+ / -	+++
Hiperkolesterolemija	-	+++
Hipertrigliceridemija	-	+++
Proljev	+++	+

Prilagođeno prema [117]

1.5.1.3 Kalcijneurinski inhibitori (ciklosporin, takrolimus)

Ciklosporin (CyA) je ciklički polipeptid dobiven iz gljivice Tolypocladium inflatum. Njegova učinkovitost i toksičnost proizlaze iz inhibicije kalcijneurina, serin-treonin fosfataze. Obzirom da je CyA lipofilan, jednostavno difundira kroz membranu ciljnih stanica kao što su T limfociti, gdje stvaraju kompleks s ciklofilinom, unutarstaničnim proteinom. Upravo je ovaj kompleks odgovoran za inhibiciju aktivnosti kalcijneurina, dovodeći do prekida normalnog, o kalciju ovisnog, unutarstaničnog signaliziranja unutar T limfocita. Kao posljedica, aktivacija T limfocita preko površinskih receptora ne dovodi do aktivacije kalcijneurina preko kalcij-kalmodulina, ne dolazi do transkripcije gena za sintezu pro-upalnih citokina kao što su *IL-2, IL-3, IL-4, IFN-γ i TNF-α* i nema aktivacije niti proliferacije T limfocita [117, 118, 132]. Takrolimus (FK506) se za

razliku od ciklosporina veže na 12 kDa intracelularnog imunofilina FK506 (već spomenuti *FKBP12*), također dovodeći do inhibicije kalcijneurina.

Kalcijneurinski i *mTOR* inhibitori se metaboliziraju preko citokrom P450 oksidaze u jetri i crijevima, stoga lijekovi koji interferiraju s ovim enzimom djeluju i na koncentraciju ciklosporina i takrolimusa kod pojedinog bolesnika. Kalcijneurinski inhibitori su vezani uz širok spektar nuspojava, a većina najvažnijih su ovisni o dozi lijeka i javljaju se u organima gdje je najviša koncentracija kalcijneurina, odnosno u mozgu i bubregu [132] Najčešći su nefrotoksičnost i neurotoksičnost, dijabetogeni učinak, hepatotoksičnost. Iako oba lijeka dijele neke nuspojave ovisne o dozi, postoje i neke značajne razlike (Tablica 6)

Tablica 6.. Nuspojave kalcijneurinskih inhibitora

	Ciklosporin A	Takrolimus
Nefrotoksičnost	++	+++
Arterijska hipertenzija	+++	++
Tremor	++	+++
Dezorijentacija	+ / -	+
Novonastala šećerna bolest	+ / -	+
Hirzutizam	++	-
Hiperplazija desni	++	-

Prilagođeno prema [117]

CyA i FK-506 su nefrotoksični i upravo je to glavna nuspojava ovih lijekova nakon transplantacije bubrega. Djelomično se javlja zbog vazokonstrikcije aferentne arteriole sa posljedičnim smanjenjem prokrvljenosti i glomerularne filtracije [134, 135] Ove su promjene reverzibilne ukoliko se ukine primjena kalcijneurina. Dugoročna upotreba ovih lijekova dovodi do kroničnih, ireverzibilnih promjena karakteriziranih intersticijskom fibrozom i obliteracijom arteriola. Čini se da je navedena pojava manje izražena uz takrolimus kao i hipertenzija koja se često javlja kao nuspojava liječenja [117, 135].

Za razliku od nefrotoksičnosti i hipertenzije, neurotoksičnost se češće javlja uz terapiju takrolimusom. Najčešće se očituje kao tremor i glavobolja koji se pogoršavaju 2 sata nakon uzimanja lijeka kada je i njegova koncentracija u krvi najviša. Mogu se javiti i nesanica, psihoza, halucinacije i poremećaji svijesti, ali ipak znatno rjeđe [117]. CyA je bio glavna okosnica imunosupresije kroz 1980e i rane 1990e. Za to vrijeme provedeno je nekoliko velikih, multicentričnih istraživanja koja su pokazala značajno poboljšanje u preživljenju grafta od oko 50% sa AZA na oko 70 do 90% sa CyA [138, 139]. Prvi je put bilo moguće postići dobro preživljenje grafta u senzibiliziranih bolesnika koji su transplantirani po drugi put. Omogućilo je i napredak u transplantaciji drugih solidnih organa. Godine 1986 Opelz je publicirao podatke iz europske baze podataka o nefrotoksičnosti CyA, a ta je spoznaja dovela do smanjivanja doze CyA u liječenju i uvođenje trojne terapije zajedno sa AZA i steroidima kako bi se minimalizirala toksičnost i povećala učinkovitost imunosupresivne terapije [140].

Najveće randomizirano kontrolirano istraživanje o upotrebi takrolimusa (287 bolesnika) i CyA (273 bolesnika) u kombinaciji s AZA i steroidima [141]. Pokazalo je značajno nižu incidenciju biopsijom dokazanih odbacivanja nakon perioda od 6 mjeseci u FK506 grupi u odnosu na CyA grupu (19.6% u odnosu na 37.3%). U slučaju da je došlo do akutnog odbacivanja grafta, vjerojatnije je bilo ovisno o steroidima u bolesnika liječenih FK506 nego sa CyA (9.4% u odnosu na 21%). Nije bilo značajnije razlike u preživljenju grafta nakon 6 mjeseci. Na osnovu nekoliko istraživanja, preporučeno je takrolimus uključiti kod bolesnika koji su visoko imunološki rizični, npr. senzibilizirani ranijim transplantacijama i kod bolesnika s odgođenom funkcijom grafta [142]. I dalje se nastavlja tendencija smanjenja kalcijneurinskih inhibitora u imunosupresivnim protokolima [129].

1.5.1.4 Polikonalna i monoklonalna antilimfocitna protutijela (daclizumab, basiliximab)

Poliklonalna protutijela još se uvijek koriste u transplantaciji solidnih organa, no potiskuju ih monoklonalna protutijela iz više razloga. Poliklonalna protutijela sadrže protutijela usmjerena na različite površinske molekule izražene na T i B limfocitima, NK stanicama i makrofazima. Primjena ovakvih protutijela dovodi do brze i snažne deplecije limfocita u većine bolesnika [116, 117]. Takozvana reakcija na prvu dozu viđa se kod gotovo 80% bolesnika i može biti

uzrokovana ksenogenim bjelančevinama ili inicijalnom aktivacijom T stanica i posljedičnim otpuštanjem citokina [117].

Najčešća reakcija je febrilitet koja je sve rjeđa s češćim primjenama protutijela. Ostale reakcije uključuju osip, trombocitopeniju i rijetko anafilaktički šok. Obično se 30-60 min prije primjene u terapiji daje kombinacija steroida, antihistaminika i paracetamola. Anti limfocitna protutijela još se koriste, posebno u terapiji steroid rezistentne epizode akutnog odbacivanja grafta i učinkovita su u 70-96% bolesnika [143].

U usporedbi s preparatima koji sadrže poliklonalna protutijela, monoklonalna protutijela (*mAb, engl. monoclonal antibodies*) imaju jedno, dobro definirano ciljno mjesto na koje se vežu, standardizirana su i ne sadrže nepotrebne bjelančevine. Muronab-CD3 (OKT3) je monoklonalno protutijelo koje se veže na CD3 molekulu na T stanicama. Unutar nekoliko minuta od primjene OKT3 dolazi do masivne lize T stanice i duboke limfodeplecije [144]. Nakon 3-5 dana, mogu se detektirati cirkulirajući T limfociti, no ne eksprimiraju CD3 biljeg [145] koji je esencijalan za prenošenje signala nastalog vezanjem antigena na *TCR*. Kada se OKT3 inicijalno veže na CD3, dolazi do T stanične aktivacije, citolize i masivnog otpuštanja citokina što dovodi do plućnog edema i akutnog respiratornog distres sindroma [117] te je potrebna premedikacija. Klinički se muronab-CD3 koristi i za indukciju imunosupresije i za liječenje steroid rezistentnog odbacivanja grafta [147]. CD25 monoklonalno protutijelo je alfa lanac receptora za *IL-2 (IL-2R)*, koji je normalno izražen na aktiviranim T limfocitima. Dva monoklonalna CD25 protutijela odobrena su za kliničku praksu, baziliksimab i daklizumab, a koriste se i kod nas. Posljednjih nekoliko godina daklizumab je povučen iz proizvodnje zbog finacijskih interesa proizvođača.

Kada se jednom primjene, protutijela ostaju u cirkulaciji nekoliko tjedana, ovisno o drugim imunosupresivnim ljekovima koje bolesnik prima. U kombinaciji sa CyA i steroidima receptori ostaju blokirani oko 7 tjedana dok je uz dodatak AZA ili MMF učinkovitost produžena na 50, odnosno 59 dana [148, 149]. Za razliku od OKT3, baziliksimab i daklizumab ne dovode do reakcije nakon prve doze, i imaju vrlo malo nuspojava direktno vezanih za samo protutijelo. U konačnici, ova se dva mAb koriste u indukcijskoj terapiji transplantacije bubrega i nemaju mjesto u liječenju steroid rezistentnog akutnog odbacivanja, jer su u tom slučaju aktivni *IL-2R* niskog afiniteta kojima nedostaje alfa podjedinica.

1.5.1.5 Selektivni inhibitor T stanica

Belatacept (ranije poznat pod nazivom *LEA29Y*) je najnoviji lijek, za sada jedini u grupi selekivnih inhibitora T stanica koji je odobren za upotrebu od strane Američke i Europske agencije za lijekove 2011. u imunosupresiji nakon transplantacije bubrega. Riječ je o proteinu kojeg čine Fc fragment ljudskog IgG1 imunoglobulina koji je vezan za ekstracelularnu domenu *CTLA-4*, ključnu molekulu za stimulaciju T limfocita čime selektivno blokira njihovu aktivaciju. Učinkovitost mu je istražena u kliničkoj studiji *BENEFIT i BENEFIT EXT* koja je 3 godine pratila 1209 uključenih bolesnika, a kontraindiciran je u bolesnika seronegativnih na EBV obzirom na značajniju incidenciju posttransplantacijskog limfoproliferativnog poremećaja u odnosu na CyA [146].

Imunosupresivni protokoli osmišljeni su kako bi spriječili odbacivanje grafta, a najčešće se sastoje u kombinaciji tri lijeka: kortikosteroida, kalcijneurinskog inhibitora (CyA, takrolimus) i jednog od antiproliferativnih lijekova (MMF ili AZA).

1.5.2 Hematološke komplikacije nakon transplantacije

1.5.2.1 Posttransplantacijska anemija

Nakon uspješne transplantacije bubrega, vrijednosti hemoglobina postupno rastu te dosežu referentne vrijednosti unutar 6-12 tjedana [150]. Anemija se povezuje sa srčanožilnim komplikacijama u bolesnika sa kroničnim bubrežnim zatajivanjem, posebno sa hipertrofijom lijeve klijetke i povišenim rizikom od smrtnog ishoda u odnosu na bolesnike bez anemije. [151,152]. Takva povezanost anemije sa lošim stanjem srčanožilnog sustava nastavlja se i nakon transplantacije bubrega [153, 154].

Posttransplantacijska anemija (PTA) u Europi se definira kao vrijednost hemoglobina niža od 120 g/L u žena i vrijednost hemoglobina niža od 135 g/L u muškaraca [105]. Danas postoji svega nekoliko studija koje su istraživale posttransplantacijsku anemiju i teško ih je uspoređivati upravo zbog razlika u definiciji anemije. Prema studiji Yorgina i sur. [156] kasna posttransplantacijska anemija definirana kao hematokrit <33% javlja se u 30% bolesnika. Njena se prevalencija povećava nakon transplantacije te se može naći u 26% bolesnika nakon 5 godina. Čak 62.5% bolesnika koji se prebačeni s terapije azatioprinom na terapiju mikofenolat mofetilom postalo je anemično. Glavni razlog za anemiju u ovoj studiji bila je smanjena egzokrina funkcija presatka. Druga, retrospektivna studija Mixa i sur. pokazala je da čak 36% bolesnika nakon 4 godine od transplantacije ima hematokrit niži od 36% što je značajno više nego nakon godinu dana kada je anemija bila prisutna u 21% bolesnika. Svega 12% od 240 bolesnika iz ove studije ima određene pokazatelje koji procjenjuju rezerve željeza [157]. Najveća studija objavljena na temu postratransplantacijske anemije bila je europska studija koja je obuhvatila 4263 bolesnika. Anemija je bila definirana kao vrijednost hemoglobina manja ili jednaka 120 g/L u žena, odnosno 130 g/L u muškaraca, pri čemu je čak 36% ispitanika zadovoljilo navedene kriterije [158]. Općenito se PTA može podijeliti na ranu i kasnu, ovisno o vremenu nastanka. Najčešći uzroci rane PTA su gubitak krvi tijekom operativnog zahvata, postoperativna krvarenja, upale, odgođena funkcija presatka, indukcijska terapija s posljedičnom supresijom koštane srži. Ne smije se zaboraviti niti nagli prekid primjene lijekova koji stimuliraju eritropoezu, a bolesnici su ih primali za vrijeme dijalize [159, 160].

Također se može razviti hemolitička anemija u 9-40% primatelja grafta kod manjih inkopatibilnosti AB0 sustava krvnih grupa primatelja i davatelja, a zbog sindroma prolaznog limfocita [161]. Ako bolesnik krvne grupe A primi bubreg davatelja krvne grupe 0 ili bolesnik krvne grupe AB primi bubreg davatelja koji je ili A ili B krvne grupe, hemolitička anemija javlja se u 14-20% slučajeva. Klinički se hemolitička anemija javlja unutar 3-22 dana nakon transplantacije, a spontani oporavak se očekuje unutar 7-10 dana [162]. Međutim, ukoliko anemija perzistira kod bolesnika s uspostavljenom funkcijom transplantiranog bubrega, potrebno je razmišljati o postojanju žarišta infekcije, gastrointestinalnog krvarenja, nedostatku željeza i/ili vitamina B12. Među lijekovima važnu ulogu imaju antiproliferativni lijekovi AZA i MMF koji inhibirajući sintezu purina dovode do supresije koštane srži [163]. no tada je anemija praćena leukopenijom i trombocitopenijom. Sirolimus dovodi do anemije interferirajući s metabolizmom željeza [164], ciklosporin i takrolimus mogu dovesti do PTA uzrokujući hemolitičko uremijski sindrom [165]., kao i ACE inhibitori i inhibitori ATR o čemu je ranije bilo govora. Najčešći uzrok kasne PTA je loša funkcija presatka zbog nedostatne sinteze eritropoetina [166] ili zbog rezistencije na eritropoetin [104]. Obzirom na širok spektar različitih patoloških stanja koja nastaju kao posljedica anemije nakon transplantacije bubrega, liječenje u prvom redu treba biti etiološko kad god je to moguće [167].

Uvođenje eritropoetina u liječenje anemije u bolesnika s kroničnim zatajivanjem bubrega dovelo je do značajnog smanjenja morbiditeta ove grupe bolesnika [168]. Omogućilo je izbjegavanje učestalih transfuzija koncentrata eritrocita, čime se i smanjilo opterećenje tekućinom bolesnika na dijalizi. Ispravljanje anemije u bolesnika s KZB dovodi do normalizacije udarnog volumena, boljeg podnošenja napora i smanjivanja hipertrofije lijeve klijetke, te u konačnici smanjenje učestalosti bolničkog liječenja i smrtnosti [169].

Smjernice za liječenje anemije bolesnika s kroničnim bubrežnm zatajivanjem, kako za vrijeme liječenja dijalizom, tako i nakon transplantacije organa publicirane su od strane više stručnih društava u svijetu, a najpoznatije su NKF-KDOQI *(National Kidney Foundation-Kidney Disease Outcome Quaility Iniciative*), KDIGO *(Kidney Disease Improving Global Outcome*) i ERBP *(European Renal Best Practice)* koja je do 2008. bila poznata kao EBPG (*European Best Practice Guidelines).*

1.5.2.2 Posttransplantacijska eritrocitoza

Među primateljima organa, posttransplantacijska eritrocitoza (PTE) se definira kao hematokrit iznad 51% koji se javlja nakon kirurškog zahvata.

Epidemiologija

PTE se javlja nakon uspješne transplantacije bubrega, a najčešće se javlja u prvih 8-24 mjeseci nakon operativnog zahvata. Učestalost PTE se kreće od 8-15% [169-172] iako postoje izvješća i o jako visokoj prevalenciji od 22.2% [173].

Etiologija i patogeneza

U značajnom je broju slučajeva eritropoeza stimulirana pojačanim stvaranjema EPO u nativnim bubrezima [174, 175]. U jednoj studiji, koncentracija EPO u serumu bila je povišena kod šest od sedam bolesnika sa PTE [176]. Selektivna kateterizacija vena nativnih i transplantiranog bubrega kod tri ispitanika pokazala je srednju serumsku vrijednost EPO 40.9 i 13.0 mU/mL. Kod jednog od bolesnika bilateralna nefrektomija dovela je do izlječenja PTE. No, serumske vrijednosti EPO ne pokazuju izravnu povezanost s nastankon PTE. Naime, u Broxovoj studiji [177]. koja je u uspoređivala serumske vrijednosti EPO kod transplantiranih koji su razvili PTE i onih koji nisu razvili PTE nije utvrđena statistički značajno viša koncentracija serumskog EPO.

Međutim, čini se kako su za razvoj PTE odgovorni drugi faktori neovisni o EPO, jer kod njih koncentracija EPO u plazmi može biti u granicama referentnih vrijednosti ili čak primjereno suprimirana zbog policitemije [178-180]. Čini se da su još nedefinirani čimbenici, a koji nisu povezani s EPO, odgovorni u preostalim slučajevima, obzirom da koncentracija EPO u plazmi može biti normalna ili čak adekvatno suprimirana [176, 178].

To je i pokazano kroz studiju u koju je bilo uključeno 15 bolesnika, a kod kojih je serumska koncentracija EPO bila povišena samo u jednog, unutar referentnog intervala u sedam i snižena u sedam bolesnika [181]. Čimbenici neovisni o EPO mogu ili povećati osjetljivost na eritropoetin ili direktno poticati eritropoezu [172]. Na primjer, povišena koncentracija *IGF-1* ili bjelančevina koje ga vežu (*IGFBP 1 i 3*) mogu potaknuti razvoj PTE [171, 174]. U jednoj seriji koja je

obuhvatila 40 primatelja organa s ili bez PTE, poboljšanje PTE uz ACE inhibitor direktno je u vezi sa sniženim koncentracijama IGF-I [181].

Opažanje da se stimulacija eritroidnih preteča serumom bolesnika na hemodijalizi koji su razvili eritrocitozu može djelomično blokirati anti *IGF-1* antitijelima, dozvoljava zaključak da je IGF-1 fiziološki aktivan u eritropoezi [180]. Također se smatra da aktivacija angiotenzin II receptora 1 (AT_1R) može pojačati stvaranje EPO u transplantatu ili povećati osjetljivost eritroidnih preteča na eritropoetin [180]. Osim toga, jasna je uloga stenoze bubrežne arterije koja posljedično dovodi do ishemije bubrežnog parenhima i povećanja produkcije EPO [181].

Zamijećeno je da se PTE značajno češće javlja kod bolesnika kod kojih nije učinjena nefrektomija nativnih bubrega, kao i kod onih koji su imali primjerenu eritropoezu prije transplantacije što se vidi u vrlo maloj ili nikakoj upotrebi lijekova koji stimuliraju eritropoezu za vrijeme dijalize [171].

Policistični bubrezi su također povezani s pojačanom eritropoezom. Nije posve jasan razlog, ali bi se mogao objasniti ishemijom bubrežnog intersticija i kompenzatornim povećanjem produkcije EPO. Karcinom bubrežnih stanica, hepatocelularni karcinom, hemangioblastom, feokromocitom i miomi maternice na sličan su način povezani s eritropoezom.

Iako su prvi izvještaji govorili u prilog razvoju PTE zbog bubrežne ishemije uslijed stenoze bubrežne arterije [184], nastavak istraživanja to nije potvrdio. Wickre i sur. [185] uspoređivali su klinička obilježja bolesnika s (53 bolesnika) i bez PTE (49 bolesnika). Incidencija PTE bila je 17%. Prikazali su porast tromboembolijskih događaja (18.9%) kod bolesnika sa PTE, usprkos venepunkcijama, u odnosu na bolesnike koji nisu razvili PTE (0%), što nije potvrđeno u drugim istraživanjima [186]. Kao rizični čimbenici za PTE tada su uočeni pušenje, šećerna bolest i vrijeme bez odbacivanja grafta, ali ne i stenoza arterije grafta. Također, uloga PTE na preživljenje grafta ostaje nerazjašnjena. Kolonko i sur [187] nisu našli povezanost između PTE i rizika od gubitka grafta ili bolesnika. Kiberd [169] je pokazao odlično preživljenje bolesnika s PTE, no uz upitno dugoročno preživljenje grafta.

Dijagnostička obrada

Iako pojačano stvaranje EPO, snižen goralatid (tetrapeptid koji inhibira eritropoezu) ili povišena koncentracija IGF-1 mogu dovesti do PTE, ovi parametri nisu u široj upotrebi u smislu rutinskog

mjerenja kod bolesnika. Obzirom da je karcinom bubrežnih stanica potencijalno fatalno stanje, preporuča se u inicijalnom pristupu bolesniku s PTE učiniti ultrazvučni pregled nativnih i transplantiranog bubrega, kao i citološku analizu uzorka urina u tri navrata kako bi se isključila mogućnost postojanja tumorskog procesa bubrega. U slučaju da je bolesnik zaražen hepatitisom B ili C i na taj način u grupi bolesnika s povišenim rizikom za razvoj hepatocelularnog karcinoma, preporučuje se učiniti ultrazvučni pregled jetre i koncentraciju alfa-feto-proteina u serumu. U primarnom pristupu se ne rade slikovne pretrage za isključenje hemangioblastoma, feokromocitoma ili mioma uterusa ukoliko ne postoji dodatna indikacija koja bi upućivala na jedno od navedenih stanja osim eritrocitoze [169, 197].

Liječenje

Cilj liječenja bolesnika s PTE je sniziti koncentraciju hemoglobina ispod 175g/L u normotenzivnih bolesnika [189]. ACE inhibitori su za sada prva i najučinkovitija terapija. Učinkovitost ACE inhibitora i blokatora AT_1R pokazana je u sistematskom pregledu osam randomiziranih istraživanja koja su uključivala 231 bolesnika. Liječenje bilo ACE inhibitorima ili antagonistima AT_1R doveli su do značajnog pada hematokrita u usporedbi s kontrolnom grupom (-4.3%). Niske doze ACE inhibitora (za početak 2.5 mg enalaprila dnevno ili 12.5 mg kaptoprila 2 puta na dan) dovode do sniženja hematokrita unutar refrentnog interval za dob i spol kod gotovo svih bolesnika s PTE unutar 2-6 tjedana od početka liječenja [172, 190-192]. Veza između ACE inhibitorima potaknutog sniženja hematokrita i pada u serumskoj koncentraciji EPO prikazana je u nekih bolesnika koji su kod uvođenja terapije imali povišene ili primjerene vrijednosti EPO u serumu [193]. No ipak ova povezanost nije uniformna, obzirom da su ACE inhibitori učinkoviti i kod bolesnika s adekvatno suprimiranom koncentracijom EPO ili kod bolesnika kod kojih nije došlo do pada EPO za vrijeme liječenja [194]. Da je riječ i o EPO neovisnom učinku govori opažanje kako ukidanje ACE inhibitora kod bolesnika s PTE dovodi do postupnog porasta hematokrita ali bez pratećeg porasta u koncentraciji EPO [195].

Nuspojave su kao i kod pacijenata liječenih zbog arterijske hipertenzije, u prvom redu suhi kašalj, koji se javlja u oko 10% slučajeva i rijetko zahtijeva kratkotrajni prekid liječenja ACE inhibitorima. Antagonist AT_1R, losartan, se također pokazao uspješnim u liječenju PTE [196, 197], ali uz nešto blaže sniženje hematokrita u odnosu na ACE inhibitore i učinak koji se javlja

najčešće unutar 8 tjedana od uvođenja lijeka. Obzirom na česte relapse PTE preporuke su da se započeta terapija daje trajno [197]. Učinak ACE inhibitora može biti posredovan *Ac-SDKP* (goralatidom), tetrapeptidom koji inhibira eritropoezu [183].

U literaturi se od klinički ispitanih i primijenjenih terapijskih mogućnosti nalazi se teofilin kao samostalna i dopunska terapija ACE inhibitorima. Teofilin djeluje kao antagonist adenozina. Adenozin potiče otpuštanje EPO, a možda i osjetljivost koštane srži na EPO. Teofilin ima usku terapijsku širinu i nije učinkovit kao ACE inhibitori [198, 199], no u onih bolesnika koji su razvili teže nuspojave na ACE inhibitore, on je za sada jedina klinički provjerena terapijska alternativa. Osim teofilina, ispitana je učinkovitost i drugog metiksantina, aminofilina, no aminofilin ne dovodi do sniženja koncentracije hemoglobina kod bolesnika sa PTE [200].

Sirolimus, kako je već ranije spomenuto, dovodi do supresije koštane srži i posljedično do anemije, najčešće kratko nakon uvođenja u terapiju. Ovaj se učinak može iskoristiti i u liječenju PTE te kalcijneurinski inhibitor zamijeniti sirolimusom [201].

Venepunkcije kao terapija preporučuju se samo u slučaju neuspjeha medikamentnog liječenja ili simptomatske eritrocitoze kada nismo u mogućnosti čekati učinak terapije.

2. HIPOTEZA

HIPOTEZA

Temeljna hipoteza ovog rada jest da bolesnici nakon transplantacije bubrega koji su razvili eritrocitozu imaju promijenjenu razinu citokina *IL-3* u odnosu na bolesnike kod kojih je postavljena dijagnoza posttransplantacijske anemije i bolesnike s urednom crvenom krvnom slikom, a temelji se na spoznaji da beta lanac IL-3R funkcionalno i fizički djeluje na EPOR čime modulira njegovo djelovanje i dovodi do PTE.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Temeljni ciljevi provedenog istraživanja jesu sljedeći:

1. identificirati rizične čimbenike za razvoj eritrocitoze u bolesnika nakon transplantacije bubrega u Republici Hrvatskoj
2. ispitati razinu citokina *IL-3* i eritropoetina u bolesnika koji su razvili PTE i usporediti je s nalazom u kontrolnim grupama

Kontrolne grupe čine bolesnici s transplantiranim bubregom koji imaju vrijednosti crvene krvne slike u referentnom intervalu za dob i spol te bolesnici koji i 6 mjeseci od transplantacije zadovoljavaju kriterije za posttransplantacijsku anemiju prema smjernicama Europskog društva za nefrologiju (ERA/EDTA, *engl. European renal association*)

Posttransplantacijska eritrocitoza je čimbenik rizika za razvoj srčanožilnih bolesti, a etiologija samog poremećaja nije posve jasna. Ovim se istraživanjem po prvi put ispituje razina *IL-3* u bolesnika s PTE i uspoređuje s navedenim kontrolnim grupama čime se doprinosi razumijevanju etiologije PTE.
Osim toga, identifikacija rizičnih čimbenika odgovornih za razvoj eritrocitoze nakon transplantacije bubrega omogućuje adekvatan i pravovremen početak liječenja i prevenciju posljedica krvožilnih bolesti nastalih zbog povećane gustoće krvi (eritrocitoze), odnosno smanjenje morbiditeta i u konačnici mortaliteta bolesnika s transplantiranim bubregom.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. ISPITANICI

U istraživanje je uključeno 90 bolesnika kod kojih je zbog terminalnog bubrežnog zatajenja učinjena transplantacija kadaveričnog bubrega. Svi bolesnici liječeni su i praćeni u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju, Klinike za unutarnje bolesti, KBC Zagreb. Bolesnici su podijeljeni u tri grupe ovisno o nalazima crvene krvne slike.

Ispitivana grupa

Ispitivanu grupu čini 30 bolesnika kod kojih je postavljena dijagnoza PTE, a nakon isključenja sekundarnih uzroka policitemije, kao što su stenoza arterije presatka, plućne bolesti ili neoplazma nativnih bubrega. Također im prije uzimanja uzoraka krvi nije ordiniran inhibitor RAS sustava u terapiji PTE.

Kontrolne grupe

Kontrolu čine dvije grupe po 30 bolesnika.

Prvu grupu čine bolesnici kod kojih perzistira anemija (definirana prema smjernicama Europskog nefrološkog društva i Europskog društva za dijalizu i transplantaciju (ERA/EDTA) iz 2009. kao hemoglobin u muškaraca <135 g/L neovisno o dobi, a u žena 125 g/L, također neovisno o dobi, točnije menopauzi. Uključni kriterij bila je anemija koja perzistira i 6 mjeseci od transplantacije uz GF $\geq$ 60 mL/min/1.73m^2 kada je manja vjerojatnost da je anemija posljedica nedovoljne sinteze EPO iz presatka.

Drugu grupu čine bolesnici s nalazima crvene krvne slike unutar referentnih vrijednosti 6 mjeseci nakon transplantacije neovisno o GF.

Niti jedan bolesnik nije bio na nadomjesnoj terapiji bilo željezom, bilo lijekovima koji stimuliraju eritropoezu (analozi humanog eritropoetina).

Grupe se ne razlikuju prema spolu i dobi.

4.2. METODE

Pregledana je dokumentacija svih bolesnika s transplantiranim bubregom koji se liječe u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju kako bi se identificirali bolesnici sa PTE. Na redovnoj kontroli u ambulanti za transplantirane bolesnike Zavoda odabrano je prvih 30 bolesnika sa PTE, nakon čega su prema dobi i spolu ispitivane grupe odabrani bolesnici iz kontrolnih grupa, također prema redoslijedu dolaska na redovnu kontrolu.

4.2.1. Pristanak za sudjelovanje u ispitivanju

Ispitivanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb (Ur. broj: 01-600/10-1-2007), te Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu (Ur.broj 04-797-2007), a svi su bolesnici potpisali obavješteni pristanak za sudjelovanje u ispitivanju.

4.2.2. Istraživani parametri

Kod svih bolesnika istraživani su klinički i laboratorijski parametri kao mogući čimbenici rizika za nastanak PTE.

Klinički parametri (na dan uzimanja uzorka periferne venske krvi za laboratorijske parametre):

- dob
- spol
- indeks tjelesne mase
- vrijednosti krvnog tlaka
- postojeće srčanožilne bolesti
- dijagnoza bolesti koja je dovela do terminalnog zatajenja bubrega
- vrijeme provedeno na dijalizi prije transplantacije
- imunosupresivni protokol
- broj antihipertenzivnih lijekova (uključujući i diuretike)
- broj lijekova za kontrolu hiperlipidemije

- postojanje stenoze arterije presatka (kolor dopler bubrežnih arterija)
- vrijeme od transplantacije u kojem se javila PTE za ispitivanu grupu

Laboratorijski parametri

- broj eritrocita (E)
- koncentracija hemoglobina (Hb)
- hematokrit (Htc)
- broj leukocita (Lkc)
- broj trombocita (Trc)
- C reaktivni protein (CRP)
- ureja
- kreatinin
- korigirani klirens kreatinina prema tjelesnoj površini
- lipidogram
    - ukupni kolesterol
    - trigliceridi
    - HDL- kolesterol
    - LDL- kolesterol
- acidobazni status (pH, parcijalni tlak kisika i ugljikova dioksida (pO_2 i pCO_2))
- koncentracija ukupnog i ioniziranog kalcija i fosfata (Ca, PO_4^{3-})
- ukupna alkalna fosfataza (ALP)
- koncentracija intaktnog paratireoidnog hormona (iPTH)
- koncentracija eritropoetina
- koncentracija *IL-3*

Promatrani laboratorijski parametri u svih su bolesnika određeni iz uzorka venske krvi dobivene punkcijom periferne vene uvijek između 8 i 9 sati ujutro radi u literaturi opisanih diurnalnih varijacija u kocentraciji eritropoetina.

Za određivanje biokemijskih parametara u serumu (ureja, kreatinin, ukupna alkalna fosfataza, kalcij, fosfat, CRP, kolesterol, trigliceridi, HDL kolesterol, LDL kolesterol) korišteni su originalni reagensi tvrtke Roche, a određivanje je provedeno na potpuno automatiziranom biokemijskom analizatoru Cobas 6000 tvrtke Roche. Uzorci krvi su prije analize centrifugirani 7 minuta na 3000 okretaja/min.
Kompletna krvna slika je rađena na hematološkom analizatoru Unicel Dx4800 tvrtke Beckmann Coulter.
Određivanje acido-baznog statusa rađeno je na uređaju Rapidlab 1265 tvrtke Siemens.

Bolesnicima je krv za određivanje koncentracije eritropoetina vađena u epruvete bez antikoagulansa. Nakon koaugulacije serum se odvaja i pohranjuje na najmanje -15^{0}C do analize ELISA (*engl. Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) testom.

Krv za određivanje koncentracije *IL-3* vadila se također u epruvete bez antikoagulansa. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 3000 okretaja/min nakon čega je nadtalog (serum) svakog uzorka odvojen u dvije kriotube i smrznut na -70^{0}C do obrade svih uzoraka također ELISA testom.
Analiza citokina *IL-3* učinjena je u Kliničkoj jedinici za staničnu imunodijagnostiku i postupke *in vitro* imunologiju Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, KBC Zagreb.

Kao i za gore navedene citokine, krv za analizu PTH se vadi u epruvete bez antikoagulansa koje se odmah po vađenju stavljaju u led obzirom na termolabilnost biološki aktivnog PTH. Uzorci se centrifugiraju te se serum odvaja i pohranjuje na najmanje -20^{0}C do analize IRMA (*engl*. ImmunoRadioMetric Assay) testom. Princip IRMA testa vrlo je sličan ELISA testu koji je opisan u daljnjem tekstu, s razlikom da je drugo protutijelo obilježeno radioizotopom, a ne enzimom, te se koncentracija ispitivanog parametra mjeri gama brojačem.
Analiza PTH rađena je u Kliničkoj jedinici za pripremu radiofarmaka i radioimunologiju Kliničkog zavoda za nuklearnu medicinu i zaštitu od zračenja KBC Zagreb.

Tablica 7. Referentne vrijednosti ispitivanih parametara za bolesnike nakon transplantacije bubrega

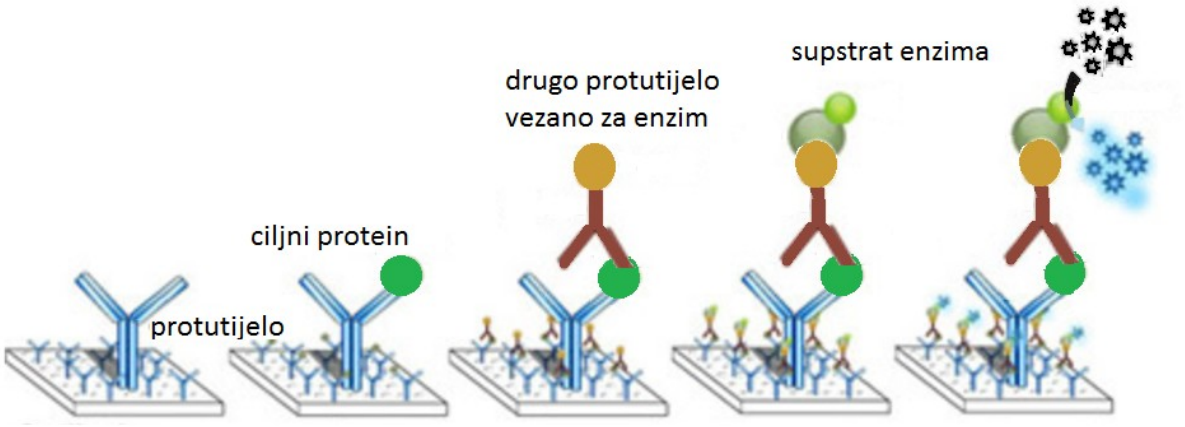
	muškarci	žene
Htc %	<51.0	<51.0
Hb g/L	>135	>120
Lkc x10^9 /L	3.4-9.7	iste
Trc x10^9 /L	158-424	iste
CRP mg/L	<5.0	iste
ureja mmol/L	2.8-8.3	iste
kreatinin umol/L	79-125	63-107
klirens kreatinina mL/min/1.73m^2	>90	iste
Kolesterol mmol/L	<5.0	iste
Trigliceridi mmol/L	<1.7	iste
HDL-kolesterol mmol/L	>1.2	iste
LDL-kolesterol mmol/L	<3.0	iste
Ca mmol/L	2.14-2.53	iste
PO_4^{3-} mmol/L	0.87-1.49	iste
iPTH pmol/L	<12.1	iste
EPO mU/mL	4.2-32.9	iste

Prilagođeno prema KDOQI smjernicama za liječenje bolesnika s KZB [202]

Analiza citokina EPO i *IL-3* metodom ELISA

Koncentracija eritropoetina i *IL-3* određena je metodom enzimskog imunoeseja ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) koristeći komercijalne kitove (Biomerica za EPO i R&D Systems za *IL-3*). U ovom testu koristi se tehnika kvantitativnog sendvič enzimskog imunoeseja (Slika 7.). Citokini se određuju u mikrotitar pločama prethodno obloženim monoklonskim protutijelima EPO odnosno *IL-3*. Dodaje se uzorak seruma te standardi. Nakon inkubacije s uzorkom, citokini se vezuju na protutijela ploče, dok se druge komponente uzorka uklanjaju

ispiranjem i aspiracijom. Sada se u mikrotitar ploče dodaje drugo protutijelo specifično za EPO odnosno *IL-3* koje je vezano za enzim. Nakon inkubacije i ispiranja viška protutijela dodaje se supstrat enzima te se razvija boja čiji je intenzitet proporcionalan razini vezanog citokina. Razvitak boje zaustavljen je dodavanjem Stop otopine (sulfatna kiselina) te se intenzitet boje može izmjeriti spektrofotometrom. Koncentracija citokina se određuje iz standardne krivulje koja se dobije mjerenjem intenziteta boje od ranije poznatih koncentracija citokina standarda. Svaki uzorak za *IL-3* određivan je dvostruko kako bi se izbjeglo odstupanje unutar samog testa što nije bilo potrebno za EPO obzirom da se radi o uobičajenoj metodi u KBC Zagreb.



Slika 7. Princip ELISA testa. Preuzeto sa http://www.elisa-antibody.com/ELISA-Introduction/protocol

Slijede podatci specifični za test svakog od određivanih citokina.

Analiza razine *IL-3* učinjena je komercijalnim kitom R&D Systems Quantikine – Human *IL-3* Immunoassay, Catalog Number D3000, koji detektira *IL-3*, a test traje 4.5 sata.

IL-3 protutijelo na mikrotitarskoj ploči je mišje monoklonsko protutijelo, dok je anti *IL-3* konjugat s peroksidazom poliklonsko protutijelo. Kao supstrat korišten je vodikov peroksid i kromogen (tetrametil benzidin). Stop otopina je sulfatna kiselina. Rezultat reakcije očitavao se spektrofotometrom na 540 nm valne dužine. Osjetljivost testa za *IL-3* je 7.4 pg/mL.

Analiza razine EPO učinjena je komercijalnim kitom Byomerica, EPO (Erythropoietin) ELISA, Catalog Number 7025, koji detektira 165 aminokiselinski lanac biološki aktivnog EPO. EPO protutijelo na mikrotitarskoj ploči je mišje monoklonsko protutijelo kao i anti *IL-3* konjugat s peroksidazom. Kao supstrat korišten je tetrametil benzidin. Stop otopina je sulfatna kiselina. Rezultat reakcije očitavao se spektrofotometrom na 450 nm valne dužine. Osjetljivost testa za EPO je 1.2 mU/mL. Referentne vrijednosti za eritropoetin u serumu su 4.3-32.9 mU/mL.

Analiza biološki aktivnog intaktnog PTH (iPTH) učinjena je komercijalnim kitom Immunotech, a Beckman Coulter Company, IRMA PTH, ref A11930, koji detektira samo intaktni PTH koji sadrži 1-84 aminokiseline. Koriste se dva protutijela specifična za različite epitope na PTH. Prvo poliklonalno protutijelo vezano je na čvrstu podlogu (staklene epruvete) i specifično je za PTH 39-84. Drugo je protutijelo monoklonalno, specifično za PTH 1-34 i obilježeno radiokativnim jodom (I-125). Rezultati se očitavaju gama brojačem podešenim na I-125. Osjetljivost testa je 0.07 pmol/L. Referentne vrijednosti za iPTH kod bolesnika s transplantiranim bubregom su do12.1 pmol/L [202].

4.3. STATISTIČKA ANALIZA PODATAKA

Podaci su obrađeni deskriptivnim metodama, prikazani tablično i grafički, a distribucije kvantitativnih obilježja testirane na normalnost Kolmogorov-Smirnovljevim testom (razina $p<=0,05$ bit će smatrana značajnom) i na homogenost varijanci različitih grupa. Za prikaz podataka korištene su mjere centralne tendencije i raspršenosti primjerene nađenim raspodjelama (medijan i raspon te centilne vrijednosti u slučaju raspodjela koje nisu normalne, a aritmetička sredina i standardna devijacija u slučaju normalnih raspodjela).

Za testiranje razlike kvantitativnih varijabli između dviju (više) grupa ispitanika korišten je Studentov t-test (analiza varijance), a u slučaju da raspodjele nisu normalne neparametrijski Mann-Whitney-ev U test (Kruskall-Wallis ANOVA). Za testiranje razlike zavisnih skupova podataka korišten je Studentov t-test za zavisne uzorke ili neparametrijski Wilcoxon-ov test za zavisne uzorke. Za testiranje proporcija korišten je χ^2 test (varijanta za nezavisne i zavisne uzorke).
Statistička analiza varijabli rađena je u programskom paketu MATLAB 8.0.0.783 (R2012b).

5. REZULTATI

5.1. OSNOVNA OBILJEŽJA BOLESNIKA

U istraživanje je bilo uključeno 90 bolesnika koji su podijeljeni u tri grupe Anemija, Normala i Eritrocitoza ovisno o vrijednosti hematokrita, a osnovna obilježja bolesnika prikazana su u Tablici 8.

Tablica 8. Osnovna obilježja bolesnika po grupama

Ime varijable	Anemija	Normala	Eritrocitoza
Broj pacijenata*	30	30	30
Muški/spol *	22 (73.3)	27 (90)	27 (90)
TT (kg) **	77.0 (69.0-87.0)	83.0 (70.0-94.0)	82.0 (75.0-88.0)
TV (m) **	1.72 (1.65-1.77)	1.76 (1.69-1.81)	1.7 (1.68-1.81)
BMI (kg/m^2) **	26.37 (24.58-28.52)	26.76 (24.51-28.98)	27.55 (25.51-28.93)
dob (godine) **	51.0 (37.0-56.0)	52.0 (48.0-62.0)	52.0 (47.0-61.0)
vrijeme provedeno na dijalizi ** (godine)	3.58 (1.99-6.22)	3.96 (3.11-9.53)	5.31 (1.67-8.92)
vrijeme razvoja eritrocitoze** (mjeseci)	-	-	9.55 (7.47-22.0)

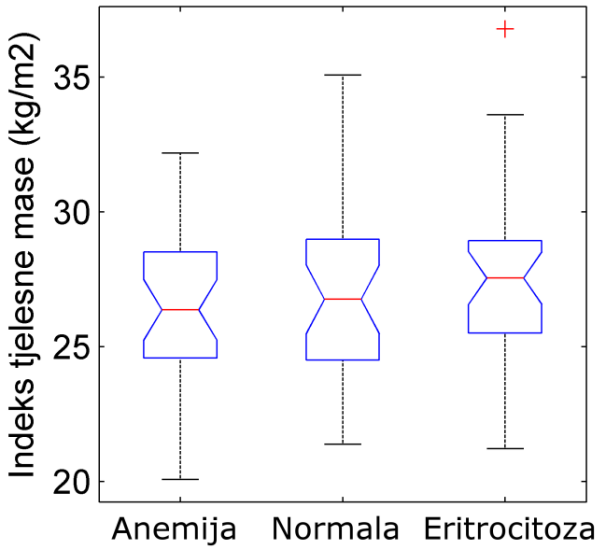
*Rezultati prikazuju broj bolesnika i % **Rezultati prikazuju medijan i interkvartilni raspon
TT-tjelesna težina, TV-tjelesna visina, BMI-indeks tjelesne mase

Ispitivanu grupu kod kojih je postavljena dijagnoza PTE činilo je 30 bolesnika čiji je medijan dobi 52 godine (47-61), od kojih je 27 (90%) muškaraca. Kontrolne grupe statistički se ne razlikuju po dobi niti po spolu u odnosu na ispitivanu grupu.

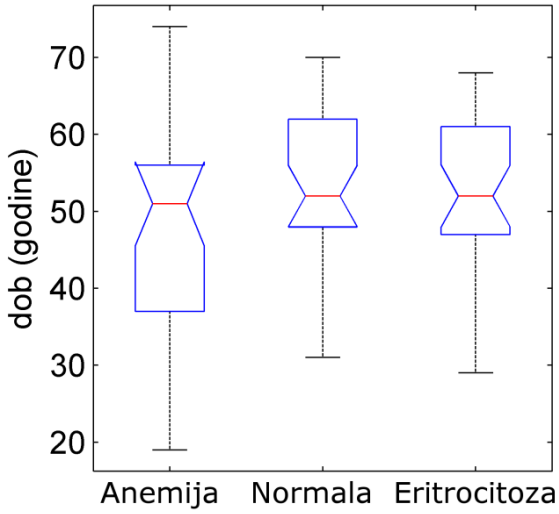
Medijan vremena provedenog na dijalizi bolesnika nije bio statistički značajno različit između grupa. U grupi Anemija medijan vremena provedenog na dijalizi prije transplantacije bubrega iznosio je 3.58 godina, uz raspon od 1.99-6.22 godine, u grupi Normala 3.96 godina uz raspon 3.11-9.53 godine, a u ispitivanoj grupi medijan vremena bio je 5.31 godinu na dijalizi prije transplantacije.

Medijan vremena u kojem su bolesnici nakon transplantacije bubrega razvili eritrocitozu iznosi 9.55 mjeseci, uz širok interkvartilni raspon od 7.47 do 22 mjeseca.

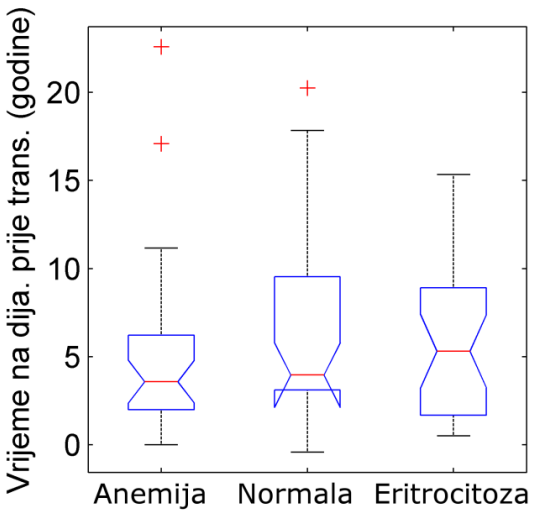
Slijede grafički prikazi osnovnih obilježja bolesnika u obliku grafova (*engl. boxplot*). Svaka kutija predstavlja interkvartilni raspon, a crvena linija unutar kutije je medijan.



Slika 8. Grafički prikaz indeksa tjelesne mase bolesnika (izraženog u kg/m^2) između grupa. Medijan za grupu Anemija iznosi 26.37 (24.58-28.52), za grupu Normala 26.76 (24.51-28.98), te za grupu Eritrocitoza 27.55 (25.51-28.93)



Slika 9. Grafički prikaz dobi bolesnika (izražene u godinama) između grupa. Medijan za grupu Anemija iznosi 51.0 (37.0-56.0), za grupu Normala 52.0 (48.0-62.0), te za grupu Eritrocitoza 52.0 (47.0-61.0)



Slika 10. Grafički prikaz vremena provedenog na dijalizi prije transplantacije bubrega (izraženog u godinama) između grupa. Medijan za grupu Anemija iznosi 3.58 (1.99-6.22), za grupu Normala 3.96 (3.11-9.53) te za grupu Eritrocitoza 5.31 (1.67-8.92)

5.2. ERITROCITOZA I ISTRAŽIVANI BIOKEMIJSKI PARAMETRI

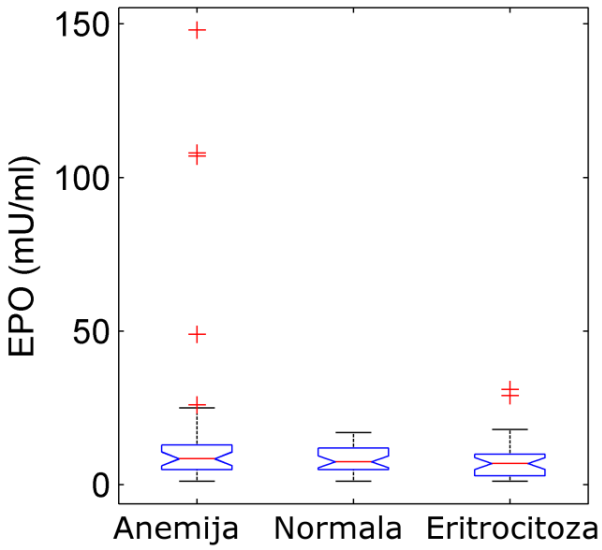
U tablici 9. navedeni su svi ipitivani biokemijski parametri te njihov medijan i interkvartilni raspon.

Tablica 9. Istraživani biokemijski parametri između grupa

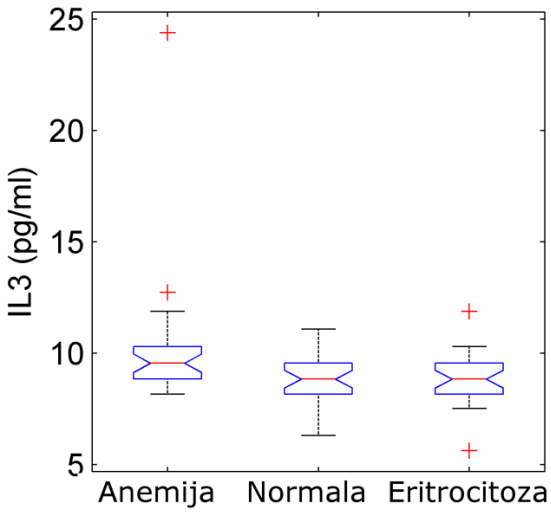
Ime varijable	Anemija	Normala	Eritrocitoza
IL3 pg/mL	9.56 (8.85-10.3)	8.85 (8.17-9.56)	8.85 (8.17-9.56)
EPO mU/mL	8.5 (5.0-13.0)	7.5 (5.0-12.0)	7.0 (3.0-10.0)
ALP IU/L	61.5 (53.0-82.0)	71.5 (63.0-83.0)	90.0 (66.0-109.0)
Erc $x10^{12}$ /L	4.04 (3.79-4.37)	4.73 (4.57-5.01)	5.91 (5.75-6.07)
Hb g/L	120.5 (114.0-126.0)	146.0 (140.0-154.0)	173.5 (171.0-178.0)
Htc %	36.65 (33.7-37.9)	43.6 (41.4-46.0)	52.55 (52.0-53.8)
Lkc $x10^9$ /L	6.75 (5.5-8.3)	6.15 (4.7-7.4)	6.35 (5.6-8.6)
Trc $x10^9$ /L	209.0 (175.0-262.0)	179.0 (162.0-211.0)	177.0 (155.0-211.0)
Kreatinin µmol/L	140.0 (123.0-173.0)	122.5 (117.0-150.0)	136.0 (117.0-155.0)
Ureja mmol/L	8.65 (7.4-10.3)	7.5 (5.8-9.4)	7.35 (6.1-8.8)
Korigirani klirens kreatinina L/min/1.73m^2	70.95 (62.1-84.3)	69.55 (61.0-79.8)	63.75 (52.4-89.9)
Kolesterol mmol/L	5.5 (4.5-5.7)	5.25 (5.0-6.0)	5.5 (4.8-6.0)
Trigliceridi mmol/L	1.8 (1.33-2.63)	2.08 (1.05-2.49)	1.96 (1.44-2.62)
HDL-kolesterol mmol/L	1.5 (1.16-1.78)	1.41 (1.2-1.87)	1.34 (1.14-1.52)
LDL-kolesterol mmol/L	2.9 (2.4-3.5)	2.9 (2.7-3.2)	3.15 (2.7-3.76)
Ca ionizirani mmol/L	1.32 (1.22-1.41)	1.32 (1.23-1.38)	1.4 (1.21-1.61)
Ca ukupni mmol/L	2.48 (2.35-2.64)	2.54 (2.49-2.65)	2.67 (2.42-2.79)
PO_4^{3-} mmol/L	1.01 (0.82-1.13)	0.91 (0.83-1.01)	0.87 (0.73-0.93)
CRP mg/L	1.2 (0.6-3.9)	1.55 (0.7-2.4)	1.3 (0.9-3.4)
iPTH pmol/L	6.65 (3.9-10.6)	8.9 (6.8-13.2)	12.3 (6.8-22.4)

Rezultati su prikazani kao medijan i interkvartilni raspon

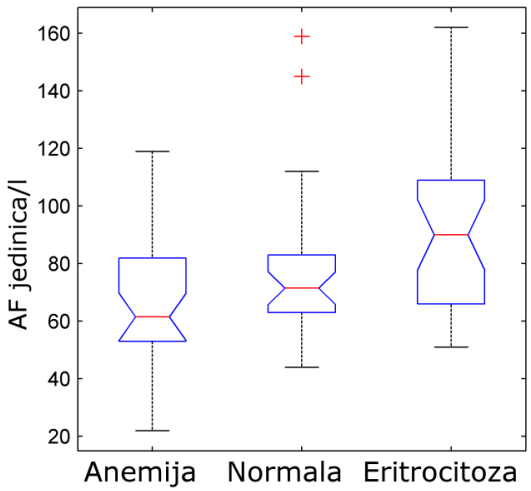
Gore navedene distribucije biokemijskih parametara prikazane su u daljnjem tekstu grafički u obliku 'boxplotova'. Boxplotovi pokazuju 5 podataka: medijan, prvi kvartil, treći kvartil, raspon podataka (minimum i maksimum u podacima) i podatke koji su od prvog ili trećeg kvartila udaljeniji više od jednog i pol interkvartilnog raspona. Svaka kutija predstavlja interkvartilni raspon, a crvena linija unutar kutije je medijan. Usjeci u kutiji predstavljaju intervale povjerenja za medijan koji služe za usporedbu medijana s drugim grupama. Ako se interval definiran tim usjecima ne preklapa s intervalom druge grupe, onda se medijani tih dviju grupa razlikuju pri nivou značajnosti 5%. Horizontalne linije koje vire izvan kutija predstavljaju raspon podataka, a sa crvenim plusevima označeni su podatci koji značajno odstupaju unutar grupe.



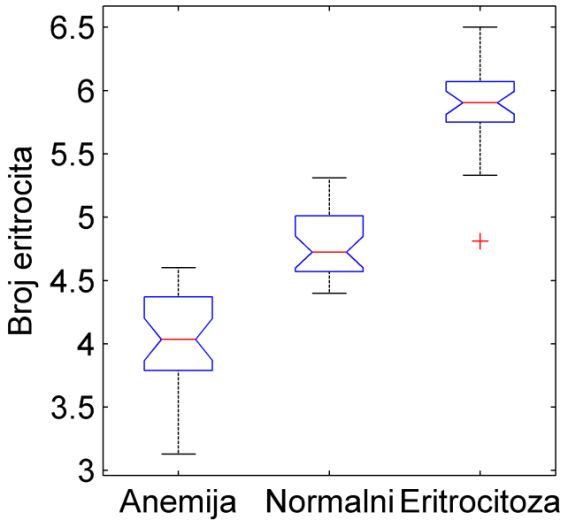
Slika 11. Grafički prikaz varijable eritropoetin (izražene u mU/mL) između grupa.
Medijan u grupi Anemija iznosi 8.5 (5.0-13.0), u grupi Normala 7.5 (5.0-12.0), te u grupi Eritrocitoza 7.0 (3.0-10.0)



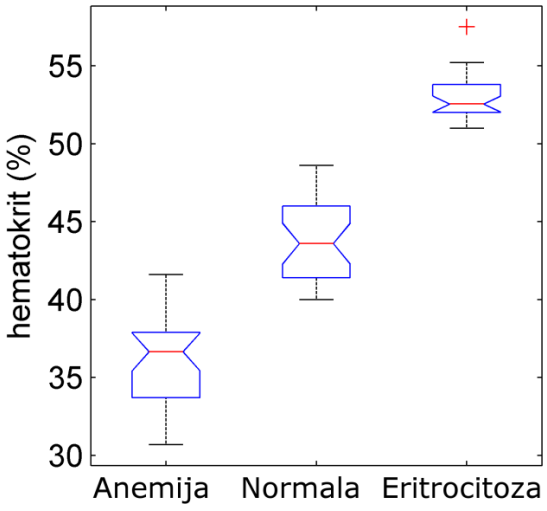
Slika 12. Grafički prikaz ispitivane varijable citokin IL3 (izražene u pg/mL) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 9.56 (8.85-10.3), u grupi Normala 8.85 (8.17-9.56), te u grupi Eritrocitoza 8.85 (8.17-9.56).



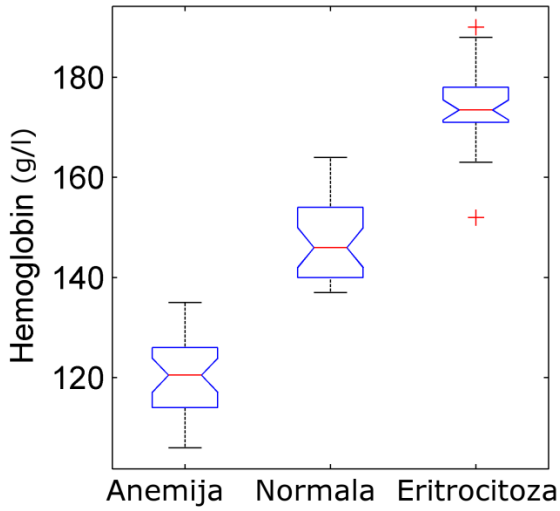
Slika 13. Grafički prikaz ispitivane varijable ukupna alkalna fosfataza (izražene u U/L) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 61.5 (53.0-82.0), u grupi Normala 71.5 (63.0-83.0), te u grupi Eritrocitoza 90.0 (66.0-109.0).



Slika 14. Grafički prikaz ispitivane varijable broj eritrocita (izražene x10^{12}) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 4.04 (3.79-4.37), u grupi Normala 4.73 (4.57-5.01), te u grupi Eritrocitoza 5.91 (5.75-6.07)

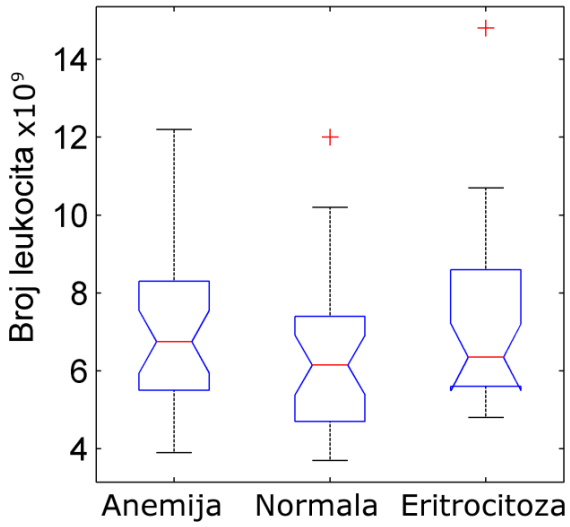


Slika 15. Grafički prikaz ispitivane varijable hematokrit (izražene u %) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 36.65 (33.7-37.9), u grupi Normala 43.6 (41.4-46.0), te u grupi Eritrocitoza 52.55 (52.0-53.8)



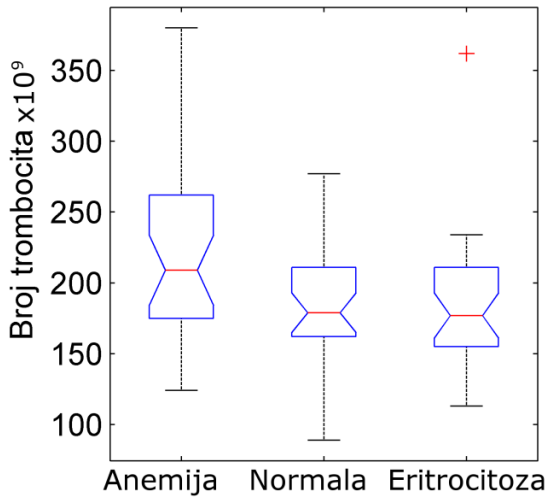
Slika 16. Grafički prikaz ispitivane varijable hemoglobin (izražene g/L) između grupa

Medijan u grupi Anemija iznosi 5.91 (5.75-6.07), u grupi Normala 146.0 (140.0-154.0), te u grupi Eritrocitoza 173.5 (171.0-178.0)

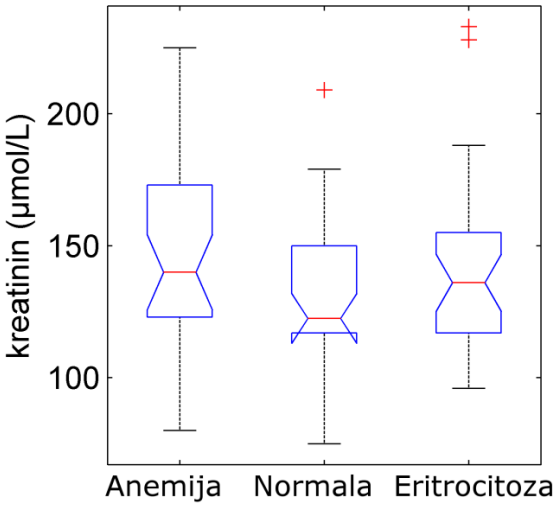


Slika 17. Grafički prikaz ispitivane varijable broj leukocita (izražene x10^9) između grupa.

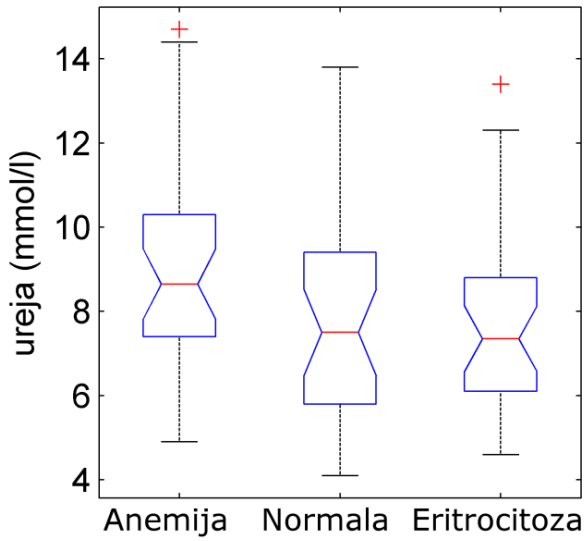
Medijan u grupi Anemija iznosi 6.75 (5.5-8.3), u grupi Normala 6.15 (4.7-7.4), te u grupi Eritrocitoza 6.35 (5.6-8.6)



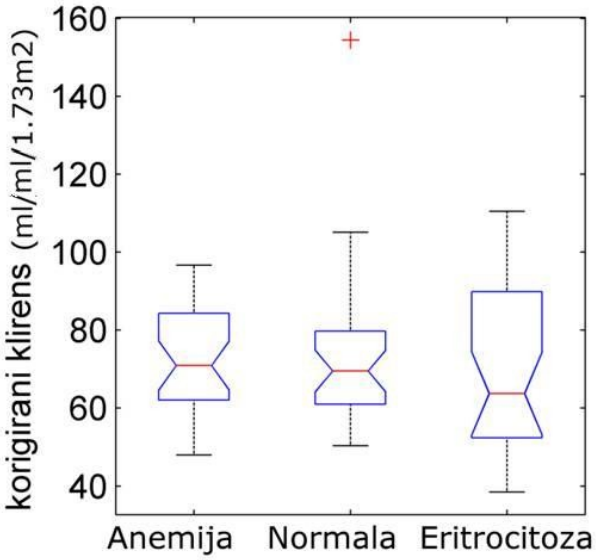
Slika 18. Grafički prikaz ispitivane varijable broj trombocita (izražene x10^9) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 209.0 (175.0-262.0), u grupi Normala 179.0 (162.0-211.0), te u grupi Eritrocitoza 177.0 (155.0-211.0)



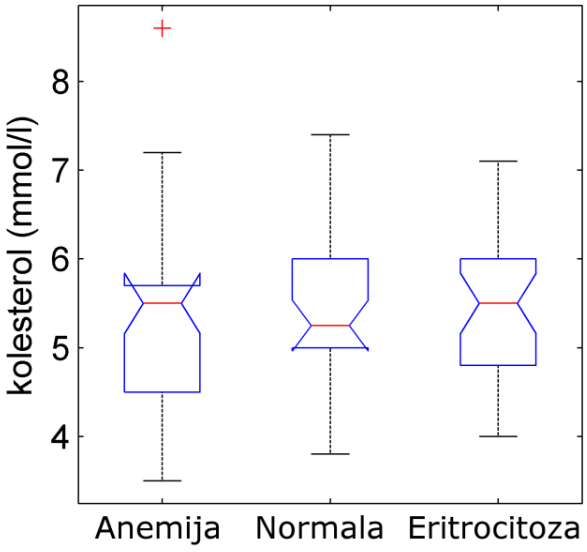
Slika 19. Grafički prikaz ispitivane varijable kreatinin (izražene u µmol/L) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 140.0 (123.0-173.0), u grupi Normala 122.5 (117.0-150.0), te u grupi Eritrocitoza 136.0 (117.0-155.0)



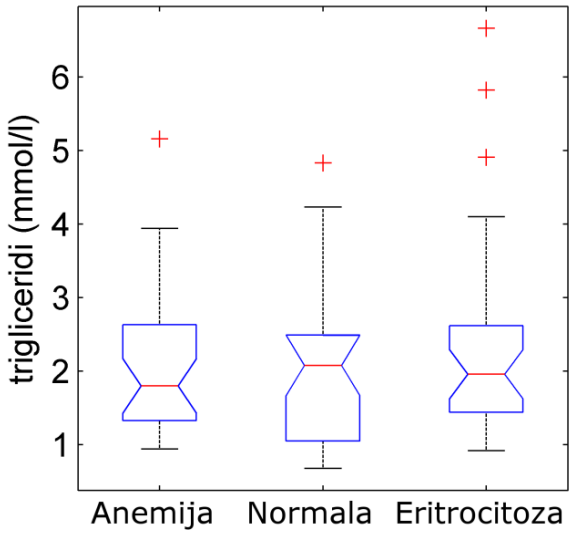
Slika 20. Grafički prikaz ispitivane varijable ureja (izražene u mmol/l) između grupa.
Medijan u grupi Anemija iznosi 8.65 (7.4-10.3), u grupi Normala 7.5 (5.8-9.4), te u grupi Eritrocitoza 7.35 (6.1-8.8)



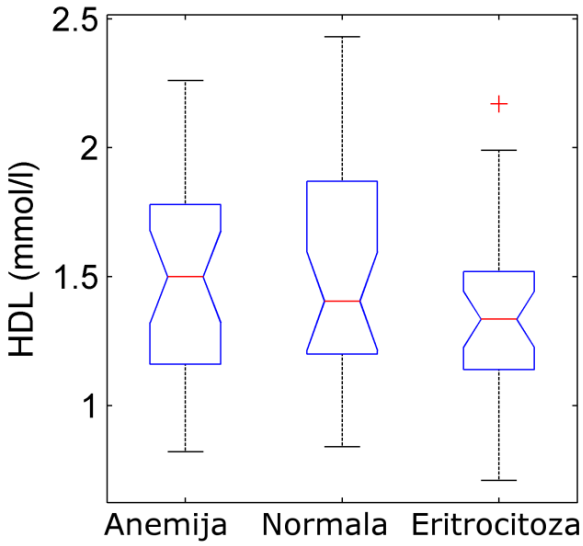
Slika 21. Grafički prikaz ispitivane varijable korigirani klirens kreatinina (izražene u mL/min/1.73m^2) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 70.95 (62.1-84.3), u grupi Normala 69.55 (61.0-79.8) , te u grupi Eritrocitoza 63.75 (52.4-89.9)



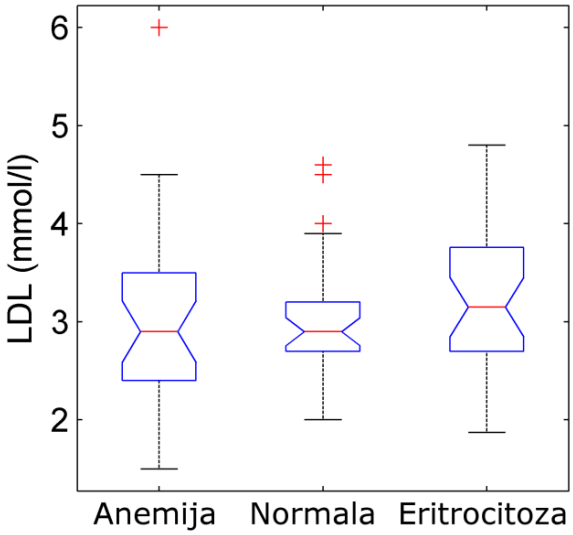
Slika 22. Grafički prikaz ispitivane varijable kolesterol (izražene u mmol/L) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 5.5 (4.5-5.7), u grupi Normala 5.25 (5.0-6.0), te u grupi Eritrocitoza 5.5 (4.8-6.0)



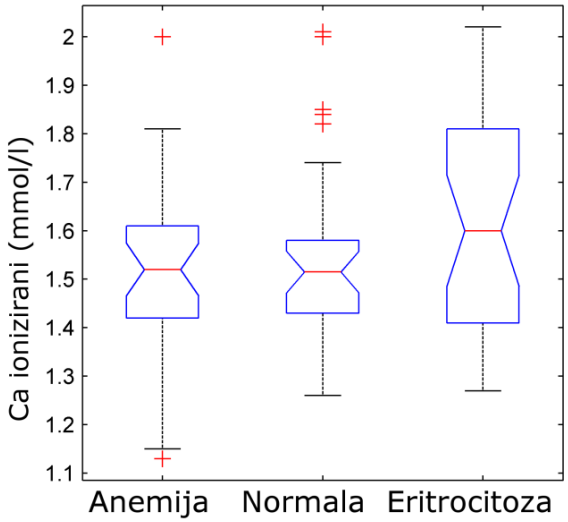
Slika 23. Grafički prikaz ispitivane varijable trigliceridi (izražene u mmol/L između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 1.8 (1.33-2.63) ,u grupi Normala 2.08 (1.05-2.49), te u grupi Eritrocitoza 1.96 (1.44-2.62)



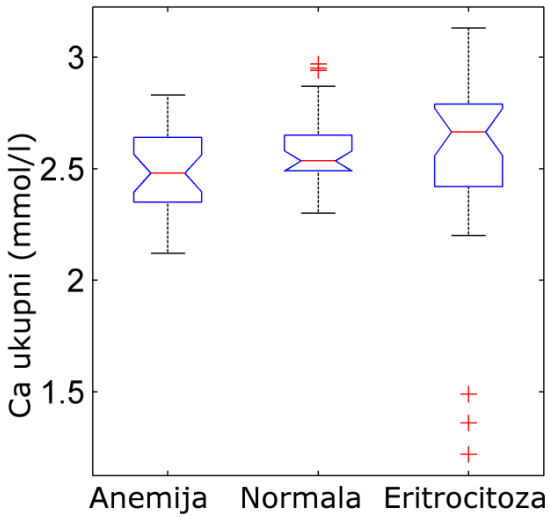
Slika 24. Grafički prikaz ispitivane varijable HDL-kolesterol (izražene u mmol/L) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 1.5 (1.16-1.78), u grupi Normala 1.41 (1.2-1.87), te u grupi Eritrocitoza 1.34 (1.14-1.52)



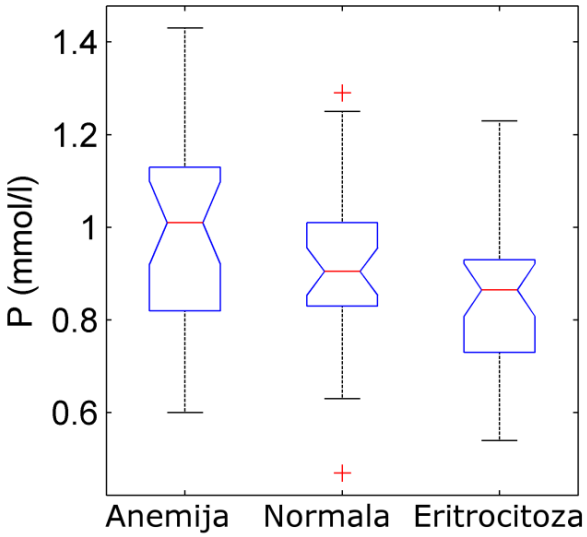
Slika 25. Grafički prikaz ispitivane varijable LDL-kolesterol (izražene u mmol/L) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 2.9 (2.4-3.5), u grupi Normala 2.9 (2.7-3.2), te u grupi Eritrocitoza 3.15 (2.7-3.76)



Slika 26. Grafički prikaz ispitivane varijable ionizirani kalcij (izražene u mmol/L) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 1.32 (1.22-1.41), u grupi Normala 1.32 (1.23-1.38), te u grupi Eritrocitoza 1.4 (1.21-1.61)

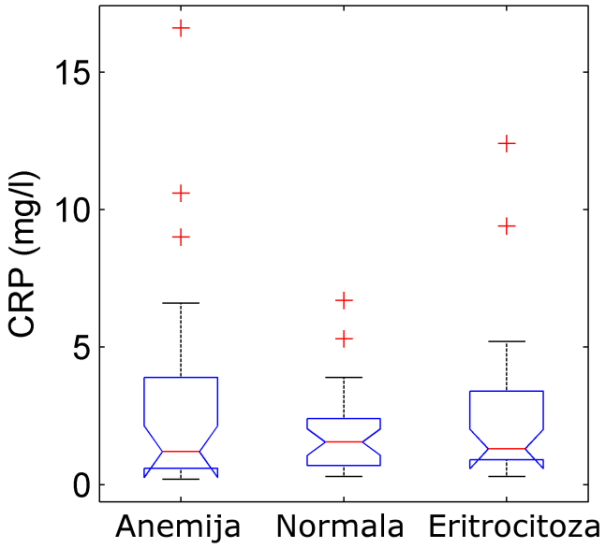


Slika 27. Grafički prikaz ispitivane varijable ukupni kalcij (izražene u mmol/L) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 2.48 (2.35-2.64), u grupi Normala 2.54 (2.49-2.65), te u grupi Eritrocitoza 2.67 (2.42-2.79)



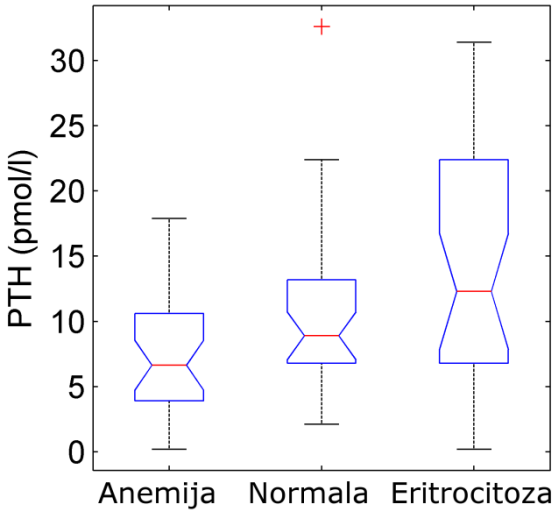
Slika 28. Grafički prikaz ispitivane varijable fosfat (izražene u mmol/L) između grupa.

Medijan u grupi Anemija iznosi 1.01 (0.82-1.13), u grupi Normala 0.91 (0.83-1.01), te u grupi Eritrocitoza 0.87 (0.73-0.93)



Slika 29. Grafički prikaz ispitivane varijable CRP (izražene u mg/L) između grupa.

Medijan u grupi Anemija iznosi 1.2 (0.6-3.9), u grupi Normala 1.55 (0.7-2.4), te u grupi Eritrocitoza 1.3 (0.9-3.4)



Slika 30. Grafički prikaz ispitivane varijable intaktni PTH (izražene u pmol/l) između grupa. Medijan u grupi Anemija iznosi 6.65 (3.9-10.6), u grupi Normala 8.9 (6.8-13.2), te u grupi Eritrocitoza 12.3 (6.8-22.4)

U Tablici 10. prikazani su biokemijski parametri koji su pokazali statistički značajnu razliku između bolesnika u grupi Eritrocitoza i kontrolnih grupa (Wilcoxon rank sum test, ekvivalent Mann-Whitney U-testu). Varijable s normalnom razdiobom su testirane dodatno ANOVA testom koji je dodatno pokazao značajnu razliku između grupa Normala/Eritrocitoza samo za varijablu iPTH, a za grupe Anemija/Eritrocitoza nije pokazao dodatnih razlika između varijabli.
Jasno je vidljiva i razlika u broju eritrocita te hemoglobinu i hematokritu na osnovu kojih su bolesnici bili uključeni u pojedinu grupu.

Tablica 10. Biokemijski parametri koji su pokazali statistički značajnu razliku između grupa

Varijabla	Anemija – Eritrocitoza	Normala - Eritrocitoza
IL3	p = 0.007	0.437
EPO	p = 0.189	0.377
ALP	p = 0.0001	0.023
Erc	p = 0.0001	0.0001
Hb	p = 0.0001	0.0001
Htc	p = 0.0001	0.0001
Trc	p = 0.02	0.652
ureja	p = 0.034	0.859
Ca uk	p = 0.039	0.304
PO_4^{3-}	p = 0.015	0.162
iPTH	p = 0.001	0.09, ANOVA p=0.04

IL3-citokin IL3, EPO-eritropoetin, ALP-ukupna alkalna fosfataza, Erc- eritrociti, Hb-hemoglobin, Htc-hematokrit, Trc-trombociti, Ca uk- ukupni kalcij, PO_4^{3-}- fosfat, iPTH-intaktni paratireoidni hormon

Citokin IL3 analiziran je u parnom serumu kako bi se izbjegle razlike u rezultatima. Korelacijski koeficijent između IL3 i IL3 parni bio je vrlo velik (0.9859) pa je u statističkoj analizi bilo potrebno koristiti samo jednu od te dvije varijable.

Vrijednosti citokina IL3 značajno se razlikuju (p=0.007) između grupa Anemija i Eritrocitoza, gdje je medijan vrijednosti serumskog IL3 od 8.85 pg/mL u grupi Eritrocitoza značajno niži od medijana od 9.56 pg/mL u serumu bolesnika u kontrolnoj grupi Anemija, što nije dokazano za vrijednost eritropoetina koja ne pokazuje statistički značajnu razliku između ispitivane i

kontrolnih grupa (p=0.189 za grupe Anemija/Eritrocitoza te p=0.377 za grupe Normala/Eritrocitoza).

Uz značajnost od p=0.001 razlikuju se serumske vrijednosti ukupne alkalne fosfataze koja je značajno viša u grupi bolesnika koji su razvili PTE (90 U/L) u odnosu na bolesnike iz grupe Anemija (61.5 U/L) ali je također statistički značajno viša i od vrijednosti AF bolesnika u drugoj kontrolnoj grupi Normala (p=0.023) što ju čini čimbenikom rizika za razvoj PTE.
Bolesnici iz ispitivane grupe Eritrocitoza imaju statistički značajno manji broj trombocita u odnosu na bolesnike u grupi Anemija (p=0.02), a medijan im iznosi 177 $x10^9$/L u odnosu na 209 $x10^9$/L u grupi Anemija.

Bolesnici koji su razvili PTE imaju medijan vrijednosti ureje 7.35 mmol/L (6.1-8.8) što je značajno niža vrijednost u odnosu na kontrolnu grupu bolesnika koji su razvili anemiju nakon uspješne transplantacije bubrega kod kojih je medijan serumske vrijednosti ureje 8.65 mmol/L (7.4-10.3) (p=0.034).

Središnja vrijednost ukupnog serumskog kalcija u ispitivanoj grupi je 2.6 mmol/L (2.41-2.81) što je značajno viša vrijednost u odnosu na bolesnike iz grupe Anemija (p=0.039) kod kojih je središnja vrijednost Ca uk 2.52 mmol/L (2.42-2.61).

Također je dokazana značajno niža koncentracija serumskog fosfata u grupi bolesnika s PTE u odnosu na bolesnike iz kontrolne grupe Anemija (p=0.015). Središnja vrijednost koncentracije P u grupi Eritrocitoza je 0.87 mmol/L (0.73-0.93), a u grupi Anemija 1.01 mmol/L uz interkvartilni raspon 0.82-1.13 mmol/L.

Posljednji biokemijski parametar koji je uz ukupnu AF pokazao najznačajniju razliku između grupa je iPTH koji je viši u ispitivanoj grupi bolesnika s PTE u odnosu na bolesnike s posttransplantacijskom anemijom (p=0.001), a u ispitivanoj grupi mu je medijan 12.3 pmol/L u odnosu na 6.65 pmol/L u kontrolnoj grupi.

5.3. KLINIČKA OBILJEŽJA BOLESNIKA S ERITROCITOZOM

Na osnovu podataka u Tablici 11. može se zaključiti da su dijagnoze osnovne bolesti koja je dovela do terminalnog zatajenja bubrega gotovo identično raspoređene po grupama, a i broj pojavljivanja pojedine dijagnoze među svim bolesnicima redovito je manji od 5 osim najčešće dijagnoze - kronični glomerulonefritis bez biopsije koji se pojavljuje u 9 (30%) bolesnika s PTE. Između grupa ne postoji statistički značajna razlika u učestalosti pojedine dijagnoze (Wilcoxon signed rank test; za par Anemija-Eritrocitoza p=1, a za par Normala-Eritrocitoza p=0.774).

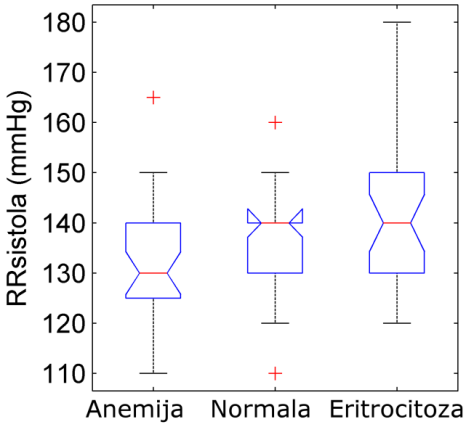
Tablica 11. Dijagnoza osnovne bubrežne bolesti po grupama

Dijagnoza	Anemija	Normala	Eritrocitoza
Zatajenje bubrega, etiologija nepoznata	3 (10)	1 (3)	5 (17)
Glomerulonefritis bez biopsije	9 (30)	10 (33.3)	9 (30)
Nefrotski sindrom s fokalnom glomerulosklerozom	0	0	1 (3)
IgA nefropatija	3 (10)	3 (10)	2 (6.7)
Membranoproliferativni GN tip I	0	2 (6.7)	2 (6.7)
Glomerulonefritis s biopsijom	2 (6.7)	3 (10)	1 (3)
Pijelo-intersticijalni nefritis (nespecificirani)	2	0	0
Pijelo-intersticijalni nefritis zbog VUR-a bez opstrukcije	1 (3)	3 (10)	1 (3)
Pijelo-intersticijalni nefritis zbog urolitijaze	0	0	1 (3)
Analgetična nefropatija	0	0	1 (3)
Policistični bubrezi, adultni tip	2 (6.7)	3 (10)	3 (10)
Cistična bubrežna bolest-drugi specifirani tip	1 (3)	0	0
Alportov sindrom	0	1 (3)	0
Oligomeganefronična hipoplazija	1 (3)	0	0
Renalna-vaskularna bolest – nespecificirana	1 (3)	0	0
Renalna-vaskularna bolest zbog hipertenzije (ne primarna vaskularna bolest)	3 (10)	2 (6.7)	2 (6.7)
Dijabetes melitus tip I	2 (6.7)	0	1 (3)
Sistemski eritemski lupus	0	1 (3)	0
Purpura Henoch-Schonlein	0	0	1 (3)
Endemska nefropatija	0	1 (3)	0

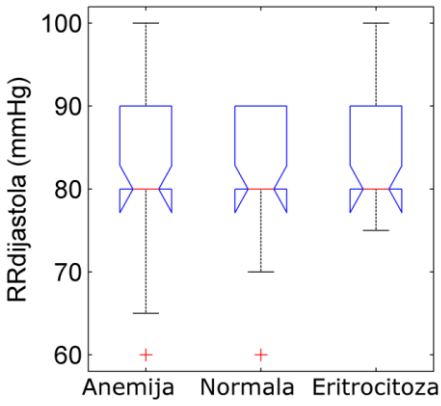
Rezultati prikazuju broj bolesnika i %.

Bolesnici iz ispitivane grupe Eritrocitoza imali su središnju vrijednost arterijskog tlaka 140/80 mmHg kao i u grupi Normala, što je u odnosu na kontrolnu grupu Anemija značajno viša sistolička komponenta arterijskog tlaka (p=0.025) čiji medijan iznosi 130/80 mmHg. Nije nađeno razlike u dijastoličkom arterijskom tlaku između grupa (p=0.192 za grupe Anemija/Eritrocitoza, te p=0.246 za grupe Normala/Eritrocitoza).

Grafički prikaz sistoličkog i dijastoličkog arterijskog tlaka prikazan je na Slici 31 i 32



Slika 31. Grafički prikaz varijable sistoličkog arterijskog tlaka (izraženog u mmHg) između grupa. Medijani i interkvartilni rasponi nalaze se u Tablici 12



Slika 32. Grafički prikaz varijable dijastoličkog arterijskog tlaka (izraženog u mmHg) između grupa. Medijani i interkvartilni rasponi nalaze se u Tablici 12

U ispitivanoj grupi bolesnika 10 (33.3%) ih je imalo epizodu akutnog odbacivanja prije pojave PTE, što se statistički ne razlikuje u odnosu na grupu Anemija (χ^2-test, p=0.242) gdje je 6 bolesnika imalo epizodu akutnog odbacivanja, te 7 bolesnika iz grupe Normala (χ^2-test, p=0.390). Srčanožilne bolesti (infarkt miokarda, kardiomiopatija, poremećaji srčanog ritma, koronarna bolest, stenoze perifernih krvnih žila) su se javile u 5 (16.7%) bolesnika s PTE što se također značajno ne razlikuje u odnosu na kontrolne grupe Anemija (χ^2-test, p=0.227) i Eritrocitoza (χ^2-test, p=0.717). Također se komorbiditeti (koji isključuju srčanožilne bolesti) ne javljaju značajno češće u grupi Eritrocitoza u odnosu na kontrolne grupe.

U Tablici 12. nalaze se kliničke karakteristike bolesnika po grupama.

Tablica 12. Kliničke karakteristike bolesnika po grupama

Varijabla	Anemija	Normalni	Eritrocitoza
RR sistolički **	130.0 (125.0-140.0)	140.0 (130.0-140.0)	140.0 (130.0-150.0)
RR dijastolički **	80.0 (80.0-90.0)	80.0 (80.0-90.0)	80.0 (80.0-90.0)
akutno odbacivanje *	6 (20)	7 (23)	10 (33.3)
srčano žilne bolesti *	2 (6.7)	3 (10)	5 (16.7)
komorbiditeti *	6 (20)	3 (10)	5 (16.7)

*Rezultati prikazuju broj bolesnika i % ; **Rezultati prikazuju medijan i interkvartilni raspon

5.4. OSOBITOSTI TERAPIJE BOLESNIKA S ERITROCITOZOM

Gotovo 97% bolesnika koji su razvili PTE u terapiji imaju antihipertenzivnu terapiju (što uključuje i diuretik), a što se statistički značajno ne razlikuje od nalaza da svi bolesnici iz grupe Normala (χ^2 test, p=0.313) imaju u terapiji lijek za kontrolu hipertenzije. Nije značajno češće korištenje antihipertenziva niti u odnosu na bolesnike s PTA (χ^2test, p=0.161).

No obradom podataka dokazana je statistički češća terapija lijekovima za kontrolu hiperlipidemije u ispitivanoj grupi u odnosu na kontrolnu grupu Anemija (χ^2-test, p=0.045). Čak 25 (83.3%) bolesnika u ispitivanoj grupi ima antilipemik u odnosu na 18 (60%) bolesnika u grupi anemičnih bolesnika. Značajna razlika nije nađena u korištenju antilipemika u odnosu na grupu u kojoj bolesnici imaju crvenu krvnu sliku unutar referentnih vrijednosti (χ^2-test, p=0.079).

Svi su bolesnici bili na trojnoj imunosupresivnoj terapiji koja je uključivala antiproliferativni lijek koji je u svim slučajevima bio MMF (mikofenolat mofetil), kalcijneurinski inhibitor koji je u 90% bolesnika s PTE bio CyA (ciklosporin), a u ostalih 10% Tac (takrolimus) te kortikosteroid. Imunosupresivna terapija također se ne razlikuje između grupa (Wilcoxon signed rank test, p=1). Specifičnu terapiju eritrocitoze, odnosno venepunkcije zahtijevalo je zbog subjektivnih smetnji čak 53.3% bolesnika.

U tablici 13. prikazana je terapija bolesnika ovisno o grupama

Tablica 13. Terapija bolesnika ovisno o grupama

Terapija	Anemija	Normalni	Eritrocitoza
antiproliferativni lijek (mikofenolat mofetil)	30 (100)	30 (100)	30 (100)
kalcijneurinski inhibitor			
- ciklosporin	29 (96.7)	28 (93.3)	27 (90)
- takrolimus	1 (3.3)	2 (6.7)	3 (10)
kortikosterodi	30 (100)	30 (100)	30 (100)
venepunkcije	-	-	16 (53.3)
antilipemik	18 (60)	19 (63.3)	25 (83.3)
antihipertenzitiv	26 (86.7)	30 (100)	29 (96.7)

Rezultati prikazuju broj bolesnika i %.

5.5. OVISNOST HEMATOKRITA O PROMATRANIM VARIJABLAMA

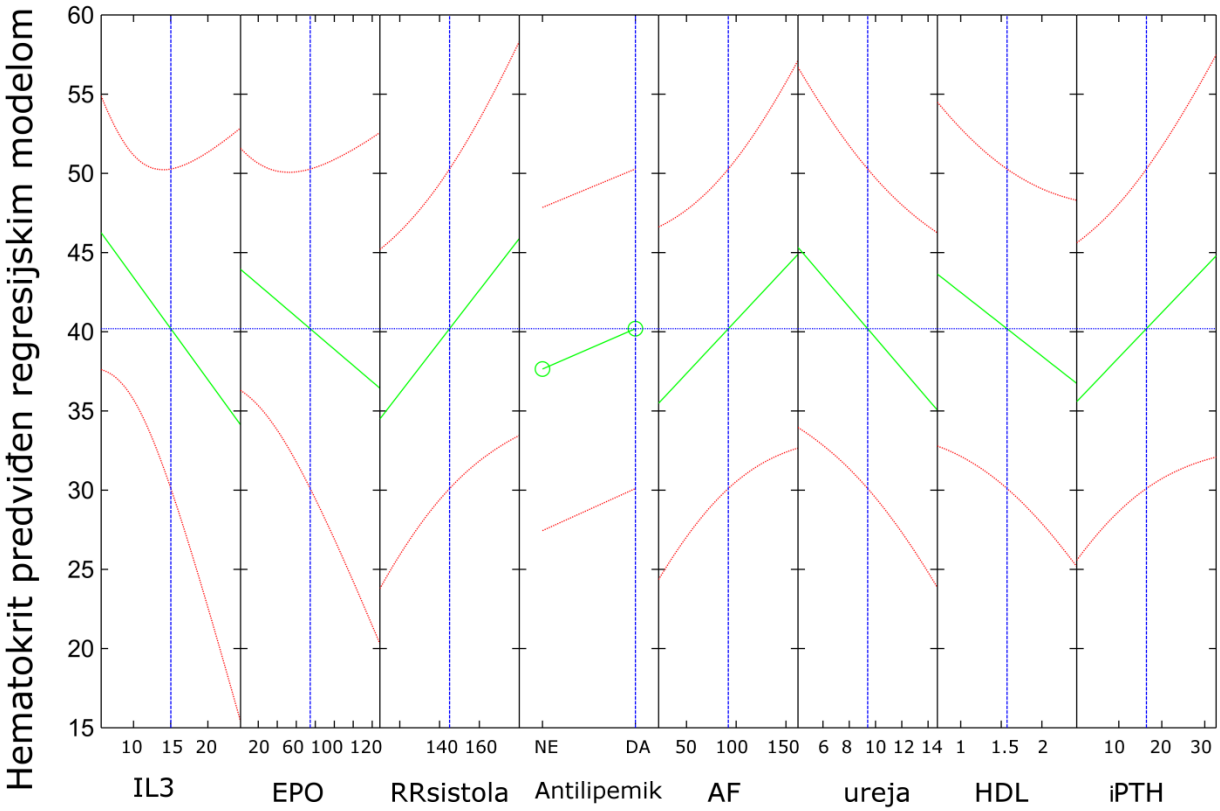
Provedena analiza o utjecaju svih promatranih varijabli na vrijednost hematokrita dala je sljedeće rezultate:

N-faktorska ANOVA analiza promatranih varijabli izdvojila je sistolički arterijski tlak (p=0.026), serumsku koncentraciju alkalne fosfataze (p=0.007) te koncentraciju ureje (p=0.034) kao statistički značajne varijable koje utječu na vrijednost hematokrita, dok je daljnja regresijska analiza potvrdila gore navedene varijable te dodatno izdvojila statistički značajan utjecaj koncentracije serumskog iPTH (p=0.0005), IL3 (p=0.017), EPO (p=0.039), HDL-kolesterola (p=0.003) te korištenje antilipemika u terapiji (p=0.035) na vrijednost hematokrita u svih bolesnika. U tablici 14. prikazane su varijable koje značajno utječu na hematokrit.

Tablica 14. Promatrane varijable koje značajno utječu na hematokrit

Promatrane varijable	Test	p
Sistolički arterijski tlak	ANOVA	0.026
AF		0.007
ureja		0.034
IL3	dodatna regresijska	0.017
EPO	analiza	0.039
iPTH		0.0005
HDL-kolesterol		0.003
korištenje antilipemika		0.0006

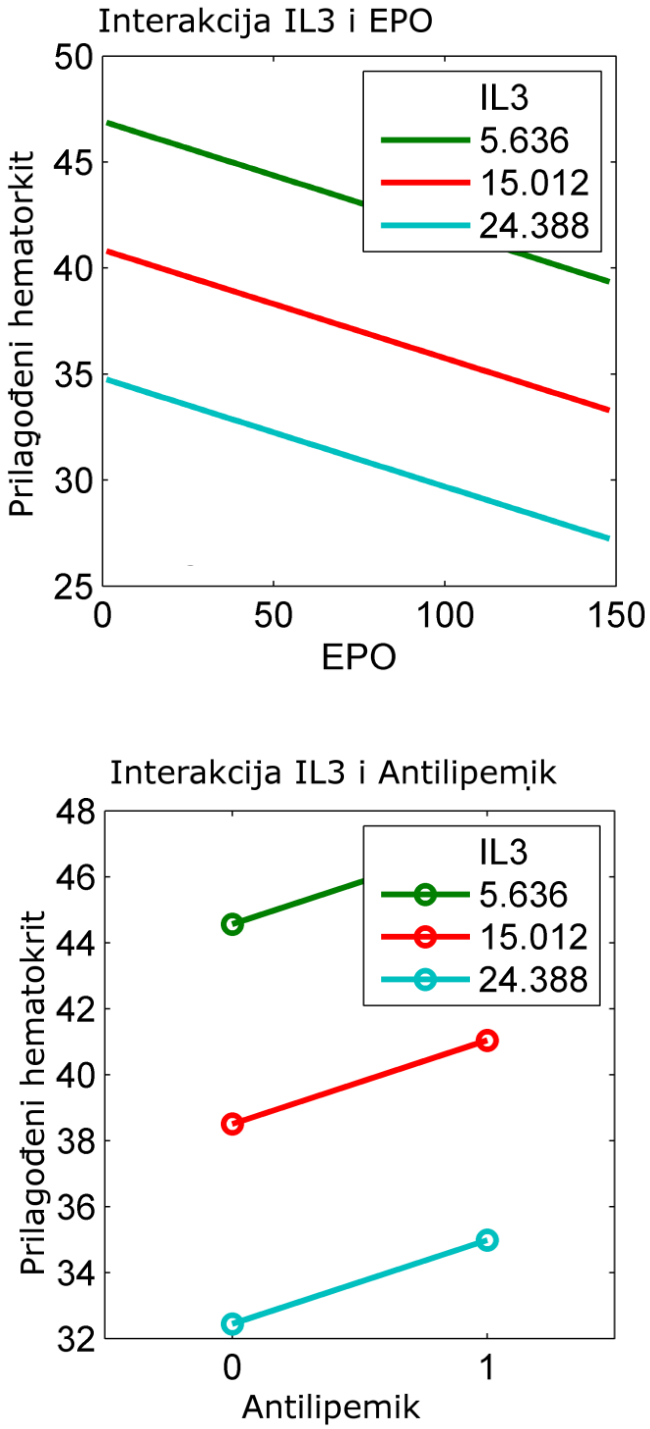
Na Slici 33. prikazana je ovisnost hematokrita o varijablama navedenim u Tablici 14.



Slika 33. Utjecaj značajnih varijabli na razinu hematokrita.

Zelena linija pokazuje očekivanu vrijednost hematokrita, dok je s crvenim linijama označen 95% interval pouzdanosti za hematokrit. Rastuća zelena linija pokazuje da hematokrit raste s porasti varijable (sistolički arterijski tlak, ukupna AF, iPTH te korištenje antilipemika), dok padajuća ima suprotno značenje, dakle što je viša koncnteracija IL3, EPO, ureje te HDL-kolesterola to je niža vrijednost hematokrita. Vertikalnom plavim linijama prikazane su odabrane vrijednosti za svaku pojedinu varijablu. Te vrijednosti rezultiraju očekivanom vrijednošću hematokrita od približno 40%, horizontalna plava linija.

U daljnjem tesktu je na Slika34 prikazana ovisnost hematokrita o parovima varijabli EPO i IL3 te IL3 i korištenje antilipemika, gdje se može zaključiti da pri padu hematokrita dolazi do porasta EPO i IL3 , te da porast hematokrita prati primjena antilipemika (0-NE, 1-DA).

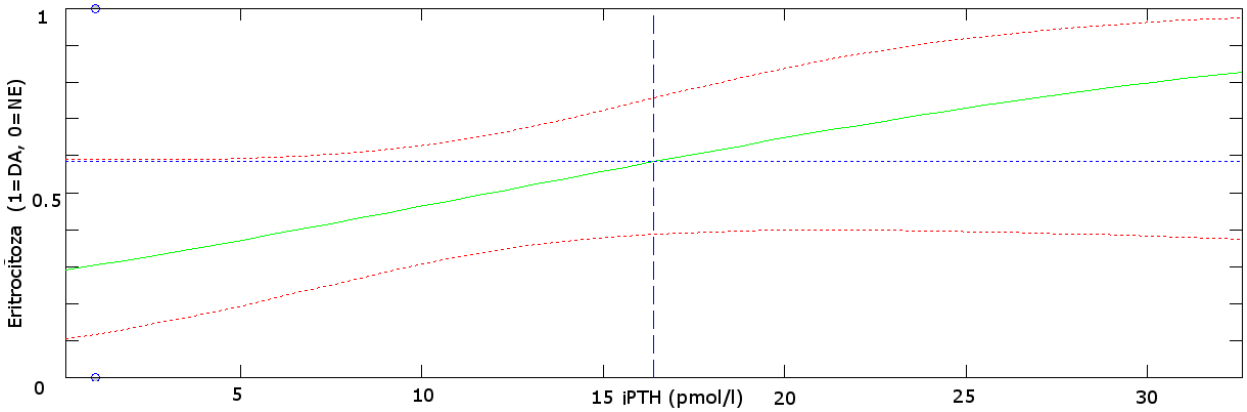


Slika 34. Analiza utjecaja parova varijabli IL3/EPO te IL3/Antilipemik na hematokrit

Prikazane su vrijednosti hematokrita samo za promjenu parova promatranih varijabli. Utjecaj ostalih varijabli je anuliran pa je izlazna varijabla nazvana „prilagođeni hematokrit“.

5.6. PTH KAO ČIMBENIK RIZIKA ZA RAZVOJ ERITROCITOZE

Slika 35 opisuje ovisnost pojave eritrocitoze o serumskoj vrijednosti paratireoidnog hormona dobivene poopćenim linearnim regresijskim modelom za predviđanje pojave eritrocitoze.



Slika 35. Utjecaj iPTH na pojavu eritrocitoze

Zelenom bojom je označena predviđena vrijednost vjerojatnosti pojave Eritrocitoze, a s crvenim linijama njeni 95% interval pouzdanosti. Prikazana je centralna vrijednost PTH (isprekidana plava linija) za koju je procijenjena vjerojatnost pojave eritrocitoze približno 0.6 (sitno isprekidana plava linija).

6. RASPRAVA

6.1. OSNOVNA OBILJEŽJA BOLESNIKA

Posttransplantacijska eritrocitoza jedna je od komplikacija nakon uspješne transplantacije bubrega, a javlja se u 8-15% bolesnika, najčešće unutar 2 godine od transplantacije [170]. Iz našeg je istraživanja vidljivo da je središnje razdoblje u kojem su bolesnici iz ispitivane grupe razvili eritrocitozu 9.55 mjeseci, odnosno u rasponu od 7.47-22.0 mjeseca što se slaže s rezultatima ostalih provedenih istraživanja [170-172].

Etiologija PTE je multifaktorijalna, a do sada su u moguću etiologiju uključeni povišen eritropoetin koji je najčešće podrijetlom iz nativnih bubrega, stenoza bubrežne arterije, pušenje, te vrijeme bez odbacivanja grafta [170]. Čimbenik oko kojeg se jednoglasno slažu svi autori jest muški spol, pri čemu se androgeni smatraju odgovornima za stimulaciju eritropoeze [170-173]. Muškarci bazalno imaju više vrijednosti hematokrita u odnosu na žene, a grupa autora pokazala je kako su potrebne više doze eritropoetina kako bi se postigle ciljne vrijednosti hemoglobina u muškaraca koji su liječeni hemodijalizom, nego u žena [204]. Također je dokazano kako testosteron direktno potiče eritropoezu stimulirajući EPO ili druge hematopoetske čimbenike rasta, te da je potrebno u anemičnih muškaraca s kroničnim zatajivanjem bubrega razmišljati i o mogućem hipogonadizmu [205]. Naši rezultati pokazuju da je od 30 bolesnika u ispitivanoj grupi, čak 27 muškaraca (90%) što također odgovara svim do sada provedenim istraživanjima.

Za izdvojiti je indeks tjelesne mase koji u svakoj od grupa pokazuje kako je većina bolesnika pretilo prema definiciji Svjetske zdravstvene organizacije koja definira pretilost kao BMI u rasponu od 25 do 29.9 kg/m^2. Središnja vrijednost BMI u grupi Eritrocitoza iznosi 27.55 kg/m^2, u grupi Anemija 26.37 kg/m^2 te 26.76 kg/m^2 u grupi Normala bez značajne razlike između grupa. Poznato je kako kod 10-20% bolesnika dolazi do porasta tjesne težine u prvoj godini nakon transplantacije [206, 207]. Najčešći razlozi tome su bolje subjektivno osjećanje, ukidanje ograničenja u prehrani, smanjena tjelesna aktivnost, te porast apetita koji je najvjerojatnije uvjetovan kortikosteroidima u terapiji [208]. Isti su autori pokazali i značajnu povezanost pretilosti s pojavom hiperlipidemije ovih bolesnika. Vrlo je vjerojatno da su i naši bolesnici razvili pretilost uglavnom nakon transplantacije, no kako u ovom istraživanju nije analizirana tjelesna težina prije transplantacije bubrega, o tome možemo za sada samo pretpostavljati.

U dijelu istraživanja o čimbenicima rizika za razvoj PTE često se javlja policistična bolest bubrega [170-173], što nije potvrđeno u našem istraživanju. Iz Tablice 11. u rezultatima koja prikazuje dijagnoze prema grupama bolesnika, vidljivo je kako nema statistički značajne razlike u etiologiji kroničnog bubrežnog zatajenja niti povezanosti pojedine dijagnoze s razvojem PTE, no treba uzeti u obzir i velik broj bolesnika kod kojih nije poznata etiologija bubrežnog zatajenja od čak 17% u ispitivanoj grupi bolesnika.

6.2. ERITROCITOZA KAO ČIMBENIK RIZIKA ZA SRČANOŽILNE BOLESTI

Arterijska hipertenzija je vrlo česta među primateljima bubrega. Njezina multifaktorska patogeneza uključuje međudjelovanje genetskog zapisa darivatelja i primatelja s više okolišnih čimbenika koji su prethodili transplantaciji (etiologija bubrežnog zatajenja, vrijeme provedeno na dijalizi, vrlo često pridružene kardiovaskularne bolesti s aterosklerozom i arteriosklerozom, imunosupresivni protokol, funkcija presatka ali i kirurške ili terapijske komplikacije) [209]. Posttransplantacijska hipertenzija značajan je čimbenik koji multiplicira pozitivnu korelaciju - kronično bubrežno zatajivanje - srčanožilna bolest te je potrebna čim bolja kontrola arterijskog tlaka ovih bolesnika [92, 93, 209]. Prije uvođenja ciklosporina u imunosupresiju, prevalencija arterijske hipertenzije u bolesnika s PTE bila je 55%, da bi izvješća iz postciklosporinske ere govorila u prilog povećanju prevalencije na oko 80% [178, 185, 199, 210], što se ne razlikuje značajno od prevalencije u općoj populaciji (oko 50% i 70% u pre- i postciklosporinskom razdoblju) [211].

Kako ciklosporin, uz steroide, koje u terapiji imaju svi bolesnici uključeni u ovo istraživanje, kao nuspojavu u značajnoj mjeri imaju i arterijsku hipertenziju [117], uz već prikazanu pretilost gotovo svih bolesnika koja je značajno češće udružena s hipertenzijom [212], ne iznenađuje nalaz visokih vrijednosti arterijskog tlaka, odnosno korištenja antihipertenziva u 26 od 30 (86.7%) bolesnika u grupi Anemija, 29 od 30 (96.7%) u grupi Eritrocitoza, do korištenja antihipertenziva u svih bolesnika u grupi Normala.

Analiza varijable arterijskog tlaka, odnosno njegove sistoličke komponente (ali ne i dijastoličke), pokazala je statistički značajnu razliku u njihovim vrijednostima između ispitivane grupe i kontrolne grupe Anemija što je grafički prikazano na slici 31. i slici 32. u rezultatima.

Središnji arterijski tlak u grupi Anemija iznosi 130 mmHg uz raspon od 125-140 mmHg, dok je u grupi Eritrocitoza središnja vrijednost sistoličkog tlaka 140 mmHg uz raspon od 130-150 mmHg, naravno uz antihipertenzivnu terapiju. Iz navedenog se može zaključiti da je hipertenzija jednako učestala između grupa, no da ju je teže kontrolirati u ispitivanoj grupi bolesnika čemu može biti uzrok povećana viskoznost krvi uslijed hiperlipidemije i policitemije što sve dovodi do poremećaja protoka krvi [213]. *Tromso* studija iz sjeverne Norveške [214] u kojoj je istraživan utjecaj PTH i izlučivanja kalcija urinom na arterijsku hipertenziju na 8 128 pojedinaca primjerene bubrežne funkcije i normokalcijemije pokazala je jasan utjecaj PTH na hipertenziju, no još uvijek nepoznatog mehanizma.

Analiza podataka o korištenju antihipertenziva nije pokazala statistički značajnu razliku između ispitivane i kontrolnih grupa, odnosno gotovo svi bolesnici u svim grupama imaju u terapiji antihipertenziv što je i očekivano obzirom na imunosupresivni protokol i učestalost arterijske hipertenzije u transplantiranih bolesnika kao zasebnog čimbenika rizika za ishemijsku bolest srca odnosno kongestivnog srčanog zatajenja što su u svom istraživanju pokazali Riggato i sur. [154].

Analiza prikupljenih podataka pokazala je značajnu razliku u pojavi antilipemika u terapiji između ispitivane grupe Eritrocitoza i kontrolne grupe Anemija u korist ispitivane grupe, što se nije pokazalo u međuodnosu grupa Eritrocitoza i Normala, kao niti za ostalu ispitivanu terapiju bolesnika s posttransplantacijskom eritrocitozom (antihipertenzivi te trojna imunosupresivna terapija). Hiperlipidemija je vrlo česta u bolesnika s KZB i ima svoje specifičnosti koje se manifestiraju hipertrigliceridemijom, povišenim serumskim LDL-kolesterolom i sniženim HDL kolesterolom koji je jedini čimbenik rizika za srčanožilnu bolest u stanjima dislipidemije [215], a koji je u našem istraživanju izdvojen kao čimbenik koji djeluje na koncentraciju hematokrita. Zbog gore navedenog statini su vrlo česta terapija nakon transplantacije bubrega. No dosadašnja istraživanja pokazuju kako statini ipak ne ublažavaju oksidativni stres, upalu, manjak HDL kolesterola ili srčanožilnu smrtnost [216].

Nekoliko istraživanja pokazalo je važnost kolesterola za adekvatnu proliferiraciju eritroidnih prastanica u slučajevima kompenzatorno pojačane eritropoeze, kao što je slučaj u kroničnim anemijama s visokim stupnjem proliferacije eritroidnih stanica (talasemija, kongenitalna diseritropoetska anemija tip I, sferocitoza) [217,218]. Kolesterol, točnije njegova distribucija unutar eritroidnih preteča, ključna je za njihovo sazrijevanje izbacivanjem jezgre.

Međutim isto je tako u eksperimentalnom modelu na miševima pokazano kako povećana koncentracija kolesterola dovodi do supresije eritropoeze u koštanoj srži [219]. Kako su sva do sadašnja istraživanja usmjerena na povezanost hipokolesterolemije u stanjima pojačane eritropoeze kao adaptacijskog mehanizma na anemiju (hipoksiju), statistički značajnu razliku u korištenju antilipemika na razini značajnosti od 5% u korist ispitivane grupe može se objasniti povećanom potrošnjom kolesterola u kontrolnoj grupi Anemija. Odnosno, značajno rjeđe korištenje antilipemika u kontrolnoj grupi Anemija najvjerojatnije je posljedica pojačane potrebe za kolesterolom zbog pojačane aktivnosti koštane srži kako bi se kompenzirala anemija. U tom je slučaju i potreba za antilipemicima manja nego u ispitivanoj grupi.

No moguće je da u slučajevima neadekvatne ili nekontrolirane eritropoeze, kao što je to u slučaju PTE, je hiperkolesterolemija samo dodatni mehanizam kojim se pokušava suprimirati eritropoeza [220]. Ovakvo bi razmišljanje moglo objasniti statistički značajno češću upotrebu antilipemika u ispitivanoj grupi, odnosno da je hiperkolesterolemija kao posljedica imunosupresivne terapije ovih bolesnika dodatno povećana kompenzatornim povećanjem u svrhu smanjenja neadekvatne eritropoeze bolesnika s PTE čime je potrebna i veća upotreba antilipemika u terapiji.

Treba napomenuti da istraživanja u posljednjih nekoliko godina [221,222] navode kako hiperlipidemija povećava rizik za stvaranje produkata oksidacije lipida koji se tada nakupljaju u subendotelnim prostorima krvnih žila i kosti a koji suprimiraju osteogenezu u kulturama stanica i potiču razgradnju kosti u miševa. Isto je istraživanje dovelo do zaključka kako hiperlipidemija inducira hiperparatireoidizam što može djelomično objasniti i rezultate našeg istraživanja u kojima se ALP i iPTH značajno razlikuju između grupa i javljaju se kao čimbenici rizika za PTE što je grafički prikazano na slici 2. u rezultatima.

Grupe se međusobno statistički značajno ne razlikuju po učestalosti krvožilnih bolesti koje uključuju i tromboembolijske incidente. Iako su Wickre i sur. prikazali porast tromboembolijskih

događaja (18.9%) kod bolesnika s PTE, usprkos venepunkcijama, u odnosu na bolesnike koji nisu razvili PTE (0%) [185], to nije potvrđeno u drugim istraživanjima [186].
Također nije nađena statistički značajna razlika u učestalosti komorbiditeta (isključujući osnovnu bolest koja je dovela do terminalnog zatajenja bubrega i krvožilne bolesti kao moguće komplikacije PTE ili posttransplantacijske anemije).

Iako su Kessler i sur. [171] te Wickre i sur. [185] pokazali kako je jedan od čimbenika koji utječu na pojavu eritrocitoze i vrijeme bez odbacivanja grafta, takav nalaz nije potvrđen u našem istraživanju. Objašnjenje ovakvog rezultata je moguće i u napretku imunosupresivne terapije i sve manjem broju akutnih odbacivanja u svim grupama primatelja bubrega, obzirom da navedena istraživanja datiraju iz 1996. i 1983. godine.

6.3. ERITROCITOZA I ISTRAŽIVANI BIOKEMIJSKI PARAMETRI

Interleukin-3 je pleiotropni čimbenik rasta koji stimulira proliferaciju, diferencijaciju i preživljenje pluripotentnih hematopoetskih matičnih stanica kao i velik broj drugih progenitora specifičnih za pojedinu lozu [55,56]. Rezultati dobiveni analizom koncentracije citokina IL-3 u serumu bolesnika uključenih u istraživanje, pokazuju statističi značajno nižu koncentraciju citokina IL-3 u ispitivanoj grupi bolesnika s PTE (Slika 12 u Rezultatima) u odnosu na bolesnike s PTA, što se može djelomično objasniti spoznajom da beta lanac IL-3R funkcionalno i fizički djeluje na EPOR čime modulira njegovo djelovanje [203] što je i osnovna hipoteza ovog istraživanja. Na taj način bi IL-3 u slučajevima kada PTE nije uvjetovana hipersekrecijom EPO mogao djelovati i preko receptora za EPO zbog čega su potrebne i njegove niže serumske koncentracije za isti učinak. No treba uzeti u obzir i mogućnost da u dijela bolesnika dolazi do modulacije EPOR ili djelovanja hematopoetskih čimbenika rasta (IL-3) uslijed primjene imunosupresivne terapije.

Ovakav se rezultat može objasniti i potrebom za većom koncentracijom hematopoetskih čimbenika rasta u stanjima pojačane hematopoeze, odnosno u ovom slučaju kod bolesnika s posttransplantacijskom anemijom [212]. Značajnost ovog rezultata je tim veća što je svim

statističkim metodama odbačena značajna razlika između grupa u koncentraciji eritropoetina. Štoviše, medijani za varijablu EPO su vrlo slični između grupa što je vidljivo iz Tablice 9. u prikazu Rezultata. Ovakvi rezultati koji ne govore u prilog eritrocitozi kao posljedici povećanog lučenja eritropoetina iz nativnih bubrega slažu se i s rezultatima Broxove studije [177] te istraživanjima Glicklicha i sur. koji su istraživali utjecaj inhibicije RAS na vrijednost EPO u bolesnika s PTE i pokazali kako ne dolazi do pada serumskog EPO uz remisiju PTE na terapiji ACE inhibitorima [223]. Grafički prikaz varijable EPO ovisno o grupama (Slika 11 u Rezultatima), prikazuje u grupi Anemija 4 bolesnika (crveni križići, EPO - 49, 107, 108 i 149 mU/mL) koji imaju izrazito povišene vrijednosti serumskog eritropoetina kao fiziološki, kompenzacijski odgovor na anemiju, dok se od 30 ispitivanih bolesnika u grupi Eritrocitoza samo u 2 bolesnika javlja značajno povećana serumska vrijednost EPO koja bi mogla biti odgovorna za PTE (EPO 31 i 37 mU/mL). U tom je slučaju povećano lučenje EPO najvjerojatnije podrijetlom iz nativnih bubrega jer niti jedan naš bolesnik nije binefrektomiran.

Hiperkalcijemija je od ranije poznata kao čimbenik koji dovodi do hipertenzije što su prikazali Sabanayagam i sur. na 3437 odraslih osoba [224]. Također su pokazali kako je s hipertenzijom statistički značajno povezana samo koncentracija ukupnog, a ne i ioniziranog kalcija, što se slaže i s našim istraživanjem kojim nismo dokazali značajnu razliku u vrijednostima ioniziranog kalcija među grupama. Ovaj bi mehanizam mogao biti i odgovoran za teže kontroliranu hipertenziju u bolesnika s PTE. Hiperkalcemija se u našem istraživanju statistički značajno češće javlja u grupi Eritrocitoza u odnosu na Anemija što se slaže i s istraživanjem Kurelle i sur. [224] koji su na 283 bolesnika od kojih su 73 razvila PTE, pokazali da je hiperkalcemija snažan neovisan prediktor porasta hematokrita, odnosno da je povezan s razvojem posttransplantacijske eritrocitoze. Do sličnih su rezultata došli i Akcay i sur. [225]. No u niti jednom od dosadašnjih istraživanja uz hiperkalcemiju nije dokazan hiperparatireoidizam, što je u našem istraživanju i dokazano. Hiperkalcemija se javlja u čak 5-15% bolesnika nakon transplantacije bubrega i to najčešće uzrokovana sekundarnim hiperparatireoidizmom (SHPT) [213], što odgovara i incidenciji PTE, no još nije dokazano da regulacija hiperkalcemije dovodi do remisije bolesti. Pojavnost hiperkalcemije (Ca>2.43 mmol/L) u našem istraživanju je 46.7%, od kojih je 38.1% (16/42) u grupi Eritrocitoza što također odgovara dosadašnjim ispitivanjima o pojavnosti hiperkalcemije te utjecaju kalcija na pojavu PTE. Značajno visok broj bolesnika s

hiperkalcemijom u našem istraživanju uvjetovan je dijelom i specifičnim odabirom bolesnika, odnosno trećinom bolesnika s eritrocitozom koji se uglavnom nalaze u prvoj godini nakon transplantacije, a nisu analizirani podatci o vremenu nakon transplantacije za ostale bolesnike. Hiperkalcemija nakon transplantacije bubrega nije uvjetovana samo SHPT, već je nekoliko istraživanja potvrdilo povezanost hiperkalcemije kako s povećanom pregradnjom kosti tako i s adinamičnom kosti bolesnika s KZB. Drugi mogući mehanizam koji potiče razvoj hiperkalcemije, posebno u prvoj godini nakon transplantacije bubrega kada je hiperkalcemija najčešća [226], jest porast koncentracije kalcitriola zbog pojačane sinteze u bubrežnim tubulima čija je sinteza i dalje potaknuta SHPT i niskim serumskim P. Također je nakon korekcije uremičnog miljea nakon uspješne transplantacije pojačana osjetljivost kosti na PTH. Kako se kod većine bolesnika PTE manifestira u prve 2 godine od transplantacije, mogući uzrok u dijela bolesnika kod kojih dolazi do spontane remisije bolesti može biti i hiperkalcemija koja ima tendenciju pada nakon prve godine, te potencijalno tako dovodi do remisije bolesti. U posljednje se vrijeme javlja sve više istraživanja kako kalcij doprinosi stimulaciji sinteze EPO u suradnji sa RAS čija je inhibicija okosnica terapije PTE [227], dok su Schafer i sur. [228] u *in vitro* studiji pokazali kako lijekovi koji dovode do povećanja ioniziranog kalcija oponašaju učinak EPO na ekspresiju c-myb gena (*engl. c-myeloblastosis*), protoonkogena koji sudjeluje u negativnoj regulaciji hematopoeze, te aktiviraju sintezu hemoglobina u eritroleukemičnim stanicama ovce.

Koncentracija fosfata pokazala se statistički značajno različitom između grupa Eritrocitoza i Anemija, s višim vrijednostima u grupi Anemija, što se može objasniti i značajnom razlikom u vrijednostima paratireoidnog hormona (kao i za vrijednost ukupnog kalcija) između ove dvije grupe čiji je medijan u grupi Anemija 6.65 pmol/L (3.9-10.6), dok je medijan iPTH u grupi Eritrocitoza 12.3 pmol/l uz raspon od 6.8-22.4 pmol/l.

Varijabla koja se pokazala statistički značajno različitom između ispitivane grupe i obje kontrolne grupe je vrijednost ukupne alkalne fosfataze (ALP) koja je time identificirana kao rizični čimbenik za razvoj eritrocitoze. ALP služi kao biokemijski pokazatelj koštane pregradnje i koristi se za praćenje bolesti koštanog metabolizma u bolesnika s KZB [229] Za razliku od PTH koji nastaje u paratireodinim žlijezdama i utječe na koštani metabolizam, serumska AF dolazi iz same kosti i odražava aktivnost koja se zbiva unutar kosti. Rastuće vrijednosti AF najčešće se u

nefroloških bolesnika vide u pogoršanju stupnja koštane pregradnje [230]. Grupa autora [231] radila je istraživanje na 74 zdrava dobrovoljca kojima su analizirali parametre crvene krvne slike i koštanih biomarkera prije, te 10 i 20 tjedana nakon intenzivnog vježbanja i uspoređivali su ih s nalazima kontrolne grupe koja nije bila podvrgnuta intenzivnim treninzima. Očekivano je došlo do porasta ukupnog broja eritrocita i hematokrita u ispitivanoj grupi, ali i uz značajan porast vrijednosti koštane alkalne fosfataze. Autori su zaključili kako je eritrocitopoeza povezana s porastom biomarkera koštane pregradnje što objašnjavaju i mogućom ekstramedularnom eritropoezom u kostima, što bi u našem slučaju objasnilo zašto je samo ova varijabla uz iPTH značajno različita između obje kontrole grupe, vjerojatno kao posljedica intenzivne eritropoeze u bolesnika sa PTE. No kako smo dokazali i statistički značajno povišen iPTH između grupa, moguće je da je barem dijelom povišena vrijednost ALP u grupi Eritrocitoza posljedica povećane osteoblastične aktivnosti u sklopu renalne osteodistrofije, što bi išlo u prilog razmišljanju tome da naši bolesnici s PTE imaju povećanu koštanu pregradnju, a ne adinamičnu bolest kosti ili osteomalaciju. Kako alkalna fosfataza može biti povećana i kao rezultat poremećaja jetrene funkcije [232] koja nije bila uključena u naše istraživanje treba s oprezom uzeti rezultat značajne razlike u vrijednostima ALP među grupama.

Analiza broj trombocita pokazala je također značajnu razliku između ispitivane i kontrolne grupe Anemija, odnosno niže vrijednosti u bolesnika s PTE, što je bilo za očekivati obzirom da u slučajevima patološke eritropoeze u koštanoj srži dolazi i do smanjenja broja megakariocita koji su potisnuti eritroidnim pretečama [233]. Isti autori su pokazali kako trombocitopenija nije uzrokovana niti manjkom trombopoetinske mRNA niti manjkom samog čimbenika rasta u plazmi.

6.4. OVISNOST HEMATOKRITA O PROMATRANIM VARIJABLAMA

Varijable koje su izdvojene ANOVA testom kao statistički značajnima za vrijednost hematokrita su sistolički arterijski tlak ($p=0.026$), serumska koncentracija alkalne fosfataze ($p=0.007$) te koncentracija ureje ($p=0.034$), dok je daljnja regresijska analiza pokazala statistički značajan utjecaj koncentracije serumskog PTH ($p=0.0005$), IL3 ($p=0.017$), EPO ($p=0.039$), HDL-

kolesterola (p=0.003) te korištenje antilipemika u terapiji (p=0.035) što je prikazano u Tablici 14. u Rezultatima.

Na Slici 34. u Rezultatima prikazana je ovisnost hematokrita o EPO i IL-3 gdje je vidljivo da koncentracije EPO i IL-3 rastu kod niskih vrijednosti hematokrita što je očekivano obzirom na pojačanu eritropoezu u stanjima anemije i potrebu za većim koncentracijama hematopoetskih čimbenika rasta.

Kako je već ranije rečeno, hiperlipidemija je vrlo česta u bolesnika i manifestira se hipertrigliceridemijom, povišenim serumskim LDL-kolesterolom i sniženim HDL-kolesterolom. Kako je već navedeno u raspravi o antilipemicima u terapiji nakon transplantacije, homeostaza kolesterola je vrlo važna kako za sazrijevanje eritrocita, tako i za održavanje stanja mirovanja hematopoetskih matičnih stanica i multipotentnih progenitornih stanica [234]. Isti su autori na životinjskom modelu pokazali kako miševi s manjkom ABCA1 (*engl. ATP-binding (ABC) cassette transporter*) i ABCG1 transportera koji omogućuju izlazak kolesterola iz makrofaga te stvaranje HDL-kolesterola, manifestiraju dramatičan porast u mobilizaciji hematopoetskih matičnih stanica te ekstramedularne hematopoeze koja bi u našem istraživanju mogla djelomično objasniti povišenje ALP u grupi s PTE. Ovaj se proces mogao ne samo zaustaviti već usmjeriti u suprotnom smjeru povišenjem koncentracije HDL-kolesterola. Takve je rezultate objavila i druga grupa autora [235] koja je dodatno pokazala kako stimulacija mijeloidnih prastanica u koštanoj srži ‘’wild type’’ miševa IL-3 ili GM-CSF značajno smanjuje izražaj ABCA1 i ABCG1 transportera te posljedično tome potiče mobilizaciju hematopoetskih matičnih stanica. Na istom su modelu dokazali povećanje broja stanica u koštanoj srži koje izražavaju β podjedinicu receptora za IL-3 za 2-5 puta, ovisno o manjku ABCA1 i/ili ABCG1 transportera. U konačnici su zaključili kako povećan sadržaj kolesterola u stanicama zbog nedostatka transportera koji bi omogućili njegovo iskorištavanje u sintezi HDL-kolesterola dovodi do povećanog izražaja β podjedinice receptora za IL-3/GM-CSF koji zatim dovodi do povećane aktivacije Ras/Erk signalnog puta i povećanog proliferativnog odgovora na IL-3 i GM-CSF što bi moglo dodatno objasniti rezultate našeg israživanja i značajno manju koncentraciju IL-3 u grupi s PTE u kojoj je značajno češće korištenje antilipemika u odnosu na grupu Anemija.

Sljedeća varijabla koja je pokazala statistički značajnu razliku između ispitivane grupe i grupe Anemija je ureja koja je značajno viša u bolesnika s posttransplantacijskom anemijom. U ispitivanoj grupi srednja vrijednost ureje iznosi 7.35 mmol/L (6.1-8.8), dok je kod anemičnih bolesnika srednja vrijednost 8.65 mmol/L uz raspon od 7.4-10.3. Ureja je također izdvojena i kao čimbenik koji djeluje na vrijednost hematokrita. Poznato je iz više istraživanja kako se PTE najčešće javlja zbog pogoršanja bubrežne funkcije, odnosno zbog smanjene sinteze EPO, što smo mi u našem istraživanju pokušali izbjeći isključujući bolesnike kod kojih je korigirani klirens kreatinina bio ispod 60 mL/min/1.73m^2. No isto je tako poznato da sama anemija pogoršava bubrežnu funkciju što za bolesnike s PTE nije dokazano, naprotiv oni imaju vrlo dobru funkciju grafta usprkos policitemiji [185] što bi objasnilo nižu koncentraciju ureje u ispitivanoj grupi bolesnika. Također je poznato kako uremični milje inhibira funkciju koštane srži [104, 108] što može doprinositi anemiji u kontrolnoj grupi.

6.5. iPTH KAO ČIMBENIK RIZIKA ZA RAZVOJ ERITROCITZE

Eksperimentalna *in vitro* istraživanja jasno su pokazala esencijalni značaj kalcija u fiziološkoj, ali i u poremećenoj eritropoezi. No, javlja se sve više razmišljanja kako se za kliničke manifestacije u slučaju hiperkalcijemije (nefrokalcinoza, skraćeno preživljenje grafta, krvožilne kalcifikacije, pankreatitis, eritrocitoza) možda djelomično može okriviti i sam paratireoidni hormon [226]. Autori koji su prikazali pojavu policitemije u slučaju karcinoma paratireoidnih žlijezda također navode mogućnost da iPTH potiče eritropoezu ne posljedičnom hiperkalcemijom, već direktno potičući sintezu ili aktivnost drugih hematopoetskih čimbenika rasta [236]. Coppolino i sur. [237] istraživali su utjecaj iPTH na hematopoetske i endotelne matične stanice u 80 uremičnih bolesnika, te su dokazali kako iPTH dovodi do značajnog porasta CD34+ stanica. Tome u prilog bi išlo i naše istraživanje koje je jasno izdvojilo iPTH kao rizični čimbenik za razvoj PTE što se vidi i na Slici 30 u Rezultatima gdje je prikazan utjecaj iPTH na pojavu PTE.

Koncentracija ukupnog kalcija koja je značajno veća u ispitivanoj grupi također samostalno dovodi do porasta hematokrita čime doprinosi utjecaju iPTH, ali se prema našim podatcima još uvijek ne može nazvati čimbenikom rizika što nije dokazano niti od strane drugih autora.

Ta činjenica nameće ideju da bi se možda boljom kontrolom sekundarnog hiperparatireodizma mogla bolje kontrolirati i pojačana eritropoeza u 8-15% bolesnika kod kojih se javlja. Do sada se smatralo kako je paratireoidektomija najbolje riješenje u slučaju hiperparatireoidizma nakon transplantacije, no treba početi razmišljati i o kalcimimeticima, ali uz oprez obzirom na ionako velik broj lijekova koje ovi bolesnici primaju.

Regidor i sur. [238] su na 73 960 bolesnika na hemodijalizi dokazali povezanost koncentracije alkalne fosfataze u serumu s rizikom od kardiovaskularne smrti ne objašnjavajući moguću patogenezu. Iako KDOQI smjernice o poremećajima kosti i minerala u bolesnika s kroničnim zatajivanjem bubrega [202] na osnovi opsežnog sistematskog pregleda literature daju detaljne upute o ciljnim vrijednostima serumskog kalcija, anorganskog fosfora, produkta CaxP i koncentracije iPTH ovih bolesnika, vrlo su oskudne informacije o alkalnoj fosfatazi, a nema podataka o poželjnom rasponu ALP u serumu ovih bolesnika. Kako je naše istraživanje identificiralo ukupnu alkalnu fosfatazu kao čimbenik rizika za razvoj eritrocitoze, bit će potrebna dodatna istraživanja s značajnijim usmjerenjem na AF kao čimbenika koji sudjeluje u eritropoezi bolesnika nakon transplantacije bubrega.

7. ZAKLJUČAK

ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja zaključila sam sljedeće:

1. Rizični čimbenici za razvoj eritrocitoze nakon transplantacije bubrega su

   - ukupna alkalna fosfataza
   - paratireoidni hormon

2. Varijable koje značajno utječu na vrijednost hematokrita su

   - citokin *IL-3*
   - eritropoetin
   - sistolički arterijski tlak
   - ukupna alkalna fosfataza
   - ureja
   - HDL-kolesterol
   - paratireoidni hormon
   - terapija antilipemicima

8. SAŽETAK

SAŽETAK

Uvod: Posttransplantacijska eritrocitoza (PTE) definira se kao povećanje vrijednosti hematokrita primatelja iznad 51%. Javlja se u 8-15% bolesnika, najčešće unutar 2 godine od transplantacije. Kod 25% bolesnika dolazi do spontane remisije bolesti. Etiologija PTE je multifaktorska. Smatra se da je u brojnim slučajevima eritrocitoza uvjetovana hipersekrecijolm eritropoetina (EPO) najčešće iz nativnih bubrega. Poremećaj renin-angiotenzin sustava (RAS) smatra se najvažnijim čimbenikom rizika. Ostali poznati čimbenici su muški spol, pušenje te vrijeme bez odbacivanja grafta. Liječenje PTE inhibicijom RAS sustava uspješno je u 90% bolesnika.

Ispitanici i metode: U istraživanje je uključeno 90 bolesnika nakon transplantacije bubrega koji se liječe i prate u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju, Klinike za unutrašnje bolesti, KBC Zagreb. Bolesnici su podijeljeni u tri grupe: bolesnike koji su razvili PTE, bolesnike koji su razvili posttransplantacijsku anemiju (PTA, Hb <135 g/L u muškaraca, Hb < 120 g/L u žena), te bolesnike s urednim nalazima crvene krvne slike (CKS). Istraživana je razlika u koncentraciji eritropoetina, paratireoidnog hormona, IL-3, biokemijskih i kliničkih parametara koji se analiziraju na redovitim kontrolama.

Rezultati: 90% bolesnika s PTE bili su muškarci, središnje dobi 51 godinu. Središnje razdoblje razvoja PTE je 9.55 mjeseci (7.47-22.0) od transplantacije. Hiperkalcemija (p=0.039) i hipofosfatemija (p=0.015) su značajno češće u bolesnika s PTE nego u bolesnika s PTA. Intaktni paratireoidni hormon (iPTH) i ukuona alkalna fosfataza (ALP) značajno su viši u PTE grupi u odnosu na bolesnike s PTA (p=0.001, p=0.0001) te bolesnike s urednom CKS (p=0.04, p=0.023). Značajno je viša koncentracija IL-3 u grupi s PTA u odnosu na bolesnike s PTE. Nismo našli razlike u vrijednostima EPO između grupa. Sistolički arterijski tlak bio je značajno viši u grupi bolesnika s PTE i normalnom CKS u odnosu na bolesnike s PTA (p=0.025). Značajno je češća upotreba antilipemika u grupi s PTE nego u grupi s PTA (p=0.0006), dok nema značajne razlike u upotrebi antihipertenziva koja se kreće od 86.7% u grupi s PTE do 100% u grupi s normalnom CKS.

Zaključak: Naše istraživanje je izdvojilo iPTH i ALP kao čimbenike rizika za razvoj PTE, dok eritropoetin, sistolički arterijski tlak, ureja, IL-3, HDL-kolesterol te terapija antilipemicima pokazuju značajan utjecaj na vrijednost hematokrita.

9. ABSTRACT

ABSTRACT

Risk factors for development of erythrocytosis after kidney transplantation
Željka Mustapić, 2013

Introduction: Posttransplant erythrocytosis (PTE) is a persistently elevated hematocrit level greater than 51% that occurs in 10% to 15% of graft recipients, usually within 24 months from engraftment. Spontaneous remission of PTE is observed in 25% of patients. Excess erythropoietin (EPO) production, usually from native kidneys may play an important role in etiolgy, but the most important factor in developing PTE include renin-angiotensin system (RAS). Other predisposing factors are male gender, smoking and rejection-free course. Inactivation of the RAS represents the most effective therapeutic modality in 90% of patients.

Patients and methods: We enroled 30 patients with PTE, 30 patients with posttransplant anemia (PTA) and 30 patients with normal RBC after kidney transplantation at Department of nephrology, arterial hypertension, dialysis and transplantation, UHC Zagreb. PTA was defined as hemoglobin (Hb) <135 g/L in male and Hb<120 g/L in female recipients. We evaluated EPO, parathyroid hormone (IPTH), interleukin-3 (IL-3) and routine biochemical and clinical findings at regular outpatient control.

Results: 90% of patients with PTE were male, with median age of 51 years (37.0-56.0). Median time for PTE development was 9.55 months after engrafment (7.47-22.0). Hypercalcemia (p=0.039) and hypophosphatemia (p=0.015) were more frequent in PTE group than in PTA group. IPTH and alkaline phosphatase (ALP) were significantly more elevated in PTE group than in PTA group (p=0.001, p=0.0001) and in normal RBC group (p=0.04, p=0.023). Serum IL-3 levels were increased in PTA group compared to others. Baseline serum EPO levels were similar for all patients. Systolic BP in PTE and normal RBC group was higher than in PTA group (p=0.025). Patients with PTE had more frequent statins in therapy than PTA patients (p=0.0006), while antihypertensive therapy showed no differencies between groups. 86.7% patients in PTA group, 96.7% in PTE and all patients with normal RBC had antihypertensive therapy.

Conclusion: Our results identified iPTH and ALP as risk factors for development of erythrocytosis after kidney transplantation, and sistolic BP, EPO, IL-3, BUN, HDL-cholesterol and statin therapy as factors significantly influencing hematocrit level.

10. LITERATURA

LITERATURA

1. Laslo P, Spooner CJ, Warmflash A, Lancki DW, Lee HJ, Sciammas R et al. Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. Cell 2006; 126:755–66
2. Kim SI, Bresnick EH. Transcriptional control of erythropoiesis: emerging mechanisms and principles. Oncogene 2007; 26:6777–94
3. Mikkola HK, Klintman J, Yang H, Hock H, Schlaeger TM, Fujiwara Y et al. Haematopoietic stem cells retain long-term repopulating activity and multipotency in the absence of stem-cell leukaemia SCL/tal-1 gene. Nature 2003; 421:547-51
4. Yan J, Chen YX, Desmond A, Silva A, Yang Y, Wang H et al. Cdx4 and menin co-regulate Hoxa9 expression in hematopoietic cells. PLoS ONE 2006; 1:e47
5. Valge-Archer VE, Osada H, Warren AJ, Forster A, Li J, Baer R et al. The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1994; 91: 8617-21
6. Porcher C, Liao EC, Fujiwara Y, Zon LI, Orkin SH. Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. Development1999;126:4603–15
7. Marc A. Kerenyi and Stuart H. Orkin, Networking erythropoiesis, J. Exp. Med. 2007; 12: 2537-41
8. Fujimaki S, Harigae H, Sugawara T, Takasawa N, Sasaki T, Kaku M. Decreased expression of transcription factor GATA-2 in haematopoietic stem cells in patients with aplastic anaemia. Br J Haematol 2001; 113:52-7
9. Marc A. Kerenyi and Stuart H. Orkin, Networking erythropoiesis, J. Exp. Med. 2007; 12: 2537-41
10. Zheng J, Kitajima K, Sakai E, Kimura T, Minegishi N, Yamamoto M et al. Differential effects of GATA-1 on proliferation and differentiation of erythroid lineage cells. Blood 2006; 107:520-7
11. Galloway JL, Zon LI. Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. Curr. Top. Dev. Biol 2003;53:139–58

12. Gutiérrez L, Tsukamoto S, Suzuki M, Yamamoto-Mukai H, Yamamoto M et al. Ablation of Gata1 in adult mice results in aplastic crisis, revealing its essential role in steady-state and stress erythropoiesis. Blood 2008; 111:4375-85
13. Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, Zipursky A. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. Blood 2003; 101:4301-4
14. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production, J Physiol 2011; 589(6):1251-58
15. Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S Yamamoto M. Repression via the GATA box is essential for tissue-specific erythropoietin gene expression. Blood. 2008; 111(10):5223-32
16. Noguchi CT. Where the EPO cells are?. Blood 2008; 111:4836-37
17. Noguchi CT, Wang L, Rogers HM, Teng R, Jia Y. Survival and proliferative roles of erythropoietin beyond the erythroid lineage. Expert Rev Mol Med. 2008;10e36
18. Brines M, Cerami A, Discovering erythropoietin's extra hematopoietic functions: biology and clinical promise, Kidney Int 2006; 70:246-50
19. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. Science 2004; 305:239–42
20. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. Cell 1995; 83:59-67
21. Koury ST, Koury MJ, Bondurant MC, Caro J, Graber SE. Quantitation of erythropoietin-producing cells in kidneys of mice by in situ hybridization: correlation with hematocrit, renal erythropoietin mRNA, and serum erythropoietin concentration. Blood 1989; 74:645-51
22. Stiehl D, Wirthner R, Koditz J, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. J Biol Chem 2006; 281:23482-91
23. Tsuchiya T, Okada M, Ueda M, Yasukochi Y. Activation of the erythropoietin promoter by a point mutation from GATA to TATA in the -30 region. J Biochem 1997; 121(2);193–6

24. Imagawa S, Nakano Y, Obara N, Suzuki N, Doi T, Kodama T et al.A GATA-specific inhibitor (K-7174) rescues anemia induced by IL-1β, TNF-α, or L-NMMA. FASEB J 2003; 17(12):1742–4
25. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, Wieswner M et al. Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2alpha target gene in Hep3B and Kelly cells. FASEB J. 2004; 18(12):1462–4
26. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, Keith B et al. Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. Blood 2010; 116(16):3039–48
27. Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR et al. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell 2001; 107(1):43–54
28. McNeill LA, Hewitson KS, Claridge TD, Seibel JF, Horstfall LE, Schofield CJ. Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the beta-carbon of asparagine-803. Biochem J 2002; 367(3):571–5
29. Koivunen P Hirsila M, Gunzler Y, Kivirikko KI, Myllyharju J. Catalytic properties of the asparaginyl hydroxylase (FIH) in the oxygen sensing pathway are distinct from those of its prolyl 4-hydroxylases. J Biol Chem 2004;279(11):9899–904
30. Miller ME, Cronkite EP, Garcia JF. Plasma levels of immunoreactive erythropoietin after acute blood loss in man. Br J Haematol 1985; 52:545–9
31. Stiehl DP, Wirthner R, Koditz J, Spielmann P, Camenisch G, Wenger RH. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. J Biol Chem 2006; 281:23482-91
32. Gross AW, Lodish HF. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and novel erythropoiesis stmulating protein (NESP). J Biol Chem 2006; 281:2024–32
33. Birgegard G, Wide L, Simonsson B. Marked erythropoietin increase before fall in Hb after treatment with cytostatic drugs suggests mechanism other than anaemia for stimulation. Br J Haematol 1989; 72(3):462–6

34. Gunga HC, Rocker L, Behn C, Hildebrandt W, Koralewski E, Rich I et al. Shift working in the Chilean Andes (> 3,600 m) and its influence on erythropoietin and the low-pressure system. J Appl Physiol 1996; 81(2):846–52
35. Dunn A, Lo V, Donnelly S. The role of the kidney in blood volume regulation: the kidney as a regulator of the hematocrit. Am J Med Sci 2007; 334: 65–71.
36. Vlahakos DV, Marathias KP, Madias NE. The role of the renin-angiotensin system in the regulation of erythropoiesis. Am J Kidney Dis 201; 56(3):558–65
37. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. Circulation. 2002; 106:2973–9
38. Beleslin-Cokic BB, Cokic VP, Yu X, Weksler BB, Schechter AN, Nguchi CT. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells. Blood. 2004; 104(7):2073–80
39. Kanagy NL, Perrine MF, Cheung DK, Walker BR. Erythropoietin administration in vivo increases vascular nitric oxide synthase expression. J Cardiovasc Pharmacol. 2003; 42(4):527–33
40. Tada H, Kagaya Y, Takeda M, Ohta J, Asaumi Y, Satoh K et al. Endogenous erythropoietin system in non-hematopoietic lineage cells plays a protective role in myocardial ischemia/reperfusion. Cardiovasc Res. 2006; 71(3):466–77
41. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. J Clin Invest. 2003; 112(7):999–1007
42. Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T, Zhang J, Xu M et al. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. Cardiovasc Res. 2005; 65(3);719–27
43. Westenbrink BD, Lipsic E, van der Meer P, van der Harst P, Oeseburg H, Du Marchie Sarvaas GJ et al. Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization. Eur Heart J. 2007; 28(16):2018–27
44. van der Meer P, Lipsic E, Henning RH, Boddeus K, van der Velden J, Voors AA et al. Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 2005; 46(1):125–33

45. Silverberg DS, Wexler D, Sheps D, Blum M, Keren G, Baruch R et al. The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron: a randomized controlled study. J Am Coll Cardiol. 2001 Jun 1;37(7):1775-80
46. Namiuchi S, Kagaya Y, Ohta J, Shiba N, Sugi M, Oikawa M et al. High serum erythropoietin level is associated with smaller infarct size in patients with acute myocardial infarction who undergo successful primary percutaneous coronary intervention. J Am Coll Cardiol. 2005; 45(9):1406-12
47. Marti HH, Bernaudin M, Petit E, Bauer Cl. Neuroprotection and angiogenesis: dual role of erythropoietin in brain ishemia. News Physiol Sci 2000; 15:225-9
48. Ehrenreich H, Fischer B, Norra C, Schellenberger F, Stender N, Stiefel M et al. Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. Brain. 2007; 130(10):2577–88
49. Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C, Knolle-Veentjer S, Wilms S, et al. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. Mol Psychiatry. 2007; 12:206–20
50. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med. 2002; 8:495–505
51. de Groot K, Bahlmann FH, Sowa J, Koenig J, Menne J, Haller H et al. Uremia causes endothelial progenitor cell deficiency. Kidney Int. 2004; 66(2):641-6
52. Kes P. Povoljni učinci liječenja bubrežne anemije u ranim stadijima kroničnog bubrežnog zatajenja. Liječ Vjesn. 2002; 124:108-9
53. Slivenberg D. Outcomes of anemia management in renal insufficiency and cardiac disease. Nephrol Dial Transplant. 2003; 18:7-12
54. Timothy R. Hercus, Daniel Thomas, Mark A. Guthridge, Paul G. Ekert et al. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. Blood. 2009; 114:1289-98
55. Lindemann A, Mertelsmann R. Interleukin-3 and its receptor. Cancer Treat Res. 1995; 80:107-42

56. Blalock WL, Weinstein-Oppenheimer C, Chang F, Hoyle PE, Wang XY, Algate PA et al Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. Leukemia. 1999; 13(8):1109-66
57. Ihle JN. The molecular and cellular biology of interleukin-3. Year Immunol. 1989; 5:59-102.
58. Möller A, Henz BM, Grützkau A, Lippert U, Aragane Y, Schwarz T et al. Comparative cytokine gene expression: regulation and release by human mast cells. Immunology. 1998; 93(2):289-95
59. Zenke G, Lokker NA, Strittmatter U, Fagg B, Geisse S, Huber-Wegmann G et al. Purification and characterization of natural human interleukin-3. Lymphokine Cytokine Res. 1991; 10(4):329-35
60. Fung MC, Hapel AJ, Ymer S, Cohen DR, Johnson RM, Campbell HD et al. Molecular cloning of cDNA for murine interleukin-3. Nature. 1984; 307(5948):233-7
61. Crooks GM, Haoo QL, Petersen D, Barsky LW, Bockstoce D. IL-3 increases production of B lymphoid progenitors from human CD34+CD38- cells. J Immunol. 2000; 165(5):2382-9
62. Arai A, Kanda E, Miura O. Rac is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in activation of the Erk signaling pathway. Oncogene. 2002; 21(17):2641-51
63. Nitsche A, Junghahn I, Thulke S, Aumann J, Radonić A, Fichtner I et al.Interleukin-3 promotes proliferation and differentiation of human hematopoietic stem cells but reduces their repopulation potential in NOD/SCID mice. Stem Cells. 2003; 21(2):236-44
64. Brizzi MF, Formato L, Dentelli P, Rosso A, Pavan M, Garbarino G et al. Interleukin-3 stimulates migration and proliferation of vascular smooth muscle cells: a potential role in atherogenesis. Circulation. 2001; 103(4):549-54
65. Iwasaki Y, Ikeda K, Ichikawa Y, Igarashi O, Iwamoto K, Kinoshita M. Protective effect of interleukin-3 and erythropoietin on motor neuron death after neonatal axotomy. Neurol Res. 2002; 24(7):643-6
66. Gillessen S, Mach N, Small C, Mihm M, Dranoff G. Overlapping roles for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 in eosinophil homeostasis and contact hypersensitivity. Blood. 2001; 97(4):922-8

67. Park BL, Kim LH, Choi YH, Lee JH, Rhim T, Lee YM et al. Interleukin 3 (IL3) polymorphisms associated with decreased risk of asthma and atopy. J Hum Genet. 2004; 49(10):517-27
68. Asquith KL, Ramshaw HS, Hansbro PM, Beagley KW, Lopez AF, Foster PS. The IL-3/IL-5/GM-CSF common receptor plays a pivotal role in the regulation of Th2 immunity and allergic airway inflammation. J Immunol. 2008; 180:1199-206
69. Yamashita N, Tashimo H, Ishida H, Kaneko F, Nakano J, Kato H et al. Attenuation of airway hyperresponsiveness in a murine asthma model by neutralization of granulocytemacrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). Cell Immunol. 2002; 219(2):92-7
70. Kitamura T, Miyajima A. Functional reconstitution of the human interleukin-3 receptor. Blood. 1992; 80(1):84-90
71. Evans CA, Ariffin S, Pierce A, Whetton AD. Identification of primary structural features that define the differential actions of IL-3 and GM-CSF receptors. Blood. 2002; 100(9):3164-74
72. Zheng X, Karsan A, Duronio V, Chu F, Walker DC, Bai TR et al. Interleukin-3, but not granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-5, inhibits apoptosis of human basophils through phosphatidylinositol 3-kinase: requirement of NF-kappaB-dependent and -independent pathways. Immunology. 2002; 107(3):306-15
73. Dey R, Ji K, Liu Z, Chen L. A cytokine-cytokine interaction in the assembly of higher-order structure and activation of the interleukine-3:receptor complex.PLoS One. 2009; 4(4):e5188
74. Batinić D, Petrovečki M, Golemović M. Uzgoj krvotvornih stanica in vitro. Metode istraživanja in vitro i in vivo, 2004; 69-76
75. Burns CE, Zon LI. Portrait of a stem cell. Dev Cell 2002; 3(5):612-3
76. Golemović M, Skifić M, Cepulić BG. Mesenchymal stem cells: immunomodulatory properties and clinical application. Lijec Vjesn. 2012; 134(1-2):42-9
77. Burmester GR, Pezzutto A. Color atlas of immunology. 2003; 10-56.
78. Cheshier SH, Prohaska SS, Weissman IL. The effect of bleeding on hematopoietic stem cell cycling and self-renewal. Stem Cells Dev. 2007; 16(5):707–17
79. Silbernagl S, Lang F. Color atlas of patophysiology. 2000; 28-44

80. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. Cell. 2008; 132(4):631–44
81. Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. Nat. Rev. Genet 2000; 1:57–64
82. Hattangadi SM, Wong P, Zhang L, Flygare J, Lodish HF. From stem cell to red cell: regulation of erythropoiesis at multiple levels by multiple proteins, RNAs, and chromatin modifications, Blood 2011; 118: 6258-68
83. Clark BR, Keating A. Biology of bone marrow stroma. Ann N Y Acad Sci 1995; 770:70-8
84. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cell: use and perspectives. Hematology J 2003; 4:92-96
85. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol 2000; 28(8):875-84
86. Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y. Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). Kidney Int 2005; 67:2089-100
87. Earley A, Miskulin D, Lamb EJ, Levey AS, Uhlig K. Estimating equations for glomerular filtration rate in the era of creatinine standardization: a systematic review. Ann Intern Med 2012; 156:785-95
88. Levey AS, Beto JA, Coronado BE. Controlling the epidemic of cardiovascular disease in chronic renal disease: What do we know? What do we need to learn? Where do we go from here? Am J Kidney Dis 1998; 32: 853–906
89. Sarnak MJ, Levey AS, School Werth AC. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: A statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Circulation 2003 108: 2154–69
90. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL et al: The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. JAMA 2003; 289:2560–73

91. National kidney foundation: K/DOQI Clinical Practice Guidelines on Hypertension and Antihypertensive Agents in Chronic Kidney Disease. Am J Kidney Dis 2004; 43:S1–S290, www.kdoqi.org
92. Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G. Traditional and emerging cardiovascular risk factors in end-stage renal disease. Kidney Int Suppl. 2003; 85:S105-10
93. Sarnak M, Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B et al. American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention et al. Circulation 2003; 108: 2154-69.
94. Eknoyan G, Lameire N, Barsoum R, Eckardt KU, Levin A, Levin N et al: The burden of kidney disease: Improving global outcomes. Kidney Int 2004; 66:1310–14
95. 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(2):616-23
96. Hallan SI, Coresh J, Astor BC, Asberg A, Powe NR, Romunstad S et al. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and end-stage renal disease risk. J Am Soc Nephrol 2006; 17:2275–84
97. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P et al. Prevalence of chronic kidney disease in the Unites States. JAMA2007; 298:2038–47
98. Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju, Hrvatskog liječničkog zbora, Hrvatski registar nadomještanja bubrežne funkcije, Izvještaj za 2011. godinu. S.Čala, preuzeto sa http://www.hdndt.org/registar-forward.htm
99. Gaedeke J, Noble NA, Border WA. Curcumin blocks multiple sites of the TGF-beta signaling cascade in renal cells. Kidney Int 2004; 66:112-20
100. Eitner F, Bücher E, van Roeyen C, Kunter U, Rong S, Seikrit C et al. PDGF-C is a proinflammatory cytokine that mediates renal interstitial fibrosis. J Am Soc Nephrol 2008; 19:281-9
101. Cozzolino M, Brancaccio D, Gallieni M, Galassi A, Slatopolsky E, Dusso A. Pathogenesis of parathyroid hyperplasia in renal failure. J Nephrol. 2005; 18(1):5-8

102. Mejía N, Roman-García P, Miar AB, Tavira B, Cannata-Andía JB. Chronic kidney disease-mineral and bone disorder: a complex scenario. Nefrologia. 2011; 31(5):514-9

103. Martin KJ, González EA. Metabolic bone disease in chronic kidney disease. J Am Soc Nephrol. 2007; 18(3):875-85

104. Kanbay M, Perazella MA, Kasapoglu B, Koroglu M, Covic A. Erythropoiesis stimulatory agent- resistant anemia in dialysis patients: review of causes and management. Blood Purif. 2010; 29(1):1-12

105. Locatelli F, Covic A, Eckardt KU, Wiecek A, Vanholder R, ERA-EDTA ERBP Advisory Board: Anaemia management in patients with chronic kidney disease: a position statement by the Anaemia Working Group of European Renal Best Practice (ERBP). Nephrol Dial Transplant 2009; 24:348–354.

106. Costa E, Lima M, Alves JM, Rocha S, Rocha- Pereira P, Castro E et al. Inflammation, T-cell phenotype, and inflammatory cytokines in chronic kidney disease patients under hemodialysis and its relationship to resistance to recombinant human erythropoietin therapy. J Clin Immunol 2008; 28:268–75

107. Barreto FC, Barreto DV, Liabeuf S, Drüeke TB, Massy ZA. Effects of uremic toxins on vascular and bone remodeling. Semin Dial. 2009; 22(4):433-7

108. Vanholder R, Baurmeister U, Brunet P, Cohen G, Glorieux G, Jankowski J; European Uremic Toxin Work Group. A bench to bedside view of uremic toxins. J Am Soc Nephrol. 2008; 19(5):863-70

109. Musso CG. Potassium metabolism in patients with chronic kidney disease (CKD), Part I: patients not on dialysis (stages 3-4). Int Urol Nephrol. 2004; 36(3):465-8

110. Pesavento TE. Kidney transplantation in the context of renal replacement therapy. Clin J Am Soc Nephrol. 2009; 4(12):2035-9

111. Montgomery JR, Berger JC, Warren DS, James NT, Montgomery RA, Segev DL. Outcomes of ABO-incompatible kidney transplantation in the United States. Transplantation. 2012; 93(6):603-9

112. Kahan BD, Ponticelli C. Principles and practice of renal transplantation. 2000; Immunogenetics, histocompatibility, and crossmatching for kidney transplantation. 1-39

113. Kuypers DR. Immunosupressive drug therapy and subclinical acute renal allograft rejection: impact and effect. Transplantation 2008; 85(s7):S25-30

114. Aktas S, Boyvat F, Sevmis S, Moray G, Karakayali H, Haberal M. Analysis of vascular complications after renal transplantation. Transplant Proc. 2011; 43:557-61

115. Taylor AL, Watson CJE, Bradley AJ. Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy, Critical Reviews in Oncology/Hematology 2005; 56:23–46

116. Danovich GM. Handbook of Kidney Transplantation, 2009; 77-127

117. Haloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. NEJM 2004; 351:2715-29

118. Womer KL, Kaplan B. Recent developments in kidney transplantation--a critical assessment. Am J Transplant. 2009; 9(6):1265-71

119. Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. European FK506 Multicentre Liver Study Group. Lancet 1994; 344(8920):423–8

120. Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS. A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. FK506 Kidney Transplant Study Group. Transplantation 1997; 63(7):977–83

121. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. Transplantation. 1995; 60(3):225-32

122. Adcock IM, Ito K. Molecular mechanisms of corticosteroid actions. Monaldi Arch Chest Dis 2000; 55(3):256–66

123. Steiner RW, Awdishu L. Steroids in kidney transplant patients. Semin Immunopathol. 2011; 33(2):157-67

124. Lennard L, Van Loon JA, Weinshilboum RM. Pharmacogenetics of acute azathioprine toxicity: relationship to thiopurine methyltransferase genetic polymorphism. Clin Pharmacol Therap 1989; 46(2):149–54

125. Sollinger HW. Mycophenolates in transplantation. Clin Transplant 2004; 18(5):485–92

126. Mustapic Z, Basic-Jukic N, Kes P, Lovcic V, Bubic-Filipi Lj, Mokos I, Kastelan Z, Zekan S. Varicella zoster infection in renal transplant recipients: prevalence, complications and outcome. Kidney Blood Press Res. 2011; 34(6):382-6

127. A blinded, randomized clinical trial of mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in cadaveric renal transplantation. The Tricontinental Mycophenolate Mofetil Renal Transplantation Study Group. Transplantation 1996; 61:1029-37

128. Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer. Cancer Biol Ther 2003; 2(S1):S169–77

129. McMahon G, Weir MR, Li XC, Mandelbrot DA. The evolving role of mTOR inhibition in transplantation tolerance. J Am Soc Nephrol. 2011; 22(3):408-15

130. Haydar AA, Denton M, West A, Rees J, Goldsmith DJ. Sirolimus induced pneumonitis: three cases and a review of the literature. Am J Transplant 2004; 4(1):137–9

131. Barshes NR, Goodpastor SE, Goss JA. Pharmacologic immunosuppression. Front Biosci. 2004; 9:411-20

132. Shibasaki F, Hallin U, Uchino H. Calcineurin as a multifunctional regulator. J Biochem. 2002; 131(1):1–15

133. Webster AC, Woodroffe RC, Taylor RS, Chapman JR, Craig JC. Tacrolimus versus ciclosporin as primary immunosuppression for kidney transplant recipients: meta-analysis and meta-regression of randomised trial data. BMJ. 2008; 331(7520):810-21

134. Colombo D, Ammirati E. Cyclosporine in transplantation - a history of converging timelines. J Biol Regul Homeost Agents. 2011; 25(4):493-500

135. Nankivell BJ, Chapman JR, Bonovas G, Gruenewald SM. Oral cyclosporine but not tacrolimus reduces renal transplant blood flow. Transplantation 2004; 77(9):1457–9

136. Martins L, Ventura A, Branco A, Carvalho MJ, Henriques AC, Dias L et al. Cyclosporine versus tacrolimus in kidney transplantation: are there differences in nephrotoxicity? Transplant Proc 2004; 36(4):877–9

137. Artz MA, Boots JM, Ligtenberg G, Roodnat JI, Christiaans MH, Vos PF et al. Conversion from cyclosporine to tacrolimus improves quality-of-life indices, renal graft function and cardiovascular risk profile. Am J Transplant 2004;4(6):937–45

138. Fries D, Hiesse C, Charpentier B, Rieu P, Neyrat N, Cantarovich M et al. Triple combination of lowdose cyclosporine, azathioprine, and steroids in first cadaver donor renal allografts. Transplant Proc 1987; 19(1 Pt 3):1911–4.

139. Brinker KR, Dickerman RM, Gonwa TA, Hull AR, Langley JW, Long DL et al. A randomized trial comparing double-drug and triple-drug therapy in primary cadaveric renal transplants. Transplantation 1990;50(1):43–9

140. Sharif A, Shabir S, Chand S, Cockwell P, Ball S, Borrows R. Meta-analysis of calcineurin-inhibitor-sparing regimens in kidney transplantation. J Am Soc Nephrol. 2011; 22(11):2107-18

141. Margreiter R. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin microemulsion in renal transplantation: a randomised multicentre study. Lancet 2002; 359(9308):741–6

142. Briggs D, Dudley C, Pattison J. Effects of immediate switch from cyclosporine microemulsion to tacrolimus at first acute rejection in renal allograft recipients. Transplantation 2003; 75(12):2058–63

143. Midtvedt K, Fauchald P, Lien B, Hartmann A, Albrechtsen D, Bjerkely BL et al. Individualized T cell monitored administration of ATG versus OKT3 in steroid-resistant kidney graft rejection. Clin Transplant 2003; 17(1):69–74

144. Hong JC, Kahan BD. Immunosuppressive agents in organ transplantation: past, present, and future. Semin Nephrol 2000; 20(2):108–25

145. Caillat-Zucman S, Blumenfeld N, Legendre C, Noel LH, Bach JF, Kreis H et al. The OKT3 immunosuppressive effect. In situ antigenic modulation of human graft-infiltrating T cells. Transplantation 1990; 49(1):156–60

146. Bestard O, Campistol JM, Morales JM, Sánchez-Fructuoso A, Cabello M, Cabello V et al. Advances in immunosuppression for kidney transplantation: new strategies for preserving kidney function and reducing cardiovascular risk. Nefrologia. 2012; 32(3):374-84

147. Casadei DH, del C Rial M, Opelz G, Golberg JC, Argento JA, Greco G et al. A randomized and prospective study comparing treatment with high-dose intravenous immunoglobulin with monoclonal antibodies for rescue of kidney grafts with steroid-resistant rejection. Transplantation 2001;71(1):53–8

148. Kovarik JM, Kahan BD, Rajagopalan PR, Bennett W, Mulloy LL, Gerbeau C et al. Population pharmacokinetics and exposure-response relationships for basiliximab in kidney transplantation. The U.S. Simulect Renal Transplant Study Group. Transplantation 1999; 68(9):1288–94

149. Kovarik JM, Pescovitz MD, Sollinger HW, Kaplan B, Legendre C, Salmela K et al. Differential influence of azathioprine and mycophenolate mofetil on the disposition of basiliximab in renal transplant patients. Clin Transplant 2001;15(2):123–30

150. Kessler M. Erythropoietin and erythropoiesis in renal transplantation. Nephrol Dial Transplant 1985; 10(S6):114-6

151. Levin A, Singer J, Thompson CR, Ross H, Lewis M. Prevalent left ventricular hypertrophy in the predialysis population. Identifying opportunities for intervention. Am J Kidney Dis 1996; 27:347-54

152. Al-Ahmad A, Rand WM, Manjunath G, Konstam MA, Salem DN, Levey AS et al. Reduced kidney function and anemia as risk factors for mortality in patients with left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol. 2001; 38(4):955-62

153. Rigatto C, Foley R, Jeffery J, Negrijn C, Tribula C, Parfrey P. Electrocardiographic left ventricular hypertrophy in renal transplant recipients: prognostic value and impact of blood pressure and anemia. J Am Soc Nephrol. 2003; 14(2):462-8

154. Rigatto C, Parfrey P, Foley R, Negrijn C, Tribula C, Jeffery J. Congestive heart failure in renal transplant recipients: risk factors, outcomes, and relationship with ischemic heart disease. J Am Soc Nephrol. 2002; 13(4):1084-90

155. Locatelli F, Covic A, Eckardt KU, Wiecek A, Vanholder R; ERA-EDTA ERBP Advisory Board Anaemia management in patients with chronic kidney disease: a position statement by the Anaemia Working Group of European Renal Best Practice (ERBP). Nephrol Dial Transplant. 2009; 24(2):348-54

156. Yorgin PD, Scandling JD, Belson A, Sanchez J, Alexander SR, Andreoni KA. Late post-transplant anemia in adult renal transplant recipients. An under-recognized problem? Am J Transplant. 2002; 2(5):429-35

157. Mix TC, Kazmi W, Khan S, Ruthazer R, Rohrer R, Pereira BJ et al. Anemia: a continuing problem following kidney transplantation. Am J Transplant. 2003; 3(11):1426-33

158. Vanrenterghem Y, Ponticelli C, Morales JM, Abramowicz D, Baboolal K, Eklund B et al. Prevalence and management of anemia in renal transplant recipients: a European survey.Am J Transplant. 2003; 3(7):835-45

159. Kes P, Bašić-Jukić N, Jurić I, Ratković Gusić I. Anemia after kidney transplantation; Lijec Vjesn 2007; 129:101-2

160. Vanrenterghem Y. Anaemia after renal transplantation. Nephrol Dial Transplant. 2004; 19(5):54-8

161. Achkar R, Chiba AK, Zampieri-Filho JP, Pestana JO, Bordin JO. Hemolytic anemia after kidney transplantation: a prospective analysis. Transfusion. 2011;51(11):2495-9

162. Ramsey G; Red cell antibodies arising from sloid organ transplants. Transusion 1991; 31:76-86

163. Ourahma S, Mercadal L, Tezenas du Montcel S, Assogba D, Bitker MO, Mallet A et al. Anemia in the period immediately following renal transplantation. Transplant Proc. 2007; 39(5):1446-50

164. Maiorano A, Stallone G, Schena A, Infante B, Pontrelli P, Schena FP et al. Sirolimus interferes with iron homeostasis in renal transplant recipients. Transplantation. 2006; 82(7):908-12

165. Bašić-Jukić N, Jurić I, Brunetta-Gavranić B, Kes P, Bubić-Filipi L, Glavaš-Boras S; Thrombotic microangiopathy after kidney transplantation; Acta Med Croatica. 2008; 62(1):93-6

166. Sinnamon KT, Courtney AE, Maxwell AP, McNamee PT, Savage G, Fogarty DG. Level of renal function and serum erythropoietin levels independently predict anaemia post-renal transplantation. Nephrol Dial Transplant. 2007; 22(7):1969-73

167. Lorenz M, Kletzmayr J, Perschl A, Furrer A, Hörl WH, Sunder-Plassmann G. Anemia and iron deficiencies among long-term renal transplant recipients. J Am Soc Nephrol. 2002; 13(3):794-7

168. Rossert J, Fouqueray B, Boffa JJ. Anemia management and the delay of chronic renal failure progression. J Am Soc Nephrol. 2003; 14(2):S173-7

169. Kiberd BA. Post-transplant erythrocytosis: a disappearing phenomenon? Clin Transplant 2009; 23(6):800-6.

170. Vlahakos DV, Marathias KP, Agroyannis B, Madias NE. Post-transplant erythrocytosis. Kidney Int. 2003; 63(4):1187-94
171. Kessler M, Hestin D, Mayeux D, Mertes PM, Renoult E. Factors predisposing to post-renal transplant erythrocytosis. A prospective matched-pair control study. Clin Nephrol. 1996; 45(2):83-9
172. Gaston RS, Julian BA, Curtis JJ. Post-transplant erythrocytosis: an enigma revisited. Am J Kidney Dis. 1994; 24(1):1-11
173. Friman S, Nyberg G, Blohmé I. Erythrocytosis after renal transplantation; treatment by removal of the native kidneys. Nephrol Dial Transplant. 1990; 5(11):969-73
174. Ilan Y, Dranitzki-Elhallel M, Rubinger D, Silver J, Popovtzer MM. Erythrocytosis after renal transplantation. The response to theophylline treatment. Transplantation 1994; 57(5):661-4
175. Kedzierska K, Kabat-Koperska J, Safranow K, Domanski M, Golembiewska E, Bober J et al. Influence of angiotensin I-converting enzyme polymorphism on development of post-transplant erythrocytosis in renal graft recipients. Clin Transplant 2008; 22:156-61
176. Dagher FJ, Ramos E, Erslev AJ, Alongi SV, Karmi SA, Caro J. Are the native kidneys responsible for erythrocytosis in renal allorecipients? Transplantation 1979; 28:496-8
177. Brox AG, Mangel J, Hanley JA, Louis GSt, Mongrain S, Gagnon RF. Erythrocytosis after renal transplantation represents an abnormality of insulin-like growth factor–I and its binding proteins. Transplantation 1998; 66(8):1053-8
178. Thevenod F, Radtke HW, Grützmacher P, Vincent E, Koch KM, Schoeppe W et al. Deficient feedback regulation of erythropoiesis in kidney transplant patients with polycythemia. Kidney Int 1983; 24: 227-32.
179. Gaciong Z, Koziak K, Jarzyło I, Ludwicki K, Malanowska S, Paczek L et al. Erythropoietin production after kidney transplantation. Ann Transplant 1996; 1: 29-33.
180. Aeberhard JM, Schneider PA, Vallotton MB, Kurtz A, Leski M. Multiple site estimates of erythropoietin and renin in polycythemic kidney transplant patients.Transplantation 1990; 50:613-6
181. Danovitch GM, Jamgotchian NJ, Eggena PH, Paul W, Barrett JD, Wilkinson A. Angiotensin-converting enzyme inhibition in the treatment of renal transplant

erythrocytosis. Clinical experience and observation of mechanism. Transplantation 1995; 60:132-7

182. Morrone LF, Di Paolo S, Logoluso F, Schena A, Stallone G, Giorgino F et al. Interference of angiotensin-converting enzyme inhibitors on erythropoiesis in kidney transplant recipients: role of growth factors and cytokines. Transplantation 1997; 64:913-8

183. Cole J, Ertoy D, Lin H, Sutliff RL, Ezan E, Guyene TT et al. Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice. J Clin Invest 2000; 106:1391-8

184. Bacon BR, Rothman SA, Ricanati ES, Rashad FA. Renal artery stenosis with erythrocytosis after renal transplantation. Arch Intern Med 1980; 140: 1206-11

185. Wickre CG, Norman DJ, Bennison A, Barry JM, Bennett WM. Postrenal transplant erythrocytosis: a review of 53 patients. Kidney Int 1983; 23:731-7

186. Kasiske BL. Cardiovascular disease after renal transplantation. Sem Nephrol 2000; 2: 176-87

187. Kolonko A, Pinocy-Mańdok J, Kocierz M, Kujawa-Szewieczek A, Chudek J, Malyszko J et al. Anemia and erythrocytosis after kidney transplantation and 5-year graft function and survival. Transplant Proc 2009; 41:3046-51

188. Kiberd BA. Post-transplant erythrocytosis: a disappearing phenomenon? Clin Transplant 2009; 23(6): 800-6

189. Abbud-Filho M, Adams PL, Alberú J, Cardella C, Chapman J, Cochat P et al. A report of the Lisbon conference on the care of the kidney transplant recipient. Transplantation 2007; 83(S8):S1-22

190. Yildiz A, Cine N, Akkaya V, Sahin S, Ismailoğlu V, Türk S et al. Comparison of the effects of enalapril and losartan on posttransplantation erythrocytosis in renal transplant recipients: prospective randomized study. Transplantation 2001; 72:542-4

191. Navarro JF, Garcia J, Macia M, Mora C, Chahin J, Gallego E et al: Effects of losartan on the treatment of posttransplant erythrocytosis. Clin Nephrol 1998; 49:370-2.

192. Felker GM, Adams Jr KF, Gattis WA, O'Connor CM. Anemia as a risk factor and therapeutic target in heart failure. J Am Coll Cardiol 2004; 44: 959-66.

193. Rell K, Koziak K, Jarzyo I, Lao M, Gaciong Z. Correction of posttransplant erythrocytosis with enalapril. Transplantation 1994; 57:1059-63

194. Perazella M, McPhedran P, Kliger A, Lorber M, Levy E, Bia MJ. Enalapril treatment of posttransplant erythrocytosis: efficacy independent of circulating erythropoietin levels. Am J Kidney Dis 1995; 26:495-500

195. Julian BA, Gaston RS, Barker CV, Krystal G, Diethelm AG, Curtis JJ.. Erythropoiesis after withdrawal of enalapril in post-transplant erythrocytosis. Kidney Int 1994; 46:1397-403

196. Julian BA, Brantley RR Jr, Barker CV, Stopka T, Gaston RS, Curtis JJ et al: Losartan, an angiotensin II type 1 receptor antagonist, lowers hematocrit in posttransplant erythrocytosis. J Am Soc Nephrol 1998; 9: 1104-8

197. EBPG Expert Group on renal transplantation. European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: Long-term management of the transplant recipient. IV.9.3. Haematological complications. Erythrocytosis. Nephrol Dial Transplant 2002; 17 Suppl 4:49-50

198. Ok E, Akcicek F, Toz H, Kursat S, Tobu M, Basci A et al. Comparison of the effects of enalapril and theophylline on polycythemia after renal transplantation. Transplantation 1995; 59:1623-6

199. Bakris GL, Sauter ER, Hussey JL, Fisher JW, Gaber AO, Winsett R. Effects of theophylline on erythropoietin production in normal subjects and in patients with erythrocytosis after renal transplantation. N Engl J Med 1990; 323:86-90

200. Mazzali M, Filho GA. Use of aminophylline and enalapril in posttransplant polycythemia. Transplantation 1998; 65:1461-4

201. Augustine JJ, Knauss TC, Schulak JA, Bodziak KA, Siegel C, Hricik DE. Comparative effects of sirolimus and mycophenolate mofetil on erythropoiesis in kidney transplant patients. Am J Transplant. 2004; 4(12):2001-6

202. K/DOQI Guidelines for CKD Care, www.kdoqi.org

203. Jubinsky PT, Krijanovski OI, Nathan DG, Tavernier J, Sieff CA. The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. Blood. 1997; 90(5):1867-73

204. Ifudu O, Uribarri J, Rajwani I, Vlacich V, Reydel K, Delosreyes G et al. Gender modulates responsiveness to recombinant erythropoietin. Am J Kidney Dis. 2001;38(3):518-22

205. Carrero JJ, Bárány P, Yilmaz MI, Qureshi AR, Sonmez A, Heimbürger O et al. Testosterone deficiency is a cause of anaemia and reduced responsiveness to erythropoiesis-stimulating agents in men with chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2012;27(2):709-15

206. Johnson CP, Gallagher-Lepak S, Zhu YR, Porth C, Kelber S, Roza AM et al. Factors influencing weight gain after renal transplantation. Transplantation. 1993;56(4):822-7

207. el-Agroudy AE, Wafa EW, Gheith OE, Shehab el-Dein AB, Ghoneim MA. Weight gain after renal transplantation is a risk factor for patient and graft outcome. Transplantation. 2004;77(9):1381-5

208. Nazemian F, Naghibi M. Weight-gain-related factors in renal transplantation. Exp Clin Transplant. 2005;3(1):329-32

209. Barbari A. Posttransplant Hypertension: Multipathogenic Disease Process. Exp Clin Transplant 2013; 3:7

210. Barenbrock M, Spieker C, Rahn KH, Zidek W. Therapeutic efficiency of phlebotomy in posttransplant hypertension associated with erythrocytosis. Clin Nephrol. 1993;40(4):241-3

211. Schwenger V, Zeier M, Ritz E. Hypertension after renal transplantation. Ann Transplant. 2001;6(4):25-30

212. Reinhardt D, Ridder R, Kugler W, Pekrunpost A. Transcriptional effects of interleukin-3, interferon-γ, erythropoietin and butyrate on in vitro hemoglobin chain synthesis in congenital hemolytic anemia. Haematologica 2001; 86:791-800

213. Martins e Silva J, Saldanha C. Cardiovascular Risk Factors: Hemorheologic and Hemostatic. Rev Port Cardiol 2007; 26(2):161-82

214. Saleh F, Jorde R, Svartberg J, Sundsfjord J. The relationship between blood pressure and serum parathyroid hormone with special reference to urinary calcium excretion: the Tromsø study. J Endocrinol Invest 2006; 29(3):214-20

215. Keane WF, Tomassini JE, Neff DR. Lipid abnormalities in patients with chronic kidney disease: implications for the pathophysiology of atherosclerosis. J Atheroscler Thromb. 2013; 20(2):123-33

216. Vaziri ND. Lipotoxicity and impaired high density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport in chronic kidney disease. J Ren Nutr. 2010; 20(5):S35-43

217. Shalev H, Kapelushnik J, Moser A, Knobler H, Tamary H. Hypocholesterolemia in chronic anemias with increased erythropoietic activity. Am J Hematol 2007; 82(3):199-202.

218. Ricchi P, Ammirabile M, Spasiano A, Costantini S, Di Matola T, Cinque P et al. Hypocholesterolemia in adult patients with thalassemia: a link with the severity of genotype in thalassemia intermedia patients. Eur J Haematol 2009; 82(3):219-22

219. Holm TM, Braun A, Trigatti BL, Brugnara C, Sakamoto M, Krieger M et al. Failure of red blood cell maturation in mice with defects in the high-density lipoprotein receptor SR-BI. Blood 2002; 99(5):1817-24

220. Nazemian F, Naghibi M. Weight-gain-related factors in renal transplantation. Exp Clin Transplant. 2005;3(1):329-32

221. Pirih F, Lu J, Ye F, Bezouglaia O, Atti E, Ascenzi MG et al. Adverse effects of hyperlipidemia on bone regeneration and strength. J Bone Miner Res 2012; 27(2):309-18

222. Huang MS, Lu J, Ivanov Y, Sage AP, Tseng W, Demer LL et al. Hyperlipidemia impairs osteoanabolic effects of PTH. J Bone Miner Res 2008; 23(10):1672-9

223. Glicklich D, Burris L, Urban A, Tellis V, Greenstein S, Schechner R et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition induces apoptosis in erythroid precursors and affects insulin-like growth factor-1 in posttransplantation erythrocytosis. J Am Soc Nephrol. 2001;12(9):1958-64

224. Sabanayagam C, Shankar A.J; Serum calcium levels and hypertension among U.S. adults. Clin Hypertens (Greenwich). 2011; 13(10):716-21

225. A. Akcay, M. Kanbay, B. Huddam. Relationship of posttransplantation erythrocytosis to hypercalcemia in renal transplant recipients. Transplantation Proceedings. 2005;(7):3103–5

226. Messa P, Cafforio C, Alfieri C. Clinical impact of hypercalcemia in kidney transplant. Int J Nephrol. 2011; 6:1-9

227. Mrug M, Stopka T, Julian BA, Prchal JF, Prchal JT, "Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors," Journal of Clinical Investigation, 1997; 100(9):2310–14

228. Schaefer A, Magócsi M, Marquardt H. Signalling mechanisms in erythropoiesis: the enigmatic role of calcium. Cell Signal. 1997;9(7):483-95

229. Magnusson P, Sharp CA, Magnusson M, Risteli J, Davie MW, Larsson L: Effect of chronic renal failure on bone turnover and bone alkaline phosphatase isoforms. Kidney Int 2001; 60:257-65

230. Fletcher S, Jones RG, Rayner HC, Harnden P, Hordon LD, Aaron JE et al.: Assessment of renal osteodystrophy in dialysis patients: Use of bone alkaline phosphatase, bone mineral density and parathyroid ultrasound in comparison with bone histology. Nephron 1997; 75:412-9

231. Hu M, Finni T, Xu L, Zou L, Cheng S. Effects of resistance training on biomarkers of bone formation and association with red blood cell variables. J Physiol Biochem. 2011; 67(3):351-8

232. Kalantar-Zadeh K, Kuwae N, Regidor DL, Kovesdy CP, Kilpatrick RD, Shinaberger CS et al. Survival predictability of time-varying indicators of bone disease in maintenance hemodialysis patients. Kidney Int 2006; 70:771 –80

233. Shibata J, Hasegawa J, Siemens HJ, Wolber E, Dibbelt L, Li D et al. Hemostasis and coagulation at a hematocrit level of 0.85: functional consequences of erythrocytosis. Blood. 2003; 101(11):4416-22

234. Westerterp M, Gourion-Arsiquaud S, Murphy AJ, Shih A, Cremers S, Levine RLet al. Regulation of hematopoietic stem and progenitor cell mobilization by cholesterol efflux pathways. Cell Stem Cell. 2012;11(2):195-206

235. Yvan-Charvet L, Pagler T, Gautier EL, Avagyan S, Siry RL, Han S et al.ATP-binding cassette transporters and HDL suppress hematopoietic stem cell proliferation. Science. 2010; 328(5986):1689-93

236. Weinstein RS. Parathyroid carcinoma associated with polycythemia vera. Bone 1991; 12(4):237-9

237. Coppolino G, Bolignano D, De Paola L, Giulino C, Mannella A, Riccio M et al. Parathyroid hormone and mobilization of circulating bone marrow-derived cells in uremic patients. J Investig Med. 2011; 59(5):823-8

238. Regidor DL, Kovesdy CP, Mehrotra R, Rambod M, Jing J, McAllister CJ et al.Serum alkaline phosphatase predicts mortality among maintenance hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol. 2008; 19(11):2193-203

11. ŽIVOTOPIS

ŽIVOTOPIS

Osobni podatci:

Ime i prezime: Željka Mustapić, dr.med.

Datum rođenja: 04.travanj 1978.g.

Mjesto rođenja: Zadar, RH

Mjesto stanovanja: Hrvatskog proljeća 24, Zagreb

Bračni status: udana, 3 djece

Obrazovanje

- 1996: Prirodoslovno-matematička gimnazija
- 1996-2002: Studij medicine na Medicinskom fakultetu u Zagrebu, prosječna ocjena 4,1
- 2002-2003: liječnik pripravnik za KBC Zagreb
- 2005-2008: Znanstveni poslijediplomski studij «Biomedicina i zdravstvo» MEF Zagreb tema doktorske disertacije: Čimbenici rizika za razvoj eritrocitoze nakon transplantacije burega
- 2007-2011: Specijalističko usavršavanje iz pedijatrije za Zavod za dijalizu, KBC Zagreb
- 2007-2008: Stručni poslijediplomski studij „Klinička pedijatrija", MEF Zagreb
- 2008 - EPLS (European Pediatric Life Suport) instruktor

Radno iskustvo:

- 03/2012 – specijalist pedijatar na Klinici za pedijatriju KBC Zagreb
- 03/2011-11/2012 - specijalist pedijatar u Zavodu za nefrologiju, arterijsku hipertenziju, dijalizu i transplantaciju, Klinika za unutrašnje bolesti, KBC Zagreb
- 02/2007. - specijalizacija iz pedijatrije, Zavod za dijalizu, KBC Zagreb
- 06/2004-02/2007.- znanstveni novak-asistent Medicinskog fakulteta na projektu "Etiopatogeneza srčanih bolesti u djece" voditelja prof.dr.sc. Ivana Malčića - studeni 2002. - studeni 2003. liječnik pripravnik, KBC Zagreb

Članstvo

- Hrvatski liječnički zbor

- Hrvatsko društvo za nefrologiju, dijalizu i transplantaciju
- Hrvatsko društvo za pedijatrijsku kardiologiju i reumatologiju
- Hrvatsko društvo za reanimatologiju

Popis publikacija:

1. Mustapic Z; Basic-Jukic N, Kes P, Lovcic V, Bubic-Filipi Lj, Mokos I, KastelanZ, Zekan S; Varicella zoster infection in renal transplant recipients: prevalence, complications and outcome; Kidney Blood Press Res. 2011;34(6):382-6
2. Post-transplant erythrocytosis; Mustapic Z, Basic-Jukic N, Lovcic V, Kes P; Acta Med Croatica; 2011; 65(4): 331-6
3. Demographics of paediatric renal replacement therapy in Europe: 2007 annual report of the ESPN/ERA-EDTA registry: van Stralen KJ, Tizard EJ, Vernina E, Schaefer F, Jager KJ; European Society for Paediatric Nephrology/European Renal Association- European Dialysis and Transplant Association (ESPN/ERA-EDTA) registry study group (...Mustapic Z...); Pediat Nephrol. 2010 Jul:25(7):1379-82
4. Medical guidelines for the management of adults with congenital heart disease; Malcic I, Saric D, Kniewald H, Dilber D, Bartonicek D, Mustapic Z; Paediatria Croatica; 2012; 56(2);41-45
5. Post-transplantation anemia-diagnostic and therapeutic challanges; Basic-Jukic N, Kes P, Mustapic Z, Petti M, Bender M, Bodrozic-Dzakic T; Acta Med Croatica; 2009 Sep;63 Suppl 1:23-6
6. Cytomegalovirus infection in renal transplant recipients; Basic-Jukic N, Racki S, Kes P, Mustapic Z; Acta Med Croatica; 2008; 62 Suppl 1:69-75
7. New fluids for peritoneal dialysis; Kes P, Jukić NB, Jurić I, Mustapić Z; Lijec Vjesn. 2007 Dec;129(12):421-4
8. Clinical and epidemiological features of the mitral valve prolapse in children; Malcic I, Kniewald H, Dilber D, Mustapic Z, Dorner S; Lijec Vjesn. 2007 Jun-Jul;129(6-7):181-5
9. Permanent junctional reciprocating tachycardia (PJRT) and dilated cardiomyopathy; Malcic I, Buljevic B, Kaltenbrunner W, Jelasic D, Mustapic Z, Lijec Vjesn. 2007 Mar-Apr;129:66-9